



T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

**Bakır Stresi Altında *Escherichia coli* W3110'da *yfhA/K* Mutantlarında
Sitoplazmik ve Membran Protein Profillerinin Belirlenmesi**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof. Dr. Cihan DARCAN

PROJE NUMARASI:

ARAŞTIRMACILAR:

1- Öğr. Gör. Gülçin ÇETİN

2- Öğr. Gör. Özge KAYGUSUZ

BAŞLAMA TARİHİ: 21/05/2018

BİTİŞ TARİHİ: 21/02/2021

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLECİK, 2021

ÖZET

Cu oldukça etkili antimikrobiyal özelliği olan metallerden birisidir. Bu metale karşı bakterilerin korunma mekanizmalarının açığa çıkarılması oldukça önemlidir. Bu çalışmada *yfhA-K* iki bileşikli fosforlama sistemlerinin Cu metali varlığında rolleri ve protein profillerinde meydana getirdiği değişim analiz edilmiştir. 2/MİK Cu varlığında büyütülen bakteri örnekleri toplanarak hem sitoplazmik hemde membran protein profillerinde meydana gelen değişimler 2D PAGE metodu ile tespit edilmeye çalışmıştır. Sonuç olarak Cu in MİK değeri (1.25 mg/ml) yabani tip ve mutantlarda aynı olduğu ve sidal bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Büyüme açısından da *yfhA-K* mutantlarının yabani tipten farklı bir büyüme göstermediği tespit edilmiştir. 10 kat değişen 28 adet azalan 5 adet artan protein spotu belirlenmiştir. 520 protein 2 kat azalmışken 125 protein ise 2 kat artış göstermiştir. *yfhA* mutantının Cu ilave edildiğinde 100 kat değişim gösteren 7 protein spotu bulunurken *yfhK* mutantında 5 proteinin 100 katlık artışı tespit edilmiştir. En az 10 kat arttığı tespit edilen *yfhA* mutantta 94 spot, *yfhK* mutantta ise 99 spot belirlenmiştir. Ayrıca her iki mutantta en az 10 kat azaldığı belirlenen *yfhA* mutantta 28, *yfhK* mutantta ise 16 protein bulunmaktadır. Membran proteinlerinin de *yfhA* mutantta 100 kat azalın 3 protein spotu, *yfhK* mutantta ise 15 protein spotu belirlenirken artan bir spot görülmemiştir. Aynı şekilde en az 10 kat artan proteinlerin sayısı *yfhA* mutantta 5 iken *yfhK* mutantta 8 adettir. Ancak azalan protein spot sayıları ise *yfhA* mutantta 112 iken *yfhK* mutantta 429 protein spotu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre YfhA-K iki bileşikli fosforlama sisteminin Cu stresinde çeşitli proteinlerin regülasyonunda rolleri olduğu belirlenmiştir. Burada dikkat çeken proteinlerin neler olduğu kütle spektrometresi ile analiz edildikten sonra belirlenecektir.

Anahtar kelimeler: *yfhA-K*, *Escherichia coli*, proteomik, Cu,

ABSTRACT

Cu is one of the metals with highly effective antimicrobial properties. It is very important to reveal the protection mechanisms of bacteria against this metal. In this study, the roles of yfhA-K two-compound phosphorylation systems in the presence of Cu metal and the change in protein profiles were analyzed. By collecting the grown bacteria samples, the changes in both cytoplasmic and membrane protein profiles were tried to be determined by 2D PAGE method. As a result, it was determined that the MIC value of Cu (1.25 mg / ml) was the same in wild type and mutants and it had a cidal effect. In terms of growth, it was determined that yfhA-K mutants did not show a different growth than wild type. In wild-type *E. coli* W3110, 28 decreasing 5 increasing protein spots with at least 10 fold varying degrees were detected. 520 protein decreased at least 2 times, while 125 protein increased at least 2 times. While yfhA mutant had 7 protein spots that changed 100-fold when Cu was added, a 100-fold increase of 5 proteins was detected in the yfhK mutant. 94 spots were determined in the yfhA mutant, which was found to increase at least 10 times, and 99 spots in the yfhK mutant. In addition, there were 28 proteins in the yfhA mutant and 16 proteins in the yfhK mutant, which was determined to be at least 10-fold reduced in both mutants. While 3 protein spots of membrane proteins decrease 100 times in yfhA mutant and 15 protein spots in yfhK mutant, no increasing spot was observed. Likewise, the number of proteins that increased at least 10-fold was 5 in the yfhA mutant and 8 in the yfhK mutant. However, while decreasing protein spots were 112 in the yfhA mutant, 429 protein spots were detected in the yfhK mutant. According to the results, it was determined that the YfhA-K two-compound phosphorylation system has roles in the regulation of various proteins in Cu stress. Here, the prominent proteins will be determined after analyzing by mass spectrometry.

Keys Words: yfhA-K, *Escherichia coli*, proteomics, Cu,

İçindekiler

Şekiller dizini	5
Çizelgeler dizini	6
1. GİRİŞ	7
1.1 Metal Stresi	7
1.2 İki Bileşikli Fosforlama Sistemleri	9
1.2.1 YfhA/ YfhK İki Bileşikli Fosforlama Sistemi	11
2. MATERYAL VE METOD	12
2.1 Kullanılan <i>E. coli</i> Suşları	12
2.2. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerinin Belirlenmesi	13
2.3 Metalli Büyüme Deneyleri	14
2.4 Protein izolasyonu;	14
2.4.1 Moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin ayrılması;	15
2.4.2 pH ya göre proteinlerin ayrılması	16
2.4.3. SDS PAGE Metodu	17
2.5. İstatistiksel Analiz.	17
3- BULGULAR	17
3.1 Mutantların Kontrolü	17
3.2 MİK Değerinin Belirlenmesi	19
3.3 Metalli Büyüme Deneyleri	20
3.4 Protein Miktarlarının Belirlenmesi ve Eşit Yükleme	21
3.5 Metal Stresi Altında Yabancıl tip ve Mutant Suşların Sitoplazmik ve membran Protein Profillerinin 2 Boyutlu Jel Analizi	23
3.6. <i>E. coli</i> W3110 bakterisine Cu ilave edildiğinde meydana gelen Değişimler	23
3.7. <i>E. coli</i> W3110, <i>yfhA</i> ve <i>yfhK</i> mutant strainlerin Cu varlığında veya Cu ilave edilmeyen örneklerdeki protein analizi	27
4- TARTIŞMA SONUÇ	36
5- KAYNAKLAR	41

Şekiller dizini

Şekil 1. Yabani tip <i>E. coli</i> , Keio koleksiyondan alınan <i>E.coli</i> BW25113 ve <i>yfhA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	18
Şekil 2. Yabani tip <i>E. coli</i> , Keio koleksiyondan alınan <i>E.coli</i> BW25113 ve <i>yfhK</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	18
Şekil 3. <i>E.coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::yfhA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	19
Şekil 4. <i>E.coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::yfhK</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	19
Şekil 5. Yabani tip ve mutantların metalsiz büyüme grafiği	20
Şekil 6. Yabani tip ve mutantların bakır metali varlığında büyüme grafiği	21
Şekil 7. Bovin Serum Albumin ile hazırlanmış protein miktarının belirlendiği standart grafik.	21
Şekil 8. Hücrelerin sitoplazmik proteinler (M: Protein markerı 1. W3110 kontrol 2. W3110+Cu 3. <i>yfhA::km</i> kontrol 4. <i>yfhA::km</i> +Cu 5. <i>yfhK::km</i> kontrol 6. <i>yfhK::km</i> +Cu)	22
Şekil 9. Deneysel Akış Şeması.	24
Şekil 10. Bir örnek için elde edilen anlamlı spotlara ait karşılaştırmalı üç boyutlu Analizi	25
Şekil 11. Yabani tip W3110 metali ve metalsiz örneklerin sitoplazmik proteinlerinin pH 3-10 striplerinden elde edilen jelleri	25
Şekil 12. Yabani tip W3110 metali ve metalsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 4-7 jelleri	27
Şekil 13. pH 3-10 striplerde metalsiz sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	27
Şekil 14. pH 3-10 striplerde metalsiz membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	28
Şekil 15. pH 4-7 striplerde metalsiz sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	28
Şekil 16. pH 4-7 striplerde metalsiz membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	29
Şekil 17. Cu metali ilave edilmiş, pH 3-10 striplerde sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A. <i>E. coli</i> W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	29
Şekil 18. Cu metali ilave edilmiş, pH 3-10 striplerde membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A. <i>E. coli</i> W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	30
Şekil 19. Cu metali ilave edilmiş, pH 4-7 striplerde sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	30
Şekil 20. Cu metali ilave edilmiş, pH 4-7 striplerde membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B. <i>yfhA::km</i> , C. <i>yfhK::km</i>	31
Şekil 21. <i>yfhA::km</i> mutantının metali ve metalsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 3-10 jelleri	31
Şekil 22. <i>yfhK::km</i> mutantının metali ve metalsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 3-10 jelleri	32
Şekil 23. <i>yfhA::km</i> mutantının metali ve metalsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 4-7 jelleri	32
Şekil 24. <i>yfhK::km</i> mutantının metali ve metalsiz örneklerinden elde edilen	

sitoplazmik proteinlerin pH4-7 jelleri

Çizelgeler dizini,

Tablo 1. Çalışmada kullanılan yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutant suşları.	12
Tablo 2. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.	13
Tablo 3. PZR döngü koşulları.	13
Tablo 4. IEF Koşulları	16
Tablo 5. Yabancı tip <i>E.coli</i> W3310 ve mutantların $CuSO_4$ metalinin minimal inhibisyon değerleri	20
Tablo 6. BSA kalibrasyon eğrisine göre sitoplazmik ve membran proteinlerinin miktarı (ug/ml)	22
Tablo 7 Cu ilave edilmemiş <i>E. coli</i> W3110 a göre ilave edilmiş <i>E. coli</i> W3110 nun farklı olan protein spotlarının sayıları	26
Tablo 8. pH 3-10 aralığında Sitoplazmik proteinlerin spot numaraları ve değişim Oranları	26
Tablo 9. Bakır metali varlığında sitoplazmik proteinlerin pH 3-10 aralığındaki spot analiz sonuçları	33
Tablo 10. Jel analizi sonucunda Cu ilave edilmiş örneklerde W3110 yabancı tipteki protein miktarına göre <i>yfhA</i> ve <i>yfhK</i> mutantında 10 kat fark olan spotlar ve yoğunlukları (1. <i>E. coli</i> W3110 Cu ilave edilmiş örneklerindeki spot numarası, 2 ve 3 mutantların spot yoğunlukları)	34
Tablo 11. <i>E. coli</i> W3110, <i>yfhA</i> ve <i>yfhK</i> gen mutantlarının membran proteinlerinin 2D jel analizi	36

1. GİRİŞ

Canlılar yaşamları boyunca doğal çevrelerde pH, osmolarite, sıcaklık ve metaller gibi yaşamlarını sınırlandıran birçok stres faktörüne maruz kalmakta ve hayatta kalabilmek için kendilerine çeşitli korunma mekanizmaları geliştirmektedirler (Grant ve Long, 1981). Mikroorganizmalar asidik stresten korunmada asit direnç sistemleri, asit şok proteinleri ve alkaline strese karşı sodyum proton antiportörlerinden iki bileşik fosforlama sistemlerine kadar birçok mekanizmaya sahiptirler (Saito ve Kobayashi, 2003; Foster, 1991; Peng, vd., 2011). Osmotik stres koşulları altında hücre su alarak hücre hacminde artma, zar gerilimi, turgor basıncı ve membran permeabilitesinde değişiklikler meydana gelir (Moat, vd., 2002). Mikroorganizmalar için diğer bir stres faktörü de sıcaklıktır. Sıcaklık hücresel komponentlerde makro moleküler hasar meydana getirmektedir. Mikroorganizmalar, sıcaklık stresine karşı alternatif sigma faktörü (σ^{32}) tarafından devreye sokulan bir savunma mekanizmasına sahiptirler (Arsene, vd., 2000). Ayrıca soğuğa karşı ise Csp veya Caps proteinleri ile korunma sağlanır (Phadtare, vd., 1999).

Ekolojik çevrelerde mikroorganizmaların karşılaştığı bir diğer stres faktörü de metallerdir. Metaller gerek endüstriyel atıklarla gerekse deterjan ve dezenfektan maddelerin yapısına katıldıkları için doğada en fazla bulunan maddelerdir. Mikroorganizmalar hayatta kalabilmek için metallerle karşı savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunun yanı sıra metaller aynı zamanda hücre için gerekli olan esansiyel maddelerdir. Bu sebeple hücrelere metallerin alınması içinde bir mekanizmaya ihtiyaç vardır. Mikroorganizmalar tarafından metalin hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına aktif taşınması gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanmış sistemlerdir (Egler, vd., 2005).

1.1 Metal Stresi

Bazı metaller mikroorganizmalar için esansiyelken bazıları toksik etki oluşturmaktadır. 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 mikrobelerin maddesi olarak ve osmotik

basıncı kontrol etmede kullanılırlar. Ayrıca moleküllerin elektrostatik etkileşimlerini kararlı tutmada enzimlerin bileşenleri şeklinde görev alırlar. Ancak Ag(I), Al(I), Au(II), Cd(I), Pb(II) ve Hg(II) gibi ağır metaller esansiyel değildirler. Bu metaller biyolojik öneme sahip olmadıkları gibi mikroorganizmalar üzerine son derece toksik etkileri bulunmaktadır (Kılıç ve Dönmez, 2008).

Metaller biyolojik ayrışmanın güçlü inhibitörleri olarak bilinmektedir. Proteinlerin ve metabolik süreçlerin engellenmesinin başlıca sebebi metallerin toksik etkileridir. Topraklarda biriken bakır, kadmiyum, kurşun, çinko, nikel, civa ve krom gibi metaller bitki, hayvan, insan ve sudaki yaşam için toksisite oluşturabilecek konsantrasyonlarda olabilir (Shrivastava vd, 2013).

Yüksek konsantrasyonlarda esansiyel olan ve olmayan bütün metaller hücre zarında hasara, enzim spesifikliğinde değişikliğe, hücresel fonksiyonlarının bozulmasına ve DNA yapısında hasara neden olmaktadır. Örneğin bakır (Cu), bakterilerde solunum sisteminde ve metabolizmada görev alan enzimler için esansiyel bir metaldir. Ancak, bakırın aktif redoks tepkimesi aerobik hücrelerde ROS'ların oluşumuna neden olmakta ve böylelikle sitotoksik etki yaratmaktadır. Bu yüzden Cu toksisitesinden korunmak için bakteriler bir homeostatik mekanizmaya sahiptirler (Franke, vd., 2003). Bu mekanizmaların temeli metalin hücreden detoksifiye edilmesidir. Farklı metaller için bu yollardan bazıları metalin hücre içine alınımının engellenmesi, hücre dışına atılmasının artırılması, ya da çeşitli yollarla direnç geliştirilmesidir (Franke, vd., 2003).

Escherichia coli'de, hücrelerden fazla bakırın detoksifikasyonundan sorumlu 2 tane önemli sistem vardır. *E. coli*, değişen çevre koşulları altında bakır kullanımını sağlamak ve bakır toksisitesinden korunmak için çoklu koruyucu sisteme sahiptir. Cu homeostazında görevli birden fazla regülatör sistem bulunmaktadır. Bunlardan ilki CueR, sitoplazmik Cu algılamada görevli çoklu bakır oksidazdır. Sitoplazma içerisinde Cu varlığında bu gen, CopA ve CueO homeostatik mekanizmasını düzenleyerek sitoplazmadan Cu detoksifikasyonunu sağlar. Ayrıca CueO bakır toksisitesinden periplazmik proteinleri korumada da görevlidir. Aynı şekilde, hücre zarf stresi algılamada görevli iki bileşik fosforlama sisteminin regülatörü olan CpxR de CopA düzenlenmesine etki göstererek yine sitoplazmadan Cu'ın uzaklaştırılmasında görev alır. Hücre içerisinde periplazmik bölgede Cu stresini algılamada görevli bir diğer

sistemde CusS/CusR iki bileşenli sistemidir. Bu sistem periplazmadaki Cu'ı algılar ve CusCFBA mekanizmasını devreye sokarak periplazmadan bakır detoksifikasyonu yapar. CusA bakır toleransı için gerekli olan bir bakır-bağlayıcı proteindir. *E. coli*'de CusB ve CusC, bakır iyonlarının detoksifikasyonuna katılan membran füzyon proteindir. CusF ise, bakır iyonlarının detoksifikasyonuna katılan periplazmik bir bağlama proteindir (Franke, vd., 2003). Bakır homeostazında görev yapan genler sitoplazmik Cu (I) 'a cevap veren ya da periplazmik Cu (I) algılamada görevli iki bileşenli sistemler MerR benzeri aktivatörler tarafından düzenlenir (Franke, vd., 2003). Ayrıca CusSR iki bileşenli sistemi çapraz düzenleme reaksiyonları göstererek Cu stresi altında YedVW sistemini de aktifleştirmektedir (Yamamoto ve Ishihama, 2005a). *E. coli* de Cu algılamada çok karmaşık bir mekanizma söz konusudur (Rensing ve Grass, 2003). Bu proje ile bakır algılama mekanizmasında görev aldığı düşünülen yeni genler belirlenmiş olacaktır.

1.2 İki Bileşikli Fosforlama Sistemleri

İki bileşikli sistemler, bütün hücrel formlarda yaygın olarak kullanılan bir sinyal iletim yoludur. Genel olarak iki bileşikli sistemler, dış etkenlerden gelen sinyalleri algılayan bir sensörden ve ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir cevap regülatöründen oluşur (Hoch, 2000). Bakterilerde iki bileşikli sistemler, arkealar ve ökaryotların aksine sinyal iletiminin en temel sistemidir (Egger vd., 1997). Bakterilerin iki bileşikli fosforlama sistemlerinin sensörlerinin çoğu, membranla ilişkili histidin kinazlardır. Bu sensörler çevreden gelen sinyalleri algılamada kendinde korunmuş olan histidin rezidüsünü fosforlar. Transmitter alan olarak adlandırılan histidin kinazın sitoplazmik bölgesinin karboksil ucu, ATP bağlama alanı ve kendini fosforillemesi için korunmuş olan histidin rezidüsünü içeren H kutusu alanı içerir. Sonuç olarak histidin kinaz, histidine bağlı fosforil grubunu, cevap regülatörü üzerindeki spesifik aspartat rezidüsüne transfer eder. Aktive olmuş bu cevap regülatörü çoğu zaman çevreden gelen sinyallere cevap olarak bir seri genin transkripsiyonunu indükler veya baskılar (Yamamoto vd., 2005). Oshima vd. (2002), *E. coli* genomunun dizilenmesi ile toplam 30 histidin kinaz (HK) ve 34 tane cevap regülatörü (RR) olduğunu belirtmişlerdir (Oshima, vd., 2002).

E. coli'de bulunan iki bileşikli sistemlerin birçoğu karakterize edilmiş ve temel olarak çeşitli stres faktörlerine cevap vermeden sorumlu oldukları belirlenmiştir. Tanımlanan iki bileşikli sistemlerden ArcB/ArcA'nın, anaerobik koşullar altında solunum ve fermantasyon metabolizmasında (Luchi ve Lin, 1988;1991), PhoR/PhoB'nin fosfat metabolizmasında (Wanner, 1993;1996; Stock vd., 1989; Baek ve Lee, 2007), NtrB/NtrC (GlnG/GlnL)'nin, azot asimilasyonunda (Zimmer vd., 2000), AtoS/AtoC'nin, asetoasetat metabolizmasında (Jenkins ve Nunn, 1987), BarA/UvrY'nin karbon metabolizmasında (Pernesting vd., 2003), CreC/CreB'nin minimal medyumlarda glikolitik karbon kaynaklarını fermente etmede (Cariss vd., 2008), CusS/CusR'nin, metal direncinde (Munson vd., 2000; Sigman vd., 1991), BasS/BasR'nin anaerobik ve asidik şartlarda gelişimde ve metallere cevap oluşturmada (Hagiwara vd., 2004; Lee vd., 2005), DcuS/DcuR'nin, fumarat solunumunda (Zientz vd., 1998; Golby vd.,1999; Jausch vd., 2002), CitA/CitB'nin, anaerobik şartlarda sitrat metabolizmasında (Kaspar ve Bott, 2002; Yamamoto vd., 2008), iki histidin kinaz sensörü (NarX ve NarQ) ve iki cevap regülatöründen (NarL ve NarP) oluşan Nar sisteminin, elektron yakalayıcısı olan nitrit ve nitrat cevap oluşturmada (Lee vd., 1999; Bearson vd., 2002; Stewart vd., 2002), TorS/TorR'nin, trimetilamin oksit (TMAO) varlığında TMAO redüktaz solunumunda (Me'jean vd., 1994), EnvZ-OmpR'nin ozmosensör olarak dış membran proteinlerin sentezinde (Norioka vd., 1986; Forst vd., 1990; Russo vd., 1993), PhoP/PhoQ'nun, Mg²⁺ taşınmasında (Kato vd., 1999; Groisman, 2001), UhpB/UhpA'nın, glikoz 6 fosfatın taşınmasında (Webber ve Kadner, 1997), KdpD/KdpE'nin potasyum taşınmasında (Walderhaug vd., 1992; Gassel vd., 1999), BaeS/BaeR'nin, çoklu ilaç direncinde (Baranova ve Nikaido, 2002; Nagakubo vd., 2002), RcsC/RcsB'nin kapsül oluşumunda (Laubacher ve Ades, 2008) ,CpxA/CpxR'nin bazik pH, biyofilm oluşumu ve aşırı sentezlenen salgı proteinleri gibi hücre zarf stresleri ile ilişkili şartlarda (Danese ve Silhavy,1998; Langen vd., 2001; Snyder vd., 1995) ve ayrıca hücre yüzeyindeki bozulmalarda (Otto ve Silhavy, 2002; Danese vd., 1995), EvgS/EvgA'nın, logaritmik fazdaki hücrelere asit direnci kazandırmada (Itou vd., 2009; Ma vd., 2004; Masuda ve Church, 2002; 2003), hücrelerarası haberleşmeden sorumlu olan QesC/QesB'nin flagella regulonunun ekspresyonunda (Sperandio vd., 2002), CheA/CheB'nin kemotaksis düzenlenmesinde, CheA/CheY'nin flagellanın hareketinde ve HydH/HydG (ZraS/ZraR)'nin, çinko ve kurşun varlığına duyarlı olup bu maddelere

karşı direnç mekanizmasında (Noll vd., 1998) görevli oldukları belirlenmiştir. Ayrıca tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen YehU/YehT'nin çalışmasının siklik AMP (cAMP), cAMP reseptör proteinine (CRP) bağlı olduğu (Kraxenberger vd., 2012) ve YpdA/YpdB'nin ise hücre dışındaki pirüvat tarafından uyarılarak direnç proteini olduğu düşünülen yhjX geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde (Fried vd., 2013) görev almaktadır. Tanımlanan iki bileşikli sistemler arasında bulunan YedW/YedV, RstB/RstA, YfhK/YfhA'nın ise hangi şartlarda hangi genleri kontrol ettikleri henüz tespit edilememiştir. Bu nedenle daha önce Tübitak 113T003 nolu proje ile YfhA/K iki bileşikli sisteminin farklı stres şartlarında rolleri araştırılmıştır. Çalışılan *yfhA/K* genlerinin bakır metali ile ilgili rolü olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak YfhA/K iki bileşikli sisteminin mutantlarında bakır metali varlığında sitoplazma ve membran protein profillerinin belirlenmesi bu çalışma kapsamında planlanmıştır.

1.2.1 YfhA/ YfhK İki Bileşikli Fosforlama Sistemi

YfhA-YfhK iki bileşikli fosforlama sisteminin hangi şartlar altında hangi genleri regüle ettikleri ile ilişkili henüz net bir bilgi tespit edilememiştir. Ancak literatürdeki bazı bilgilere göre YfhA ve YfhK iki bileşikli fosforlama sistemlerinin alternatif sigma faktörleri ve sRNA'lar ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Son araştırmalarla *E. coli* 'de amino şeker metabolizmasının GlmY ve GlmZ sRNA'ları tarafından posttranskripsiyonel düzeyde kontrol edildiği ortaya konmuştur. GlmY ve GlmZ sRNA'ları Enterobacteriaceae ailesinde GlmS enzim sentezinin feedback mekanizmasını düzenleyen kaskadı oluşturmaktadır (Göpel, vd., 2011). Reichenbach vd. (2009) yaptıkları çalışmada GlmY transkripsiyonunun σ 54-bağımlı promotorun aktivasyonu ile arttığını ve bu aktivasyonun GlmY'nin downstream de bulunan ikinci bir aktivatör YfhA ve YfhK iki bileşikli sistemi ile kodlandığını bulmuşlardır. Cevap regülatörü YfhA'nın σ 54 etkileşim modülü içerdiğini ve üç korunmuş bölgeye bağlanarak glmY transkripsiyonunu aktive ettiğini saptamışlardır ve bu nedenle işlevi bilinmeyen bu iki bileşenli sistemin adının değiştirilmesi önerisinde bulunmuşlardır. İlgili genlerin *glrK* ve *glrR* olarak yeniden adlandırılmasını önermişlerdir (Reichenbach, vd., 2009). Aynı zamanda bu genler literatürde QseE ve QseF olarak da bilinmektedir (Göpel vd., 2014). Flamez vd. (2007), Enterobacteriaceae ailesine ait *Yersinia pseudotuberculosis* ile

yapmış oldukları çalışmalarında *yfhA* mutantının hidrojen peroksite yüksek oranda duyarlı ve polimiksin B antibiyotiğine ise dirençli olduğunu bulmuşlardır (Flamez, vd., 2007). Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus subtilis*'le yapılan başka bir çalışmada ise katekol siderofor olan bacillibactin sentezinde Fe⁺³'ün hücreye alımında *yfhA* geninin bir rolünün olduğu saptanmıştır (Yu ve Ye, 2016).

Bu proje kapsamında moleküler mekanizması henüz tam olarak çözülememiş YfhKA iki bileşikli sisteminin genleri mutant olduğunda *E. coli*'de bakır metali varlığında sitoplazmik protein profillerinin nasıl değiştiği iki boyutlu jel elektroforezi ile belirlenecektir.

2- MATERYAL VE METOD

2.1 Kullanılan *E. coli* Suşları

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* mutant suşları Tübitak 113T003 nolu projemizde elde edilmiş ve Tablo 1' de gösterilmiştir. Oluşturulan bu mutantlar ve yabani tip *E. coli* çalışmada kullanılmak üzere %20 gliserol (Merck) içeren LB'lerde stokları -80 °C'de derin dondurucuda (Panasonic) saklanmaktadır. Çalışmalar sırasında derin dondurucudan çıkarılarak kanamisin antibiyotiği içeren LB agar petrilere tek koloni ekimi yapılarak kullanılmıştır.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan yabani tip *E. coli* W3110 ve mutant suşları.

Suşlar	Genotip	Kaynak
W3110	Yabani tip W3110	Lab stok
JW2538	BW25113 <i>yfkA::km</i>	Keio Koleksiyonu
JW5407	BW25113 <i>yfhK::km</i>	Keio Koleksiyonu
OK100	W3110 <i>yfkA::km</i>	TÜBİTAK 113T003 nolu projede elde edildi.
OK101	W3110 <i>yfhK::km</i>	TÜBİTAK 113T003 nolu projede elde edildi.
OK104	W3110 <i>pnt3::yfhA</i>	TÜBİTAK 113T003 nolu projede elde edildi.
OK105	W3110 <i>pnt3::yfhK</i>	TÜBİTAK 113T003 nolu projede elde edildi.
Plazmitler		

b2554	pnt3: <i>yfhA</i>	Mobil Plazmit
JW5407	pnt3: <i>yfhK</i>	ASKA Klone

Çalışmada kullanılacak olan mutantların koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile tekrar doğrulaması yapılmıştır. Her bir genin doğrulaması için kullanılan primerler Tablo 2’de gösterilmiştir. PZR reaksiyonu Tablo 3’deki döngü koşullarına göre yapılmıştır.

Tablo 5. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Evrensel K1 geri primeri	5’ CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3’
W3310:: <i>yfhA</i> ileri primeri	5’ TGGATACATTGCGCCAGCAA 3’
W3310:: <i>yfhK</i> ileri primeri	5’ CGAATGACGCACAACAAGGT 3’
pnt3:: <i>yfhA</i> ileri primeri SP6	5’ ATTTAGGTGACACTATAG 3’
pnt3:: <i>yfhA</i> geri primeri 21M13	5’ CAGGAAACAGCTATGACC 3’
pnt3:: <i>yfhA</i> geri primeri	5’ GCCAAACGCTGGCCCGTTTTTCC 3’
pnt3:: <i>yfhK</i> geri primeri	5’ CCTTTCGTGTTTTTCGACGACGG 3’

Tablo 6. PZR döngü koşulları.

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

2.2. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerinin Belirlenmesi

113T003 nolu TÜBİTAK projemizde yabancı tip *E. coli* W3110 ile MİK değeri belirlenmiş ve bu değerler kullanılarak yapılan yaşam deneylerinde bakır metaline karşı rolü olduğu tespit edilmiştir. Yapılacak olan bu çalışmada ise yabancı tip *E. coli*'nin *yfhA* ve *yfhK* genleri mutant bakterilerinde bakır metalinin (CuSO₄) MİK değeri NCCLS standardına (National Committee for Clinical Laboratory Standards) göre belirlenmiştir. Bakır metalinin MİK değerlerinin belirlenmesi için tek bir bakteri kolonisi 5 ml LB broth besiyerinde 37 °C de 18 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında bakterilerin absorbansı 600 nm dalga boyunda 0,1'e ayarlanarak 60 ml'de 400 µl olacak şekilde stok bakteri kültürü hazırlanmıştır. Bu kültürden 96 kuyucuklu mikro plakaya ilk kuyucuk 180 µl diğer kuyucuklar 100 µl olacak şekilde kültür eklenmiştir. 180 µl'lik kuyucuğa ilave olarak 0.2 M CuSO₄ stok solüsyonundan 20 µl eklenerek örnekler 1/2 seri sulandırma yapılmıştır (5000-312,5 µg/ml). Plakalar 37 °C de 24 saat inkübe edilecek ve MİK değerleri belirlenmiştir.

2.3 Metalli Büyüme Deneyleri

Yabancı tip *E. coli* W3110 100 ml LB broth içeren 500 ml'lik erlenlerde çalkalamalı olarak inkübasyona tabi tutulmuştur. Bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ de 0,2 absorbansa ulaştıncaya 0.2 M CuSO₄ stok solüsyonundan MİK değerlerinin yarısı konsantrasyonunda metal ilave edildi ve bakterilerin yoğunluğu OD₆₀₀ de 0,6-0,7'e ulaştıncaya kadar 37 °C 160 rpm çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür. Yaklaşık olarak 0,6-0,7'e yoğunluğuna ulaşan bakterilerden protein izolasyonu yapılmıştır. Çalışmalar en az 3'er tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.4 Protein izolasyonu;

Büyüme deneyleri yabancı tip ve mutant suşlar ile MİK değeri belirlenen bakır metali varlığında Luria Bertani Broth besi ortamında 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Absorbans değeri 0.6-0.7 ye ulaşan kültürlerden 50 ml örnek alınıp, 10000 g de 20 dk. 4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak pellet 5 ml soğuk 1XPBS ile 3 kere yıkanmıştır ve her yıkama arasında 10000 g de 10 dk. 4°C'de tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılarak pellet üzerine %100'lük TCA solüsyonundan %10, aseton dan %90 ve %0.07 g DTT içeren TCA çöktürme tamponu eklenerek pelet çözdürülmüştür. Bu işlem den sonra proteinlerin zarar görmesini engellemek için buz

üzerinde çalışılmıştır. Daha sonra lizat sonikatör ile buz içerisinde 6 amplitude şiddette 30'ar saniye süre ile 5-6 kere muamele edilmiştir. Her muamele arasında 30 saniye bekletilmiştir. Sonikasyon işleminden sonra 12.000g de 20dk 0°C'de santrifüj yapılmış ve oluşan pellet soğuk aseton/DTT (%0,07g DTT içeren aseton) karışımı ile 6 kez yıkanmıştır. Her yıkama arasında pellet, aseton DTT karışımı eklendikten sonra 20 dk buzda bekletilir ardından 10.000g de 10dk 0°C'de santrifüj yapıldı. Tüm yıkama işlemi bittikten sonra pellet aseton kokusu gidene kadar kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellet tartılır ve pellet rehidrasyon tamponunda (7M üre, 2M tiyo üre, %4 CHAPS, 20mm DTT) çözündürülür. Oda ısısında 1 saat bekletilir ve daha sonra 100.000g de 60dk 20°C'de santrifüj yapılır. Santrifüj sonrasında pellet kısmı membran proteinleri için ayrılır. Süpernatant ise saf protein ekstraktı olarak kullanılır. Elde edilen protein aligotlara ayrılarak -80°C'de saklanır. Membran proteinlerini içeren pellet 15 dk buzda bekletildikten sonra 5 ml liziz bufferda (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M üre, pH 8) çözülerek 60 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karışım 10000 g de oda sıcaklığında 30 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı -20°C'de saklanmaktadır. Elde edilen proteinlerin eşit miktarda elektroforeze yüklenmesi için örneklerin içerdikleri protein miktarları, Tsukada vd. (1987)'nin yöntemine göre %0,1 Bovin Serum Albümin (BSA-Merck) kullanılarak tespit edilmiştir. Coomassie Brilliant mavisi G-250 boyası ile standart grafik çizilerek, bu standart grafiğe göre spektrofotometrede 595 nm'de okunarak protein miktarı belirlenmiştir. Elde edilen tüm protein ekstraktları eşit olacak şekilde (stribe maksimum 200 ug/ml) yüklenmiştir.

2D jel elektroforezi yöntemi iki kısımdan oluşmaktadır.

2.4.1. pH ya göre proteinlerin ayrılması;

Proteinlerin pH gradienti bulunan striplere yüklenmesi gerekmektedir. Örneklerin striplere yüklenebilmesi için rehidrasyon yapılması gerekmektedir. Her örnek, 1/8 oranında rehidrasyon bufferı (7M üre, 2M tiyo üre, %4 CHAPS, 20mm DTT, %1 amfolit ve boya olarak %0.0002 bromfenol mavisi) içermesi gerekir. Proteinlerin miktar tayini yapıldıktan sonra her bir örnek eşit miktarlarda protein içerecek şekilde rehidrasyon tamponu ile eşitlenir ve striplere yüklenir. Örnek yükleme yapıldıktan sonra 12 saat pasif rehidrasyon gerçekleştirilmiştir. Rehidrasyon işlemi takiben IEF izoelektrik odaklama (IPGphor3GE Healthcare) cihazında bulunan odaklama tepsisinin

kuyularına rehidrate edilen jel çubukları yerleştirilir ve çubukların + ve – uçlarına 150µL saf su ile ıslatılmış elektrod kağıtları yerleştirilir. Mineral yağ (Merck, USA) jelli ve jelsiz bütün kuyulara eklenir (toplam 108mL) ve stripler 8kV dan saatte 72 kV okumaya ulaşıncaya kadar elektroforez işlemi gerçekleştirilir. IEF koşulları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. IEF Koşulları*

Adım		Volt	Süre
1	Sabit	250	30 dk
2	Sabit	500	1 saat
3	Sabit	1000	1 saat
4	Sabit	2000	2 saat
5	Gradient	5000	5000 Vh
6	Gradient	6000	8500 Vh
7	Sabit	250	2 saat

*Bu koşullar, 11 cm lik pH gradyentine sahip IPG jel çubukları için optimize edilmiştir.

Daha sonra stripler SDS-PAGE'den önce 15 ml dengeleme tamponu I (6 M üre, %20 gliserol, %2 SDS, %1 DTT, 50 mM Tris pH 8.8) ile 15 dk 60 rpm'de çalkalamalı platomda dengelenmiştir. Ardından benzer bileşime sahip olan dengeleme tamponu II (DTT yerine %2,5 iyodoasetamit ve bromofenol blue boyası içeren) ile tekrar 15 dk 60 rpm'de çalkalamalı platomda karanlık ortamda ikinci kez dengelenmiştir. Dengeleme işlemi devam ederken %12'lik poliakrilamid jel (34ml dH₂O, 25ml Tris-HCl pH 8.8, 40ml %30 Akrilamid-bisakrilamid, %20 SDS den 500µl, 500µl %10'luk APS ve 50µl temed) hazırlanır.

2.4.2. Moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin ayrılması;

Dengeleme işlemlerinden sonra stripler 1X TGS (25 mM Tris-Base, 192 mM glisin, %0,1 SDS) bufferla yıkanarak %12'lik poliakrilamid jel üzerine konulmuştur. pH stripleri jelin üzerine konulduktan sonra dolgu maddesi olarak %0,5'lik low melting

agaroz ile üzeri kapatılmıştır. Elektroforez esnasında yürütücü tampon olarak 1XTGS tamponu kullanılmış ve jeller önce 30 dk 15mA de ve daha sonra jel başına 60 mA akım olacak şekilde yürütülmüştür. Daha sonra jeller Blakesley ve Boezi (1977) tarafından uygulanan metoda göre, %1 Coomassie Brilliant mavisi G-250 (%100'lük etanolde çözdürülmüş) ile 1 gün boyunca çalkalamalı platformda boyanmıştır. Boyama işlemi sonrasında %30 metanol ve %10 asetik asit içeren solüsyon ile boya fazlalığı giderilmiştir. Boyama sonrası jeller 300 dpi epon marka yatay tarayıcı ile taranarak 2D Dymension Software (Syngene) ile metal stresine maruz kalmış yabancı tip ve mutant suşlar arasındaki protein profillerinde meydana gelen değişimler analiz edilmiştir.

2.4.3 SDS PAGE Metodu

İki kısımdan oluşmaktadır. Yürütme jeli (Seperating Gel) ve yükleme jeli (Stacking Gel) Yürütme jeli 5000 µl Seperating Buffer (1,5 M Tris-HCl (tris base 181,5 g, SDS 4 gr, 1L dH₂O pH: 8.8), 6240 µl %30'luk Akrilamid-Bisakrilamid, 15 µl Temed, 150 µl %10'luk APS ve 3740 µl dH₂O karıştırılarak hazırlanır. Daha sonra camlar arasına jel dökülür. Yüzeyin düz olması için 1 ml kadar İzopropanol ya da N-bütanol jel üzerine konur ve jelin donması beklenir. Jel donduktan sonra alkolün tamamen uzaklaşması için jeller iyice yıkanır ve kurutma kağıdı ile fazla su alınır. Ardından yükleme jeli hazırlanır ve dökülür. Yükleme jeli için 1000 µl Stacking Buffer (0,5 M Tris-HCl (tris base 60,5 gr+ 4 gr SDS + 1L dH₂O pH: 6.8), 833 µl %30'luk Akrilamid-Bisakrilamid, 5 µl Temed, 50 µl %10'luk APS ve 3530 µl dH₂O karıştırılarak hazırlanır. Daha sonra yürütme jeli üzerine dökülerek taraklar yerleştirilir ve donması beklenir. Donduktan sonra 100 µg olarak yüklenmiş ve jelde 200 V ta 6 saat yürütülmüştür.

2.5. İstatistiksel Analiz.

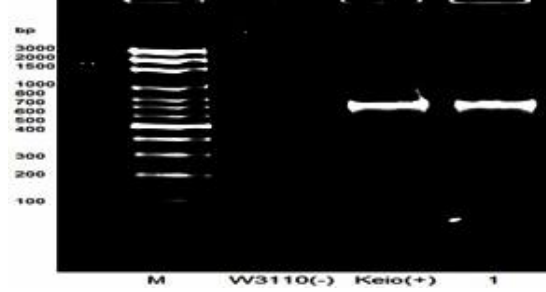
Çalışmada elde edilen grafiklerde standart hata hesaplamaları yapılmış ve grafiklerde gösterilmiştir.

3- BULGULAR

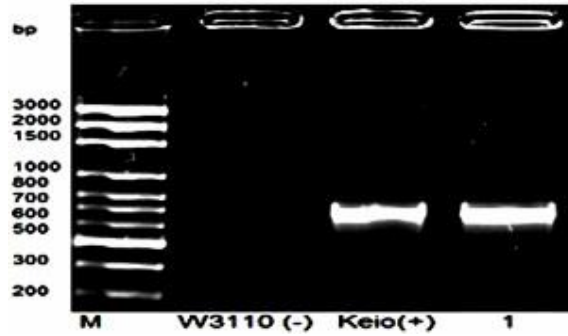
3.1 Mutantların Kontrolü

Her bir gen için kendisine ait ileri primer ve k1 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. Elde edilen mutantların PZR görüntüleri Şekil 1-2' de verilmiştir. Negatif

kontrol olarak yabancı tip *E. coli* W3110 kullanılırken pozitif kontrol olarak her bir genin keio koleksiyondan alınan *E.coli* BW25113 suşundaki mutantlar kullanıldı. Şekilde görüldüğü gibi f-k1 primerleri ile elde edilen *yfhA::km* mutanıtı 683 bç (Şekil 1) iken *yfhK::km* 688 bç bant büyüklüğüne sahip (Şekil 2) PZR ürünü elde edilmiştir. Sonuç olarak istenilen genlerin nakavt olduğu belirlenmiştir.



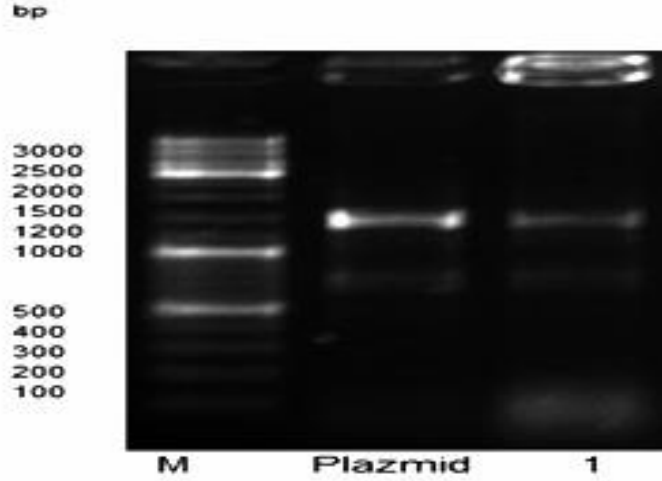
Şekil 7. Yabancı tip *E. coli*, Keio koleksiyondan alınan *E.coli* BW25113 ve *yfhA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



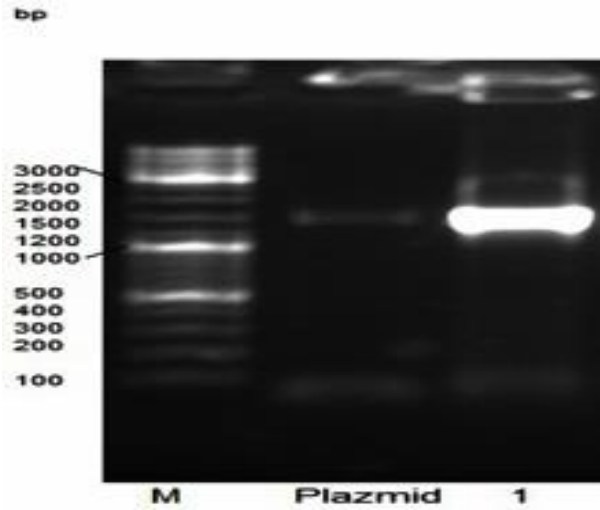
Şekil 8. Yabancı tip *E. coli*, Keio koleksiyondan alınan *E.coli* BW25113 ve *yfhK* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

Tamamlama testleri için yukarıda elde ettiğimiz mutantlara keio koleksiyondan temin edilen ilgili genleri içeren plazmitler izole edilip transforme edilmiştir. Transformasyon sonrasında oluşan tamamlanmış mutant hücrelerde her bir gen için kendisine ait olan ileri ve geri primerleri kullanılarak PZR ile doğrulanmış ve Tablo 2' de gösterilmiştir. Elde edilen mutantların ve pozitif kontrol BW25113 plazmidinin PZR görüntüleri Şekil 3-4' de verilmiştir. Elde ettiğimiz mutantlardan *pnt3::yfhA* mutanıtı 1397 bç (Şekil 3) iken *pnt3::yfhK* mutanıtı 1474 bç (Şekil 4) bant büyüklüğüne sahiptir.

Dolayısı ile jel görüntülerinde mutantların tamamlama testleri için eklenen plazmitlere sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 9. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::yfhA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 10. *E.coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::yfhK* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

3.2 MİK Değerinin Belirlenmesi

Elde edilen sonuçlar Tablo 5' de gösterilmiştir. CuSO_4 in *E. coli* ve mutantlar üzerinde MİK değerinin aynı olduğu ve hepsinde 1.25 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

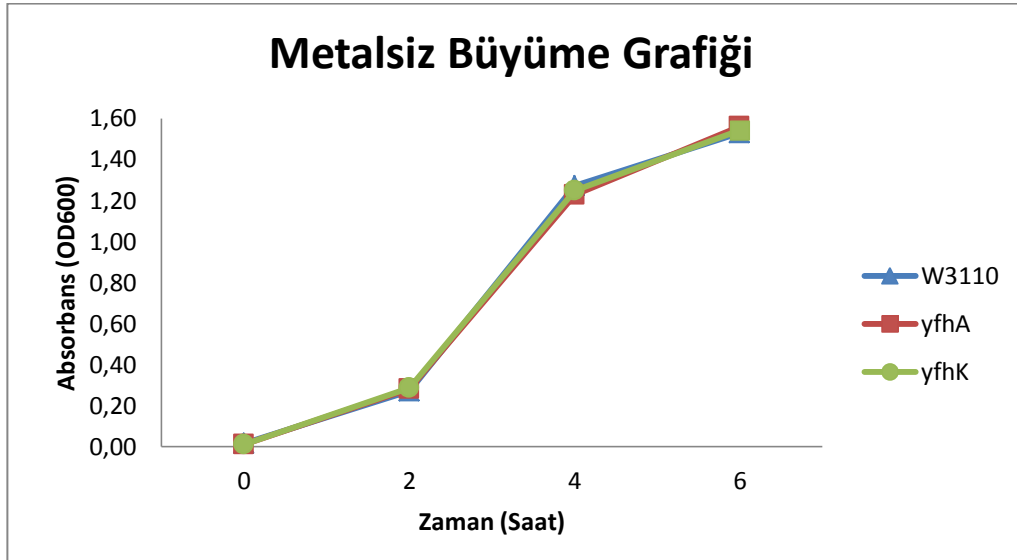
Bakterilerin ölmesine neden olan değer sidal değeridir. Çalışmamızda Sidal konsantrasyon değerinde MİK değeri ile aynı olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile MİK değerinin aynı zamanda sidal bir değer olduğu ifade edilebilir.

Tablo 5. Yabani tip *E.coli* W3310 ve mutantların CuSO_4 metalinin minimal inhibisyon değerleri

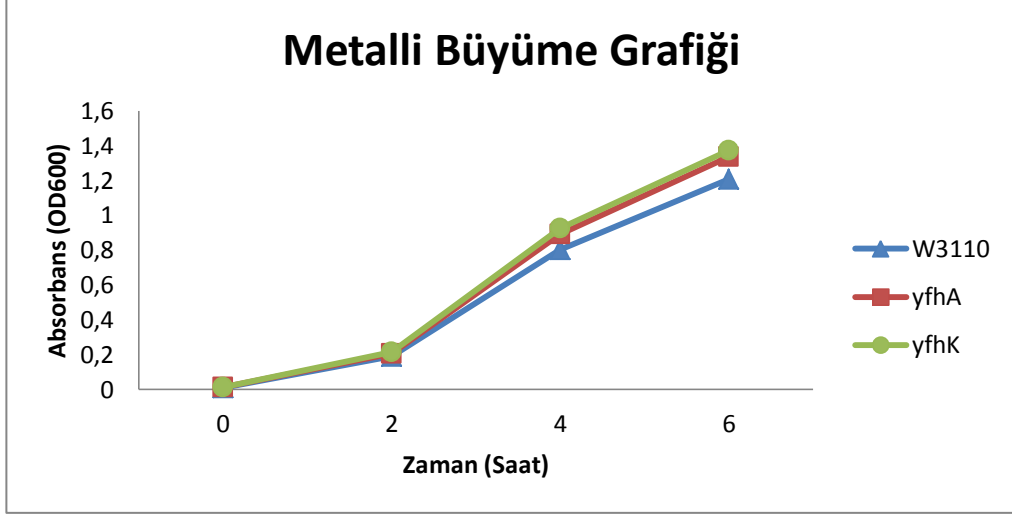
Mutantlar	Statik Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) MİK	Sidal Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) MSK
<i>E.coli</i> W3310	1,25 mg/ml	1,25 mg/ml
W3310:: <i>yfhA</i>	1,25 mg/ml	1,25 mg/ml
W3310:: <i>yfhK</i>	1,25 mg/ml	1,25 mg/ml

3.3 Metalli Büyüme Deneyleri

Yabani tip *E. coli* W3110 MİK değerlerinin %75 konsantrasyonunda metal içeren LB broth besiyerinde bakteriler 37°C 160 rpm çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür. Çalışmalar en az 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Büyüme açısından mutantların ikisinde Cu varlığında yabani tipten biraz daha iyi büyüme gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5 ve 6).



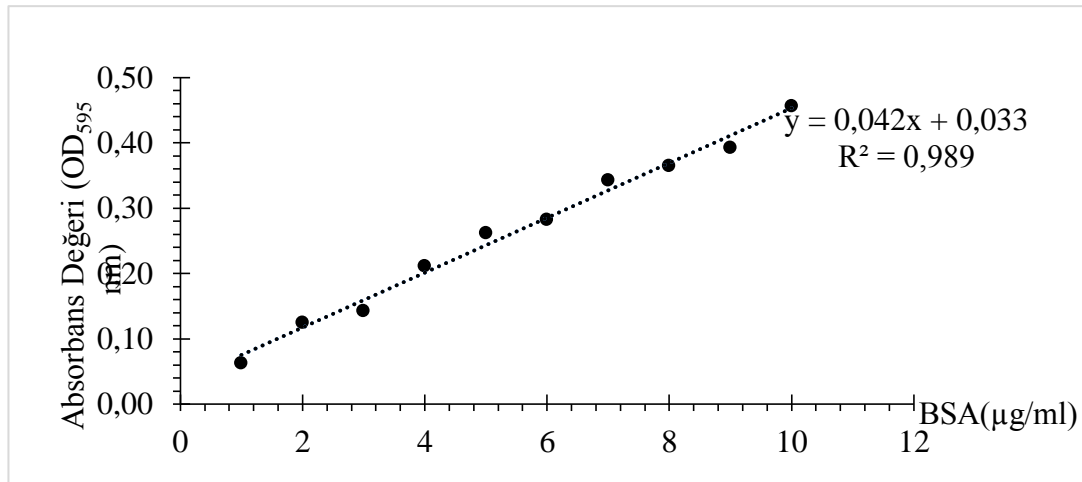
Şekil 11. Yabani tip ve mutantların metalsiz büyüme grafiği



Şekil 12. Yabani tip ve mutantların bakır metali varlığında büyüme grafiği

3.4 Protein Miktarlarının Belirlenmesi ve Eşit Yükleme

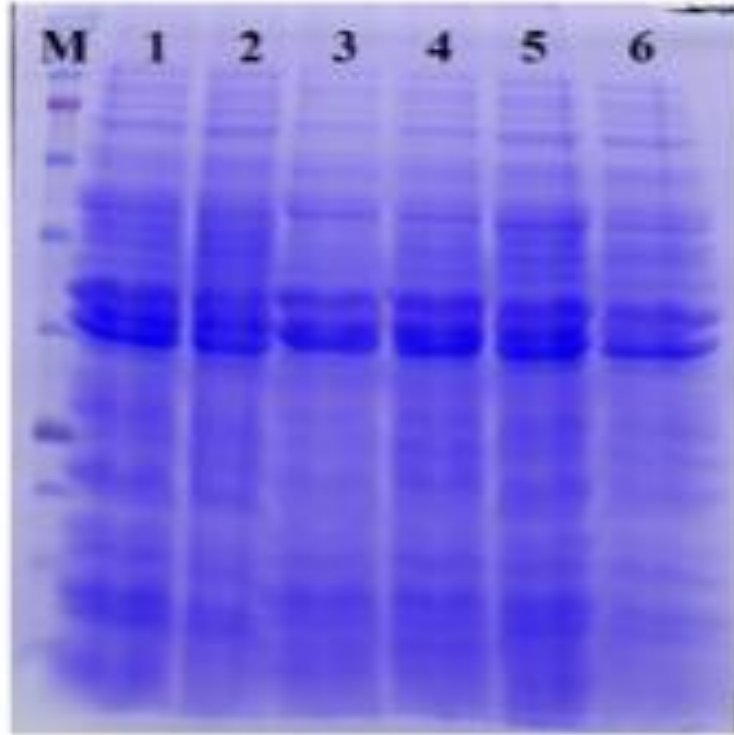
Çalışmada kullanılmak için elde edilen proteinlerin ilk olarak bradford yöntemi ile miktar analizleri yapılmıştır. Hücrelerde metalin hücre üzerine etkisini görebilmek için IEF cihazına proteinlerin eşit miktarda yüklenmesi gereklidir. Bu nedenle çalışmada kullanılacak olan sitoplazmik ve membran protein miktarlarının BSA standartına göre (Şekil 7) belirlenen miktarları (Tablo 6) oranlanarak eşit miktarda yüklenmesi sağlanmıştır. Aşağıda BSA standardı ve protein ekstraktlarımızın miktarları verilmiştir. Ayrıca elde edilen protein ekstraktıda SDS jelde yürütülerek Şekil 8 de gösterilmiştir.



Şekil 7. Bovin Serum Albumin ile hazırlanmış protein miktarının belirlendiği standart grafik.

Tablo 6. BSA kalibrasyon eğrisine göre sitoplazmik ve membran proteinlerinin miktarı (ug/ml)

	Sitoplazmik protein	Membran proteini
	ug/ml	ug/ml
<i>W3110</i>	4480,95	3557,14
<i>W3110+ Cu</i>	4561,90	3135,71
<i>YfhA::km</i>	4352,38	3995,24
<i>YfhA::km+ Cu</i>	4364,29	2900,00
<i>YfhA::pnt3</i>	4064,29	4373,81
<i>YfhA::pnt3+ Cu</i>	4107,14	3411,90
<i>YfhK::km</i>	4788,10	1876,19
<i>YfhK::km+ Cu</i>	4419,05	2233,33
<i>YfhK::pnt3</i>	4247,62	4271,43
<i>YfhK::pnt3+ Cu</i>	4330,95	3880,95



Şekil 8. Hücrelerin sitoplazmik proteinler (M: Protein markerı 1. *W3110* kontrol 2. *W3110+Cu* 3. *yfhA::km* kontrol 4. *yfhA::km+Cu* 5. *yfhK::km* kontrol 6. *yfhK::km+Cu*)

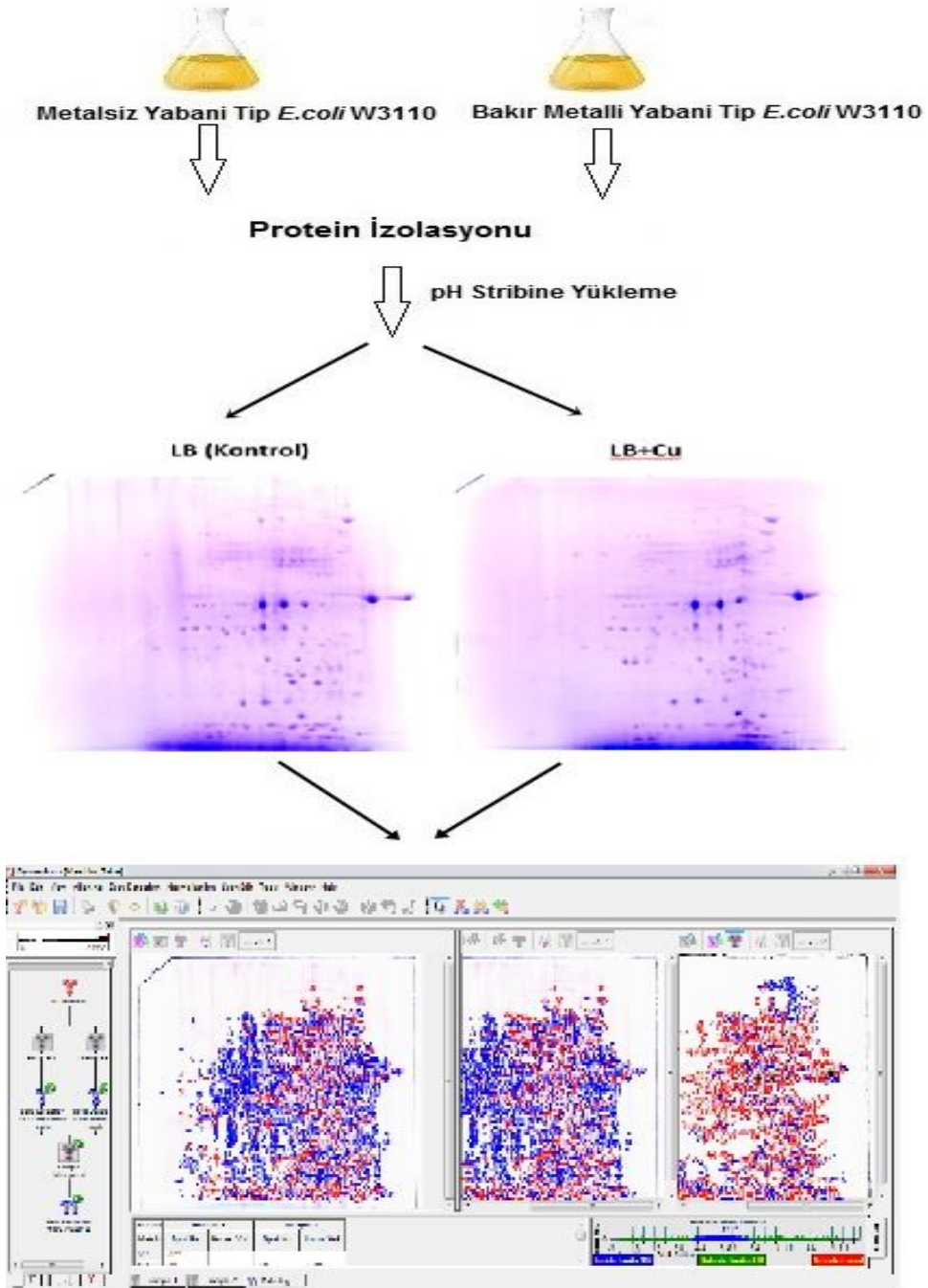
3.5 Metal Stresi Altında Yabani tip ve Mutant Suşların Sitoplazmik ve membran Protein Profillerinin 2 Boyutlu Jel Analizi

Çalışmamızın deneysel akış şeması aşağıdaki şekilde özetlenmiş ve elde edilen protein jellerinin görüntüleme işlemleri sonrasında, karşılaştırmalı spot analizlerine ait bir örnek Şekil 9'de sunulmuştur. Ayrıca gerçekleştirilen analizler sonucunda hacimsel olarak ciddi farklılıkların gözlemlendiği spotlara ait örneklerin şekil 10 da verilmiştir.

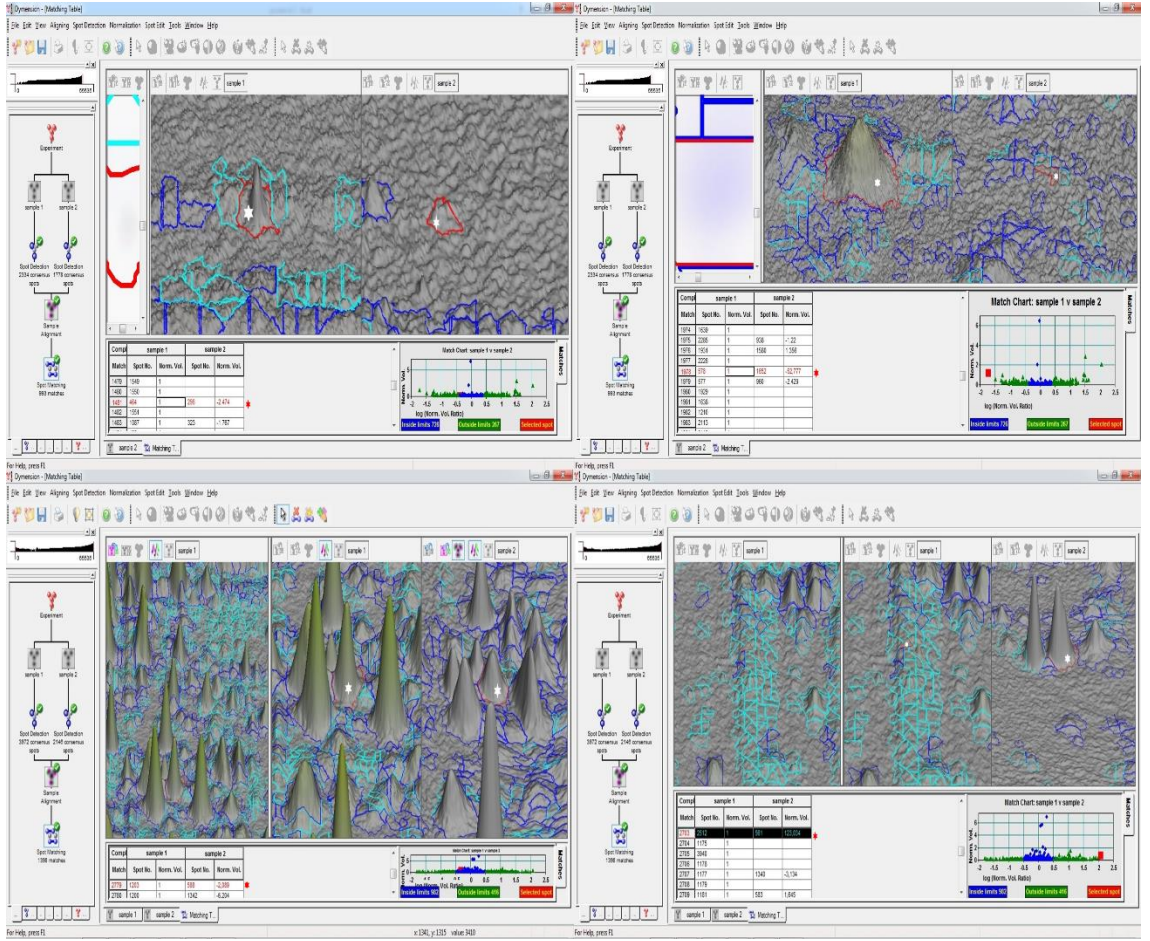
Görüntüleme işlemi sonrasında yapılan karşılaştırmalı proteomik analiz sonucunda elde edilen spotlara normalizasyon işlemi yapıldıktan sonra belirlenen test gruplarındaki ortak spot sayısı program tarafından sayılır. Jeller birbirleri ile karşılaştırılır. Bu karşılaştırmalar sonucunda W3110, *yfhA* ve *yfhK* mutant strainlerinin 3 ünde de 0.1 değerinin altında olan spotlar analiz için dikkate alınmamıştır. Ayrıca 3 lü karşılaştırma yapılırken yabani tip W3110 e göre mutantların spotlarında meydana gelen azalma ve artışlarda 2 kat, 10 kat ve 100 kat fark görülen spot sayıları tespit edilmiştir. Spot yoğunluğunun karşılaştırmalı analiz sonucunda elde edilen spot sayıları aşağıdaki Tablo 7 de verilmiştir.

3.6. *E. coli* W3110 bakterisine Cu ilave edildiğinde meydana gelen değişimler

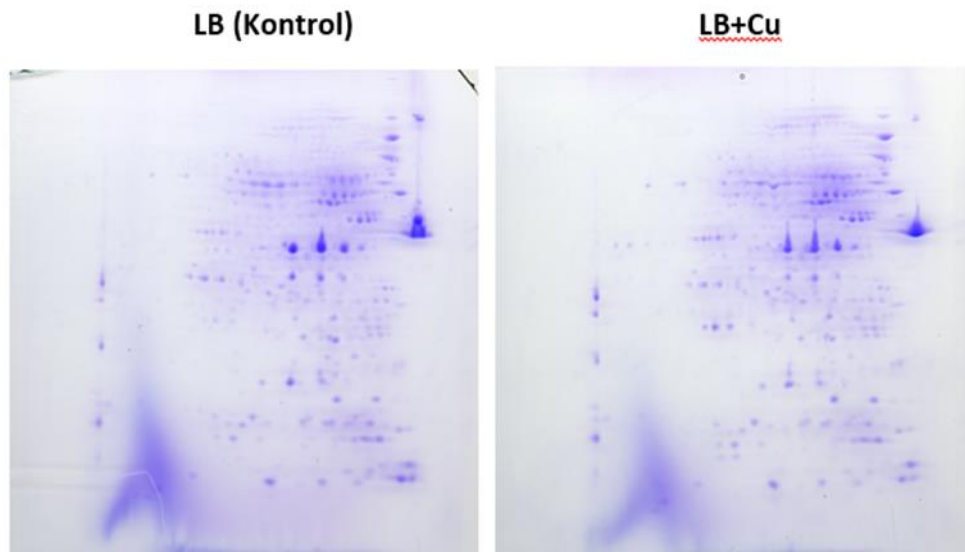
E. coli W3110 bakterisine LB brotta büyütülürken Cu ilave edilerek inkübasyona devam edilmiştir. Elde edilen örneklerden protein analizi yapılmış ve pH 3-10 (Şekil 11) ve pH 4-7 (Şekil 12) stripleri ile yapılarak elde edilen jeller verilmiştir. Analizler yapıldığında 2 kat, 10 kat ve 100 kat değişim görülen spotların sayıları aşağıda Tablo 7 de verilmiştir. Ayrıca spot numaraları da Tablo 8 de verilmiştir. 651 nolu spot 50,085 kat, 1625 nolu spot 38,192 kat, 1727 nolu spot 37,431 kat azalma göstermiştir. Cu ilavesi ile *E. coli* W3110 nun oldukça yüksek artış gösteren genleride olmuştur. Bu genlerin ürünlerinden 1757 nolu spotda 37, 547 kat, 1760 nolu spot ise 16,09 kat artış görülmüştür. Bu spotların proteinleri Cu ile ilgili süreçlerde önemli olduğu ifade edilebilir. Bu protein spotlarının ileriki çalışmalarda MALDİTOF analizleri yapılarak tanımlanması sağlanmalıdır.



Şekil 9. Deneysel Akış Şeması.



Şekil 10. Bir örnek için elde edilen anlamlı spotlara ait karşılaştırmalı üç boyutlu analiz



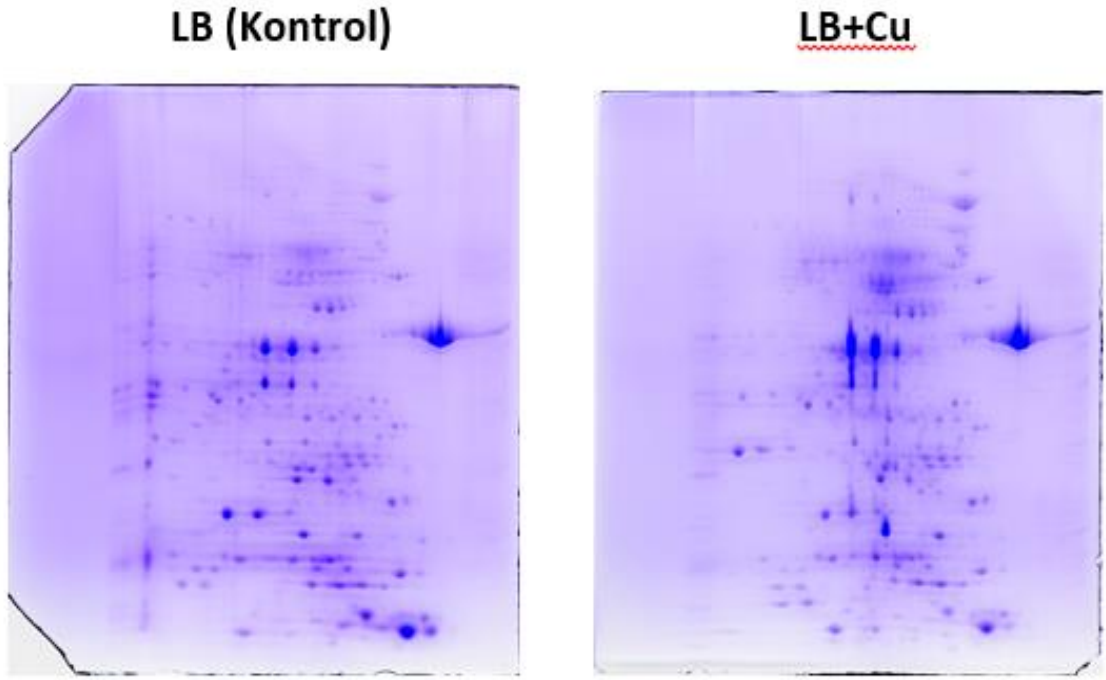
Şekil 11. Yabancıl tip W3110 metelli ve metelsiz örneklerin sitoplazmik proteinlerinin pH 3-10 striplerinden elde edilen jelleri

Tablo 7 Cu ilave edilmemiş *E. coli* W3110 a göre ilave edilmiş *E. coli* W3110 nun farklı olan protein spotlarının sayıları

Sitoplazmik Proteinler pH 3-10						
	2 kat değişen protein sayısı		10 kat değişen protein sayısı		100 kat değişen protein sayısı	
	Azalan	Artan	Azalan	Artan	Azalan	Artan
W3110/W3110 Cu	520	125	28	5	-	-
Membran Proteinler pH 3-10						
	2 kat değişen protein sayısı		10 kat değişen protein sayısı		100 kat değişen protein sayısı	
	Azalan	Artan	Azalan	Artan	Azalan	Artan
W3110/W3110 Cu	118	648	15	128	-	7

Tablo 8. pH 3-10 aralığında Sitoplazmik proteinlerin spot numaraları ve değişim oranları

spot numarası	değişim	spot numarası	değişim
651	-50,085	1442	-14,749
1625	-38,192	1606	-14,447
1727	-37,431	1658	-13,264
1680	-23,144	796	-12,394
1002	-22,734	416	-11,992
158	-22,671	593	-11,75
1681	-22,558	1083	-11,379
321	-19,746	1095	-11,113
1758	-19,157	801	-10,645
1159	-18,244	1574	-10,342
1473	-18,173	1496	-10,1
322	-18,001	669	10,744
1457	-16,503	922	13,062
1670	-16,296	1138	15,857
649	-15,681	1760	16,09
251	-15,16	1757	37,547
787	-15,131		

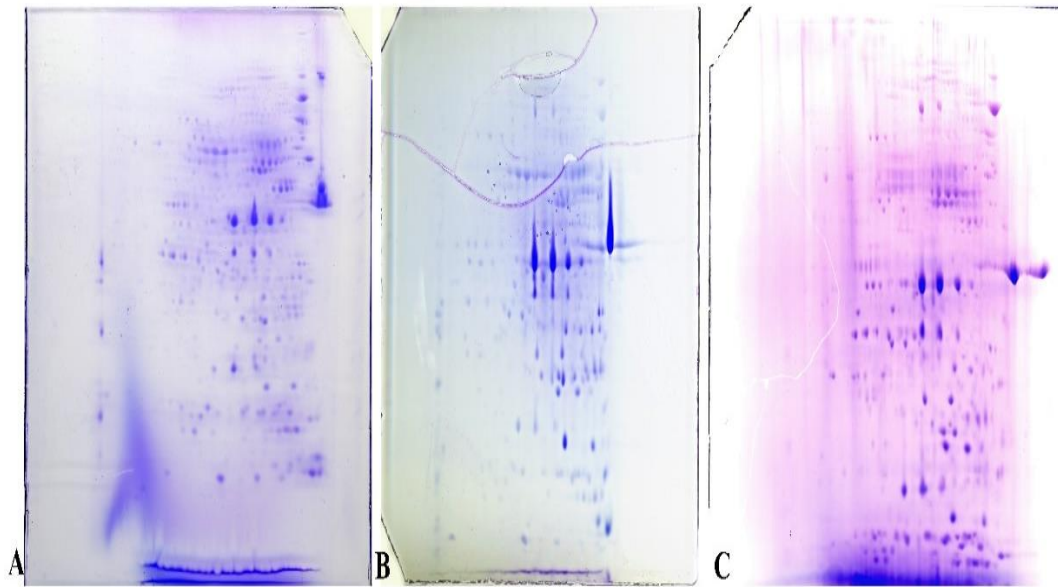


Şekil 12. Yabani tip W3110 metalli ve metallsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 4-7 jelleri

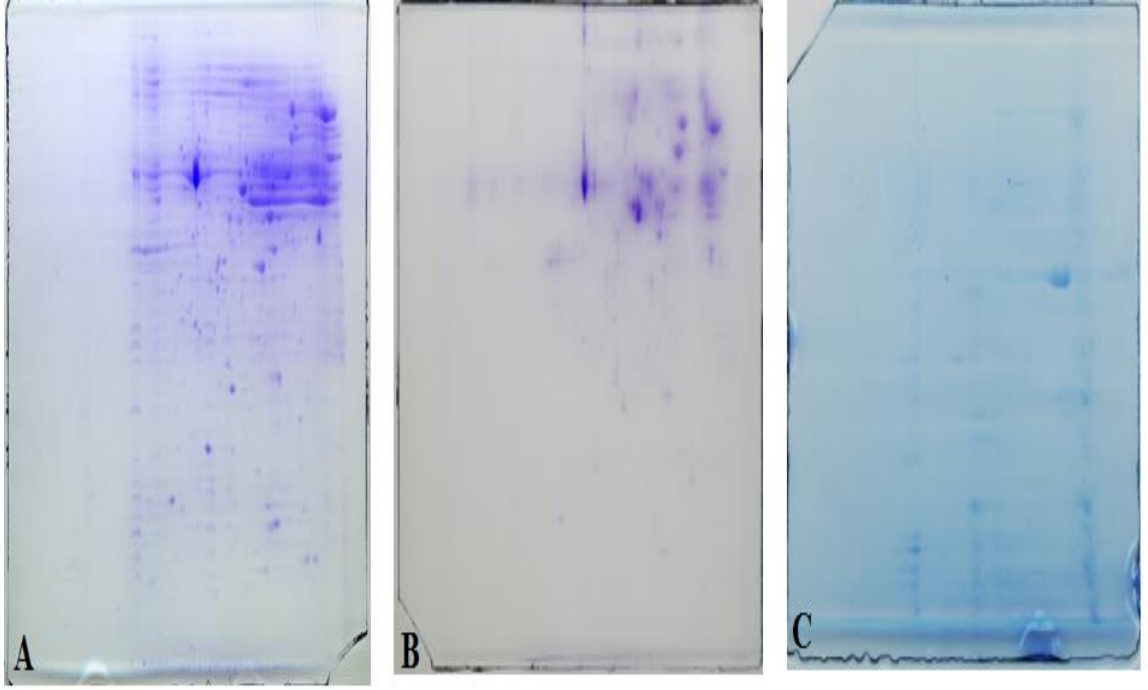
3.7. *E. coli* W3110, *yfhA* ve *yfhK* mutant strainlerin Cu varlığında veya Cu ilave edilmeyen örneklerdeki protein analizi

Cu ilave edilmiş W3110, *yfhA* ve *yfhK* örneklerinin karşılaştırmalı analizi yapılmıştır.

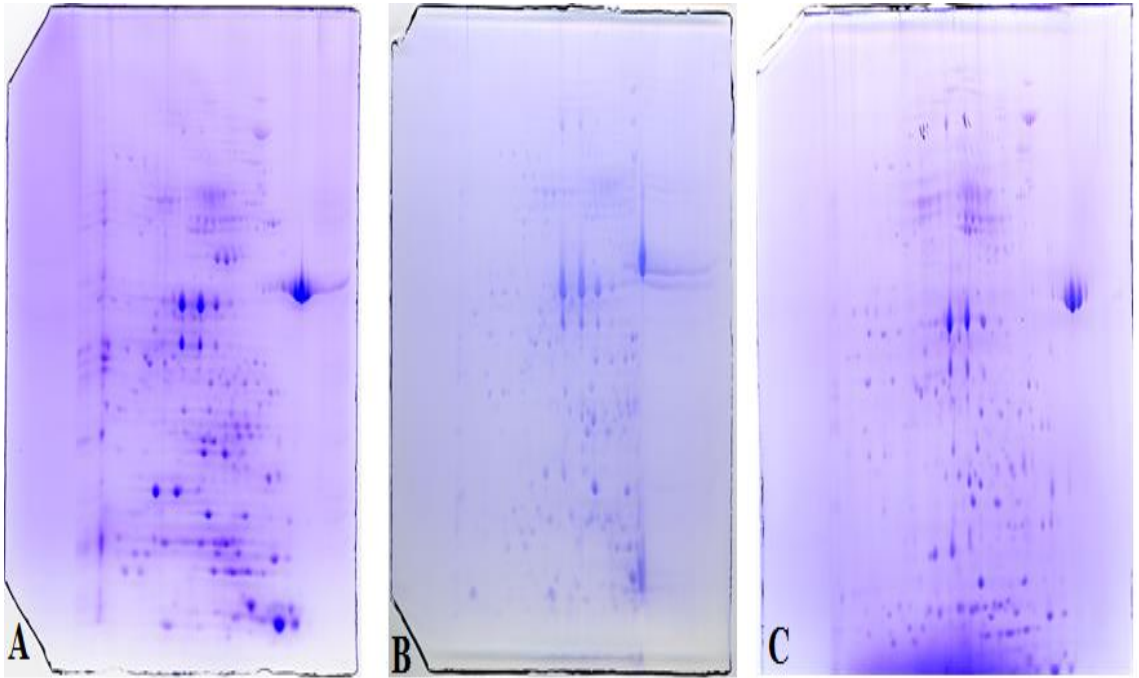
Jeller aşağıdaki Şekil 13-24 de verilmiştir.



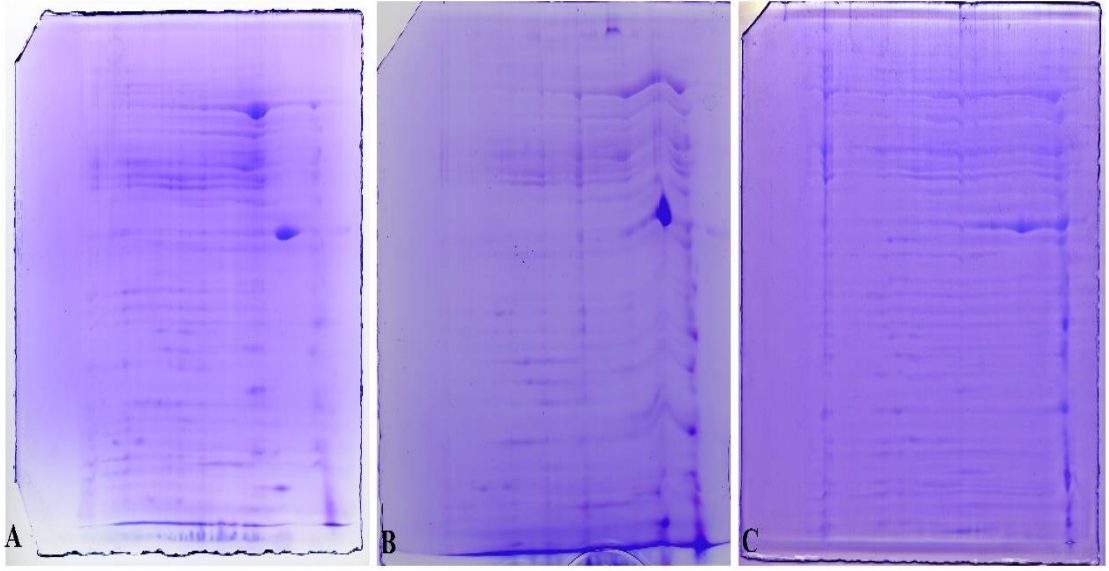
Şekil 13. pH 3-10 striplerde metallsiz sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B.*yfhA::km*, C. *yfhK::km*



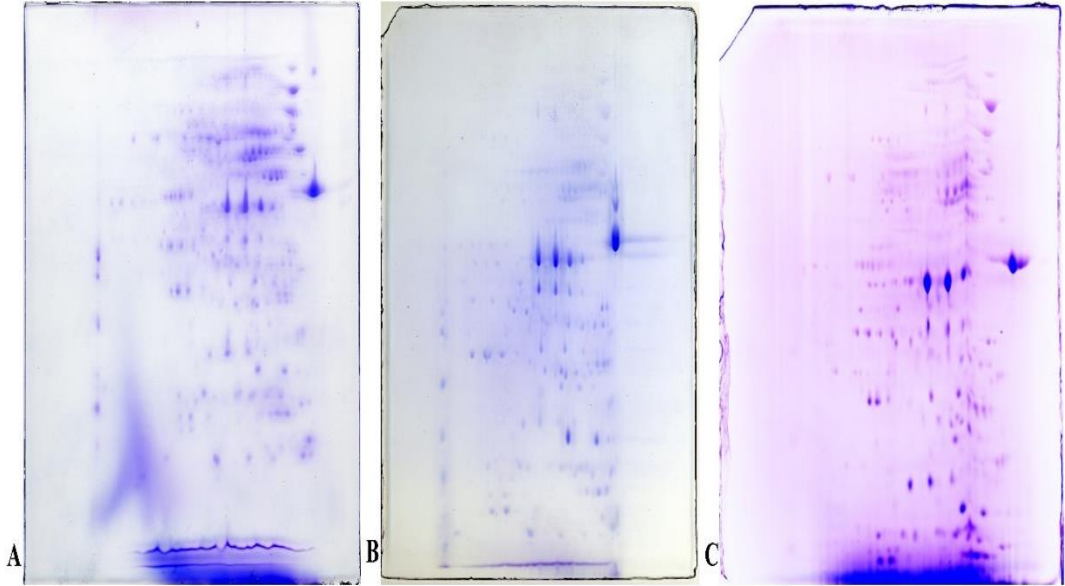
Şekil 14. pH 3-10 striplerde metalsız membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B.*yfhA::km*, C. *yfhK::km*



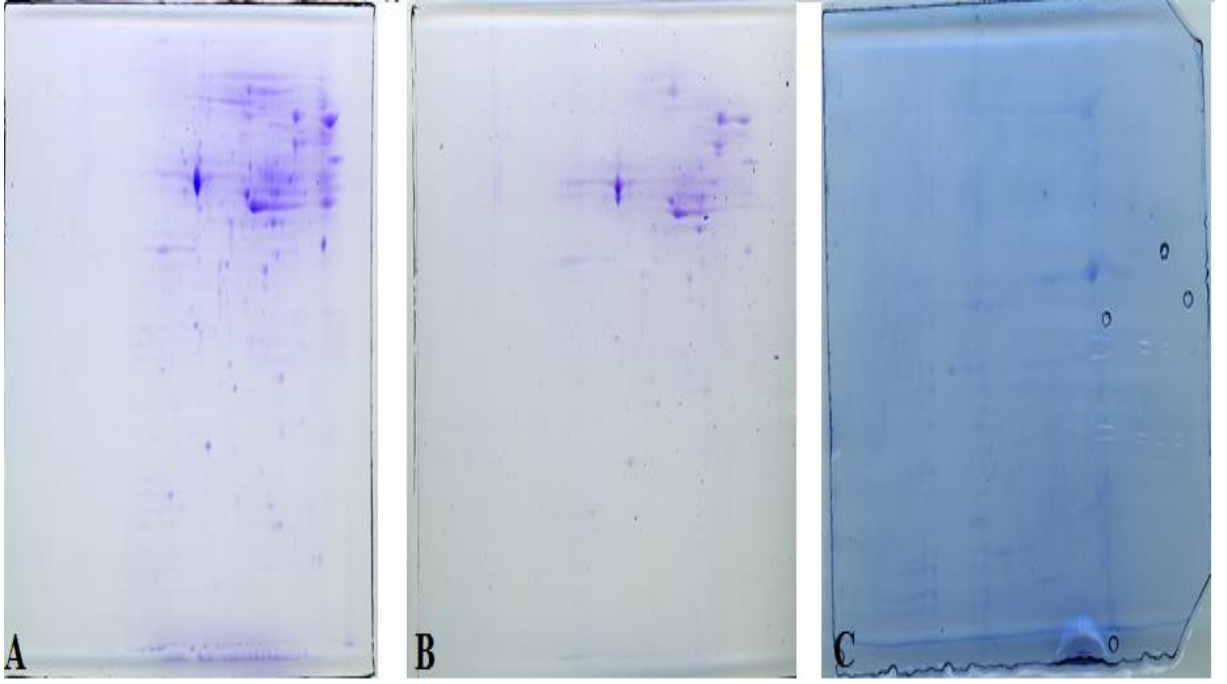
Şekil 15. pH 4-7 striplerde metalsız sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B.*yfhA::km*, C. *yfhK::km*



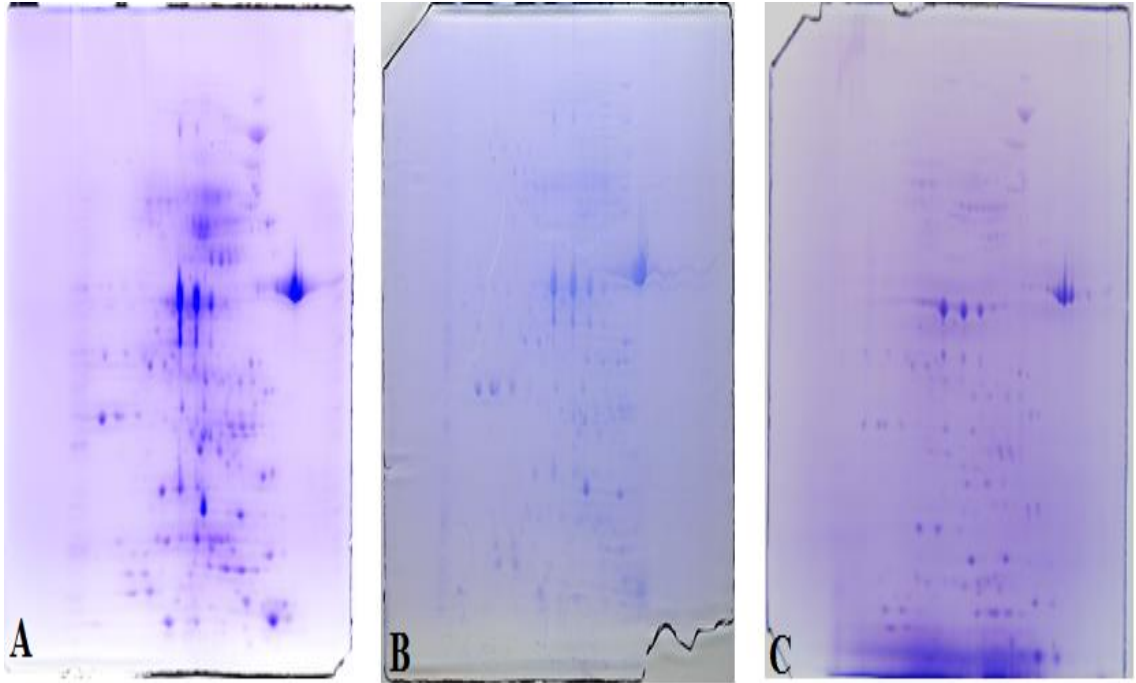
Şekil 16. pH 4-7 striplerde metalsiz membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B.*yfhA::km*, C. *yfhK::km*



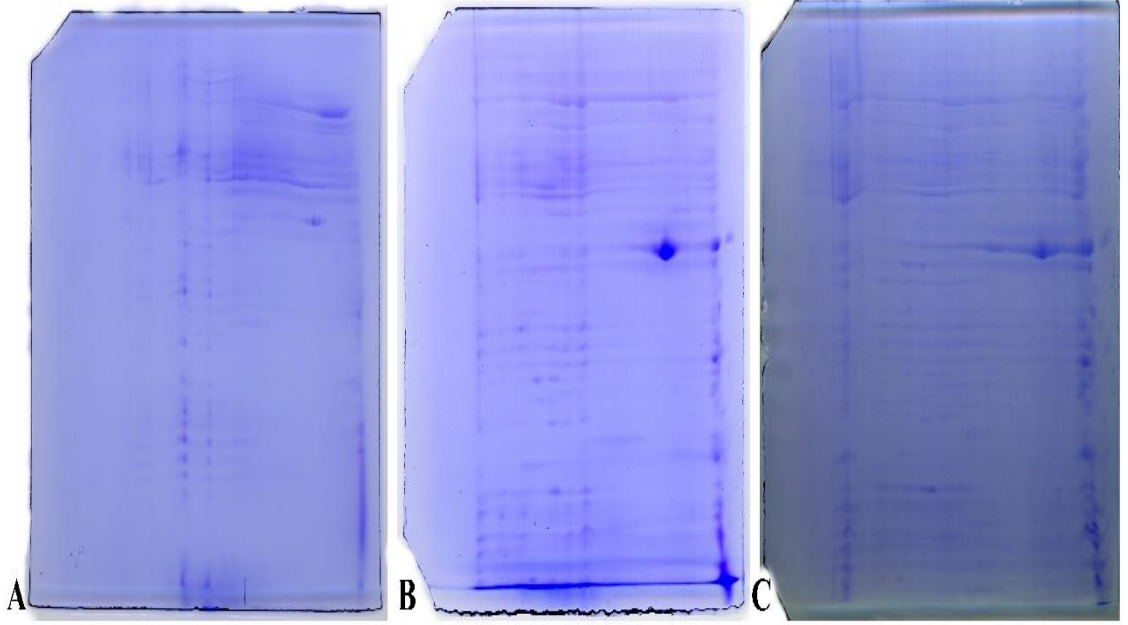
Şekil 17. Cu metali ilave edilmiş, pH 3-10 striplerde sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A. *E. coli* W3110, B.*yfhA::km*, C. *yfhK::km*



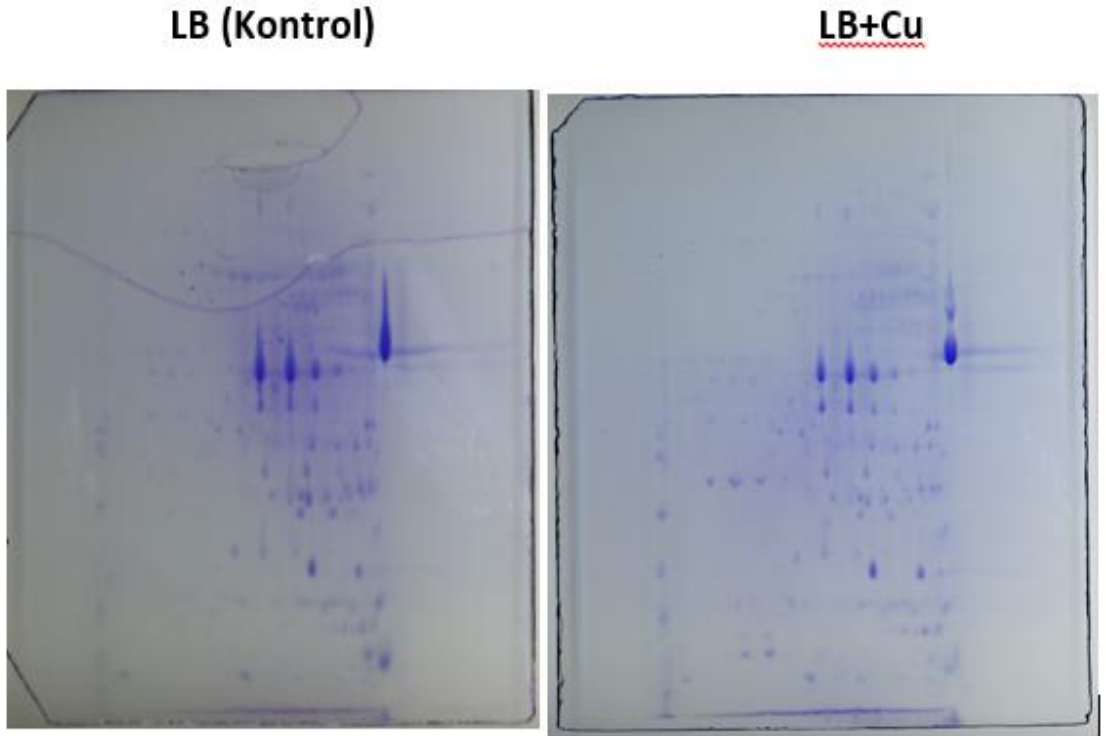
Şekil 18. Cu metali ilave edilmiş, pH 3-10 striplerde membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A. *E. coli* W3110, B. *yfhA::km*, C. *yfhK::km*



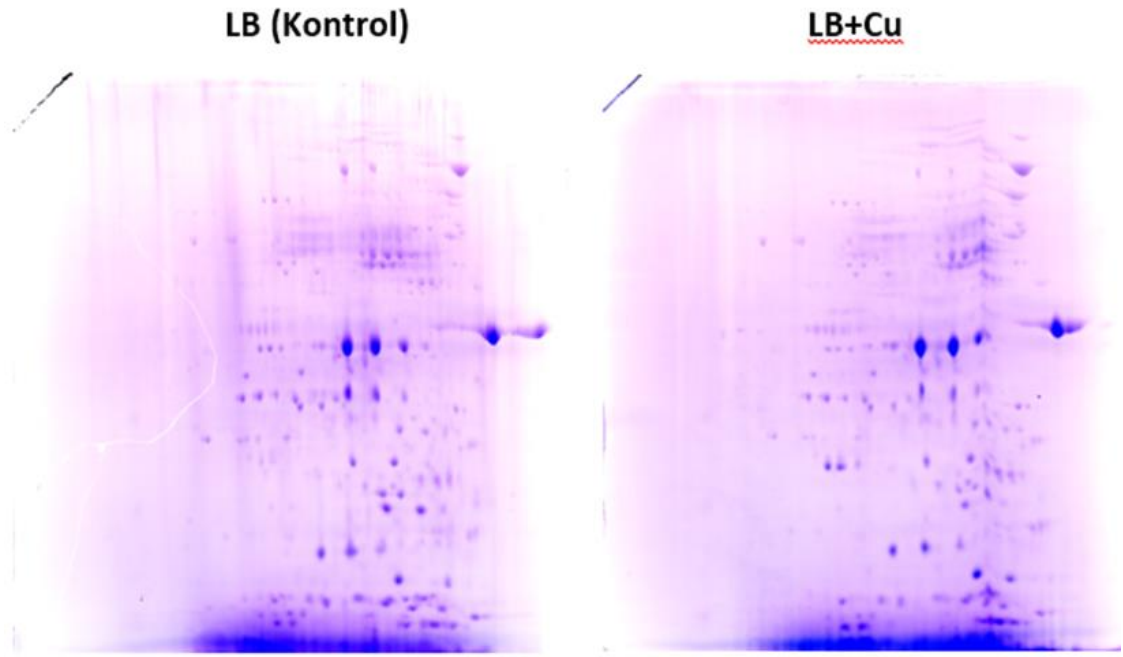
Şekil 19. Cu metali ilave edilmiş, pH 4-7 striplerde sitoplazmik proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A. Yabani tip W3110, B. *yfhA::km*, C. *yfhK::km*



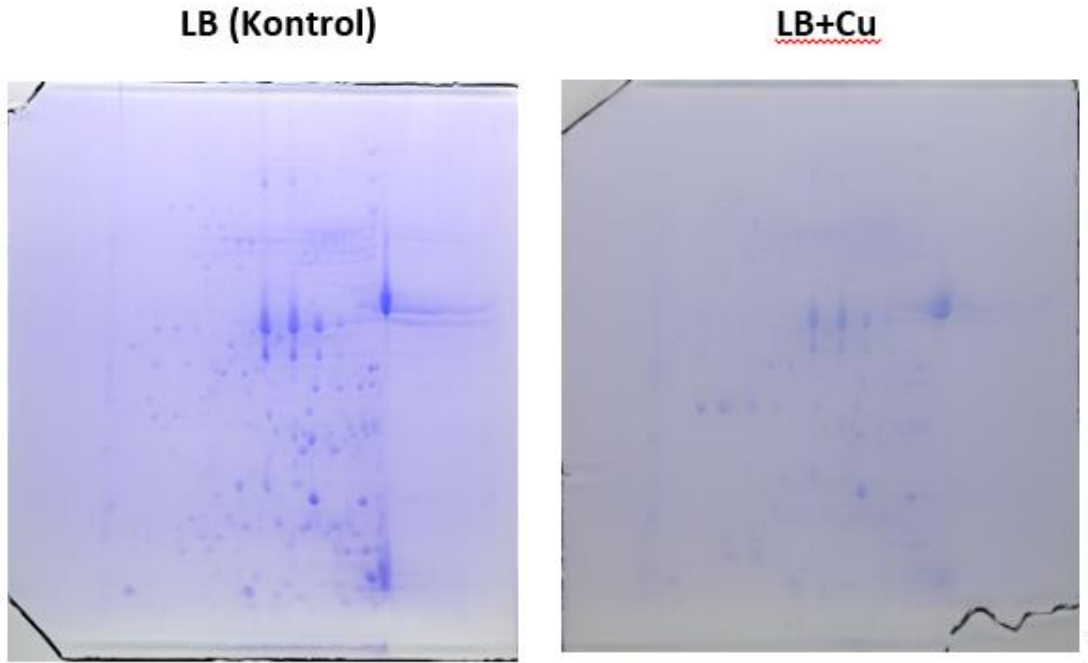
Şekil 20. Cu metali ilave edilmiş, pH 4-7 striplerde membran proteinlerinin 2D jel elektroforez sonuçları. A.Yabani tip W3110, B.*yfhA::km*, C. *yfhK::km*



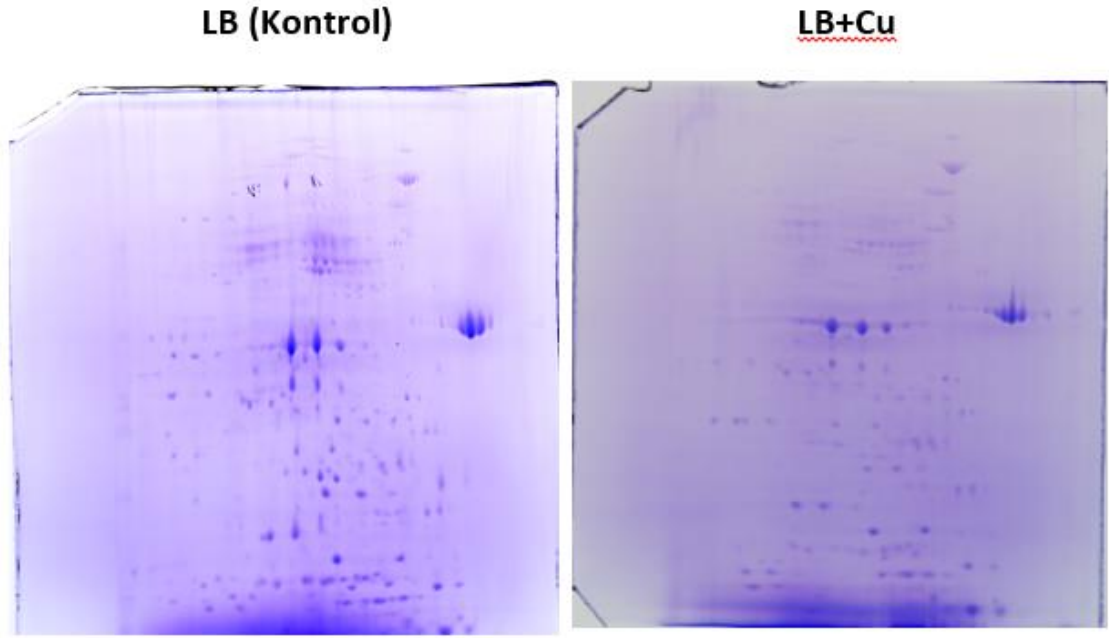
Şekil 21. *yfhA::km* mutantının metalli ve metalsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 3-10 jelleri



Şekil 22. *yfhK::km* mutantının metalli ve metallsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 3-10 jelleri



Şekil 23. *yfhA::km* mutantının metalli ve metallsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH 4-7 jelleri



Şekil 24. *yfhK::km* mutantının metali ve metalsiz örneklerinden elde edilen sitoplazmik proteinlerin pH4-7 jelleri

Tablo 9. Bakır metali varlığında sitoplazmik proteinlerin pH 3-10 aralığındaki spot analiz sonuçları

Sitoplazmik Proteinler pH 3-10									
				2 kat değişen protein sayısı		10 kat değişen protein sayısı		100 kat değişim	
	0.1 üzerinde	Artan	Azalan	Azalan	Artan	Azalan	Artan	Azalan	Artan
W3110	173								
<i>yfhA::km</i>	645	411	234	135	304	28	94	-	7
<i>yfhK::km</i>	938	658	280	142	434	16	99	-	5

Yukarıdaki Tablo 9 da görüldüğü üzere *yfhK* geni mutant Cu ile muamele edildiğinde Cu ile muamele edilmiş yabani tipteki sentez oranına göre 742 nolu spot 122,90, 1208 nolu spot 141,92 kat, 3614 nolu spot 192,63, ve 4877 nolu spot ise 205,93 katlık artış göstermiştir. Aynı mutantta 499 nolu spot 47,82 kat, 596 nolu spot 35,13 kat, 2190 nolu spot 31,08 kat, 1047 nolu spot 29,58 kat ve 2743 nolu spot ise 22.06 katlık azalma ile en fazla azalan 5 protein spotu olarak belirlenmiştir. Bu spotların ilerideki çalışmalarda MALDİTOF analizlerinin yapılarak tanımlanması gerekmektedir. Jel analizi sonucunda Cu ilave edilmiş örneklerde W3110 yabani tipteki protein miktarına göre *yfhA* ve *yfhK* mutantında 10 kat fark olan spotlar ve yoğunlukları Tablo 10 ve 11 de verilmiştir.

Tablo 10. Jel analizi sonucunda Cu ilave edilmiş örneklerde W3110 yabani tipteki protein miktarına göre *yfhA* ve *yfhK* mutantında 10 kat fark olan spotlar ve yoğunlukları (1. *E. coli* W3110 Cu ilave edilmiş örneklerindeki spot numarası, 2 ve 3 mutantların spot yoğunlukları)

1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
w3110	yfhA	w3110	yfhA	w3110	yfhA	w3110	yfhA	W3110	yfhA	W3110	yfhK	W3110	yfhK	W3110	yfhK	W3110	yfhK	W3110	yfhK
1309	-66,52	4119	10,35	2579	14,47	3410	27,08	4193	66	4862	10,02	2192	12,68	2581	19,81	582	45,86	499	-47,82
178	-51,10	3489	10,51	2445	14,77	571	27,19	4644	78,64	1113	10,02	565	12,82	2442	19,81	4046	46,34	596	-35,13
389	-44,44	1171	10,59	724	14,86	4505	27,79	1066	89,43	2508	10,10	4792	13,11	4152	20,54	266	48,34	2190	-31,08
2065	-30,79	582	10,70	1986	14,86	3364	28,12	937	106,28	744	10,12	3416	13,79	4637	20,83	1120	59,24	1047	-29,58
849	-30,31	2347	10,85	560	15,65	2396	28,89	4507	106,36	2579	10,12	2135	13,88	869	21,66	2500	64,80	2743	-22,06
399	-29,88	2896	10,86	500	15,71	4044	29,58	3762	106,90	305	10,27	2406	14,01	4635	22,88	2474	67,46	429	-21,37
1133	-21,57	421	10,96	440	16,52	284	31,51	3546	116,19	440	10,28	4527	14,56	4202	23,28	1068	68,11	748	-18,8
766	-20,53	416	11,03	1298	16,82	3514	32,01	1358	171,49	3422	10,31	1035	14,92	3487	23,73	4745	78,47	249	-17,14
2149	-19,89	2577	11,03	4743	17,07	2531	34,77	1508	196,63	2712	10,43	2614	14,95	2154	24,05	256	82,21	392	-15,43
489	-18,42	563	11,06	875	17,32	4089	35,09	2730	299,97	2680	10,45	2692	15,41	4932	25,04	2281	84,52	81	-14,91
304	-16,88	4532	11,16	3360	17,61	2556	36,01			4119	10,48	4471	15,87	4539	25,62	742	122,90	340	-14,04
385	-15,93	956	11,16	2204	18,19	1419	36,70			2752	10,49	615	15,87	3378	26,62	1208	141,92	389	-13,76
880	-15,36	4198	11,29	460	19,13	3534	37,97			795	10,61	4847	16,02	4556	27,56	3614	192,63	2785	-13,31
1256	-15,28	118	11,71	458	19,68	4447	37,99			4159	10,71	4601	16,13	4480	28,14	2537	195,92	2097	-11,68
989	-14,60	4997	12,16	3704	19,99	3900	39,39			3246	10,77	1071	16,49	4970	30,25	4877	205,93	4776	-10,51
3646	-14,01	2011	12,33	2744	20,47	1459	40,96			3374	10,98	4930	17,14	923	30,47			428	-10,05
2463	-13,65	4187	12,36	3588	20,70	2504	41,71			1092	11,45	2395	17,62	3665	30,84				
427	-13,11	4382	12,54	1285	20,98	4930	42,11			530	11,58	2204	17,62	4793	30,89				
2072	-12,78	3593	12,59	4823	21,38	1071	43,56			363	11,88	3141	17,77	2419	33,34				
428	-12,62	4855	12,86	1968	22,76	3798	46,41			1968	11,96	2322	18,01	3371	33,39				
310	-11,94	784	12,95	1905	23,07	1472	47,11			3724	12,10	2280	18,14	4976	34,56				
761	-11,82	2536	13,27	3411	23,65	895	47,74			922	12,10	1204	18,41	3240	36,17				
296	-11,64	1554	13,37	4820	23,89	3580	49,81			3388	12,16	4091	18,62	3429	36,89				

798	-11,51	2442	13,42	693	24,28	1017	50,31	2245	12,16	2006	18,84	3232	37,21
2078	-11,34	2325	13,85	1549	24,86	1994	55,63	617	12,25	268	19,25	2532	37,68
1101	-10,97	947	14,03	4508	25,07	4196	55,91	3370	12,36	2236	19,49	3239	38,31
392	-10,91	871	14,23	111	25,91	2889	56,02	1091	12,52	1163	19,64	3659	41,35
499	-10,73	4988	14,28	2432	26,01	2158	63,28	957	12,66	506	19,72	4144	44,5

Tablo 11. *E. coli* W3110, *yfhA* ve *yfhK* gen mutantlarının membran proteinlerinin 2D jel analizi

Membran Proteinleri pH 3-10						
	2 kat değişen protein sayısı		10 kat değişen protein sayısı		100 kat değişim	
	Azalan	Artan	Azalan	Artan	Azalan	Artan
W3110						
<i>yfhA::km</i>	481	123	112	5	3	-
<i>yfhK::km</i>	1328	68	429	8	15	-

4- TARTIŞMA SONUÇ

E. coli, Enterobacteriaceae familyasından gram negatif bir bakteridir. Bu organizma, 4288 ORF (Blattner vd. 1997) içeren tamamen dizilenmiş bir genoma sahiptir. Hem genomik hem de proteomik araştırmalarda biyokimyasal ve biyolojik çalışmalar için mükemmel bir model organizmadır.

E. coli W3110 suşunun sahip olduğu 4438 genin yaklaşık olarak 2800 tanesinin doğrudan fonksiyonları belirlenmişken yaklaşık 1600 tanesinin henüz fonksiyonları belirlenmemiştir. Ayrıca genlerin global ağ içerisindeki rolleri yani ikincil, üçüncül görevleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu genlerden bir tanesi de *yfhA/K* iki bileşikli sistemidir. Örneğin *YfhK-A* iki bileşikli fosforlama sisteminin hangi stres faktörü tarafından indüklendiği ve bu sistemin hangi genleri kontrol ettiği hakkında henüz net ve tekrarlı verilere rastlanmamıştır. Bu genlerle son yıllarda yapılan birkaç çalışmada *YfhK-A* iki bileşikli sisteminin şeker metabolizmasında, oksidatif strese ve Fe^{+3} 'ün hücreye alımında bir rolünün olabileceği belirlenmiştir. Birçok proteom veri tabanı, farklı araştırma grupları tarafından oluşturulmuştur (Link vd., 1997; Tonella vd., 1998).

E. coli, değişen çevre koşulları altında bakır kullanımını sağlamak ve bakır toksisitesinden korunmak için Cu homeostazında görevli birden çok regülatör sisteme sahiptir.

Bir hücrenin fizyolojisini anlamak, belirli koşullar altında hangi proteinlerin ifade edildiğini bilmeyi gerektirir. Ekspresyon profili için mRNA incelemesine dayanan güçlü yöntemler yaygın olarak bulunmasına rağmen, mRNA ve protein seviyeleri arasındaki korelasyon doğru bir şekilde yapılamamaktadır. Bu nedenle proteomik çalışmalarda hücresel protein içeriğinin doğrudan incelenmesi gerekir (Tonella vd., 2001). SDS-PAGE yöntemi ile izoelektrik odaklamanın (IEF) bileşimi olan 2D PAGE, kompleks protein karışımlarının

ayrımında kullanılan önemli bir tekniktir. Bu yöntem ilk olarak 1975 yılında O' Farrel (1975) tarafından tanımlanmıştır ve moleküller birinci boyutta izoelektrik noktalarına (pI) göre ikinci boyutta ise molekül ağırlıklarına göre ayrılmaktadırlar. Klasik elektroforezden farklı olarak IEF, proteinlerin bir pH gradyentinde pI değerlerine göre ayrılması prensibine dayanır. Bu yöntemde; pH gradyenti, düşük molekül ağırlıklı amfoterik maddelerin (amfolitler) yardımıyla oluşturulur. Bu moleküller, proteinler gibi bir pI değerine sahip oldukları için uygun pH noktalarında net elektrik yükleri sıfırlanır. Bu sebeple de proteomik çalışmalarda ayırım gücü daha yüksek bir yöntemdir (Günel vd., 2020).

Literatürde birçok çalışmada *E. coli*'nin farklı koşullarda proteomik analizlerinin 2D PAGE yöntemi ile gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Örneğin, benzoik asitle muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinin protein profillerine bakıldığında toplamda 2284 protein spotu belirlenmiş ve 8 jelde benzer 1664 nokta eşleştirilmiştir. Bunlardan ise 146 spotta %10 dan fazla artış ve 163 spotta ise %10 dan fazla azalış tespit etmişlerdir. Farklılık görülen bu spotlar MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmıştır (Yan vd., 2002).

Kabir ve Shimizu (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada aerobik koşullar altında glikoz üzerinde büyütülen *E. coli* ve izositrat dehidrojenaz mutanlığı (*icd*) ile yaptıkları iki boyutlu jel analiz sonuçlarında ortalama olarak, her 2DE jel görüntüsünde yabancı tipte 855 spot belirlenirken *icd* mutanlığında 813 spot tespit etmişlerdir. Bunlardan elde edilen sonuçlarda 21 protein, yabancı tip *E. coli*'ye göre protein seviyesinde sürekli olarak önemli değişiklikler (>1.5 kat fark) sergilediği belirlenmiş ve MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmıştır (Kabir ve Shimizu 2004).

Literatürde yapılan bir başka proteomik analizde ise *E. coli*'nin farklı kültürasyonları arasında BL21, RV308 ve HMS174'ün yüksek glikoz konsantrasyonlarına yanıt olarak protein profillerinde bir fark olup olmadığını saptamaya çalışmışlardır. Transkriptom verilerinin analizi sonucunda üç ana suş arasında ortak olan 3882 genden 347'sinde önemli değişiklik saptanmıştır. Farklı şekilde ifade edilen bu genler, taşıma, demir edinimi ve hareketlilik ile ilgili olduğu belirlenmiştir. Proteom modellerinin araştırılmasına ek olarak yapılan Kütle spektrometresi analizleri sonucunda farklı ifade edilen proteinler de ortaya çıkarılmıştır (Marisch vd., 2013).

Yukarıda belirtildiği gibi *E. coli*'nin iki boyutlu jel analizi ile yapılan farklı proteomik çalışmaları bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda da bakır stresi altındaki yabancı tip *E. coli* W3110 ve *yfhA/K* mutanlığı suşlarında sitoplazmik protein profillerindeki

farklılıklar belirlenmiştir. Geniş aralıkta protein profillerini incelemek için ilk olarak pH 3-10 striplerinde kullanılmıştır. *E. coli* W3110 Cu bulunan ortamdaki protein profilinde 520 spotta azalma, 125 spotta artış belirlenmiştir. Burada en az 2 katlık artış ve azalma olan spotlar dikkate alınmıştır. Dolayısı ile Cu ilavesinin daha çok genlerin ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Mikroorganizmalar, biyokimyasal süreçlerde Fe, Mn, Cu ve Zn metalleri gibi mikro besin maddelerine ihtiyaç duyarlar (Radin vd, 2019a, 2019b; Solórzano vd, 2019). Bunun yanında bu geçiş metalleri mikroorganizmalar için aynı zamanda toksisiteye de sebep olmaktadır (Besold vd, 2016).

Mikroorganizmalar bu toksik etkilere karşı savunma olarak bazı genlerin ekspresyon seviyelerini sürekli değiştirerek yüksek Cu'ya uyum sağlayabilmektedirler (Zhang ve Rainey, 2007). Yapılan çalışmalar, mikroorganizmaların bakır toleransını sağlayan bakır alımı, tutulması, modifikasyonu ve ihraç mekanizmalarına sahip olduğunu göstermiştir (Zhang ve Rainey, 2008; Dziewit vd, 2015; Zapotoczna vd, 2018).

E. coli'de, hücrelerden fazla bakırın detoksifikasyonundan sorumlu iki kromozomal sistem bulunmaktadır. Bu sistemlerden ilki CueR'nin regüle ettiği, copA ve cueO sistemi diğeri ise CusSR iki bileşik fosforlama sistemidir. Bu iki bileşik fosforlama sistemi Cu konsantrasyonuna göre CusCFBA genlerini kontrol ederek hücrenin Cu toksisitesinden korunmasında görev alır. (Munson, vd., 2000; Petersen ve Moller, 2000; Stoyanov, vd., 2001; Grass ve Rensing, 2001; Rensing ve Grass, 2003, Su vd, 2011). CusS/CusR iki bileşenli sistemi periplazmada bakır varlığını algılar ve sitoplazmadan bakırın detoksifikasyonunu CusCFBA efflux pompasını devreye sokarak periplazmadan bakırı uzaklaştırır (Franke, vd., 2003). İki sistemin farklı bakır düzeylerinde çalıştıkları da tespit edilmiştir (Outten, vd., 2001). Düşük ve orta düzeydeki bakır toksisitesinde cue sistemi, yüksek bakır düzeylerinde ise cus sistemi devreye girmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmada da zarf stres cevabını düzenleyen CpxA-CpxR iki bileşik sisteminin bakır homeostatik genlerinin düzenlenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir. (Yamamoto ve Ishihama, 2006). CpxA/CpxR iki bileşik fosforlama sisteminin regülatörü olan CpxR sitoplazmadan bakırın uzaklaştırılmasında CopA'yı etkileyen bir faktördür.

Ayrıca *E.coli*'nin bazı suşları, bakıra direnç kazandıran plazmid ile kodlanmış genlere sahiptirler. *E. coli*'de *pcoA* ve *pcoB* plazmid üzerinde taşınan bakır genleridir. Bakır duyarlı *pcoA* ve *pcoB*'nin birbiri ile etkileşim halinde olabildiği ancak sadece *pcoA* genine

sahip olması durumunda ise çok daha düşük bir gen ekspresyonu ile bakıra direnç kazandırdığı öngörülmektedir (Rensing ve Grass, 2003).

E. coli, değişen çevre koşulları altında bakır kullanımını sağlamak ve bakır toksisitesinden korunmak için çoklu koruyucu sistemlere sahiptir. Dış membran boyunca metallerin taşınımı demir-siderefor kompleksleri ya da porin proteinleri arasında kolaylaştırılmış difüzyonla olabileceği düşünülmektedir (Stenberg, vd., 2005). Gram negatif bakterilerde OmpF, OmpC porinleri ve bunlara benzer yapılar periplazmaya metal katyonların taşınmasından sorumlu olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada *E. coli* mutant suşunda *ompC* ekspresyonunun azalması ile bakıra karşı duyarlılığın arttığı belirlenmiştir (Egler, vd., 2005).

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

Bununla birlikte, deniz hayvanlarında ve insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilen *V. alginolyticus*'ta bakır direnç mekanizmasının anlaşılması çok sınırlıdır (Guo vd, 2018). *V. alginolyticus* ile yapılan bir çalışmada CusSR, CusCFBA ve copB'nin bakır direnci ve virülans regülasyonundaki işlevlerini ve ilgili mekanizmalarının doğrulanması amaçlanmıştır.

Bunun için Cu stresi varlığında *cusSR*, *cusCFBA*, *copB* ve EC 3.6.3.4 ekspresyon seviyelerine bakılmış ve sekiz genin tamamının önemli ölçüde pozitif regüle edildiği belirlenmiştir. Ayrıca her bir bakır direnç geni için nakavt suşlar oluşturulmuş ve bunların ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile tespit edilmiştir. CusS, cusR, cusC, cusF, cusB, cusA, copB ve [EC: 3.6.3.4] 'ün nakavt suşlarında önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca CusS, cusR, cusC, cusF, cusB, cusA, copB ve [EC: 3.6.3.4] 'ün virülans (yapışma, hemoliz, biyofilm oluşumu ve motilite) etkileri de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda *cusS* ve *cusR*'nin sessizliğinin bu dört virülans fenotipi üzerinde anlamlı pozitif etkilere sahip

olduğunu bulunmuştur. Ayrıca hayatta kalma oranı analizi de *cusS* ve *cusR*'nin yokluğunun *V. alginolyticus*'un virülansı üzerinde önemli pozitif etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar *CusS-CusR*'nin virülansın negatif regülasyonuna katıldığını ve çeşitli virülans genlerinin regülasyonunda rol oynayabileceğini gösterdi. Ayrıca, *copB* geni susturulduğunda, biyofilm oluşumunun azalması, *copB*'nin biyofilm oluşumunun düzenleyici mekanizması ile pozitif ilişkili olduğunu düşündürmüştür.

cusR (*lacZ*) mutant suşu ile beta galaktosidaz testleri de yapılmış ve *cusCFBA* genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca önceki RNA sekans sonuçlarına dayanarak, *ampD*, *ccoP*, *pilN*, *ompA*, *lptC*, *pykF*, *purN*, *ectC*, *pflD*, *htpG* ve *feoA* dahil olmak üzere bakıra duyarlı genler belirlenmiş bu genlerin muhtemelen *CusR* tarafından düzenlendiği düşünülmüştür. Bunu aydınlatmak için, qRT-PCR yapılmıştır. Bu genlerin *CusR* tarafından düzenlenip düzenlenmediğini daha fazla doğrulamak için *CusR* mutant suşu ile *LacZ* aktiviteleri de bakılmıştır. *LacZ* aktivite sonuçlarında, *pflD* ve *feoA* önemli ölçüde azalırken, diğer genler arttı (He vd., 2021).

Bakır metali varlığında yabancı tip ve mutantların protein profillerini analiz ettiğimizde; *yfhA* mutant suşu analiz sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuna göre 135'i azalan 304 ü artan olmak üzere toplamda 439 protein spotunda en az 2 katlık fark gözlenmiştir. *yfhK* mutant suşunda ise yabancı tip W3110 a göre 142 azalan, 434 artan en az 2 katlık fark görülen toplamda 576 anlamlı protein spotu tespit edilmiştir. Protein spotlarının yoğunluğu daha çok asidik ve nötr tarafta olduğu için çalışmamızda ayrıca pH 4-7 stripleri kullanılarak dar aralıkta da protein profilleri analiz edilmiştir. Yukarıda Cu ile ilgili direnç sistemlerinden hangilerini nasıl etkilediğinin anlaşılabilmesi için spotların MALDİTOF ile tanımlanması gerekmektedir. Şu anda *yfhA* ve *yfhK* iki bileşikli sistemin Cu ile ilişkili hangi genleri nasıl kontrol ettiğini belirleyememekteyiz.

Projemizin bütçe bakımından yetersizliğinden çalışmamızda belirlenen spotların tanımlanması yapılamamıştır. Çalışma sürecinde dolar kurundaki ciddi artışlar planlanan bazı çalışmalarda yaşanan süreçlerin telafi edilmesine engel olmuştur. Özellikle komplemenet suşlar ile yapılması gereken deneyler bütçe yetersizliği ve zaman problemi nedeniyle sağlıklı yapılamamıştır. Komplementlerle deneyler yapılmış ancak istenilen sonuçların alınması mümkün olmamıştır. Plazmitlerdeki indüklenbilir promotörün indüklenmediği belirlenmiştir. Projenin ilk yılında yaklaşık 1.5 yıl laboratuvarımızda yeni alınan 2D sisteminin optimizasyonu için zaman harcanmıştır. Yaşanılan aksaklıklar jellerin

elde edilmesinde ortaya çıkan problemler nedeniyle hem zaman kaybına hem de malzeme harcanmasına neden olmuştur. Ancak sunulan jellerde görüldüğü üzere metod oturtulmuş ve prosedür işletilmiştir. Bu açıdan laboratuvarımız ve üniversitemiz moleküler tekniklerden birisini yapabilir hale gelmiştir. Bu projenin en temel amaçlarından biriside bu metodun laboratuvarımızda yapılabilir hale gelmesidir. Çalışma sonucunda *yfhK* ve *yfhA* genlerinin nakavt edildiğinde Cu varlığında veya yokluğunda bir çok proteinde önemli görevleri olduğu görülmüştür. Bu spotların MALDİTOF analizi yapıldıktan sonra tanımlanması ile bu genlerin hangi genleri kontrol ettiği ortaya konulmuş olacaktır. Bu nedenle bu çalışmamız, MALDİ-TOF veya LC/LC gibi kütle spektrometreleri yöntemleriyle anlamlı proteinlerin tanımlanmasını içeren bir sonraki çalışmalar için zemin oluşturmuştur.

5. KAYNAKLAR

Baek, J.H. and Lee, S.Y., 2007. “Transcriptome analysis of phosphate starvation response in *Escherichia coli*”, J. Microbiol. Biotechnol., 17(2): 244-252.

Baranova, N. ve Nikaido, H. 2002. “The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate”, J. Bacteriol. 184, 4168–4176.

Bearson, S. M., Albrecht, J. A. ve Gunsalus, R. P. 2002. “Oxygen and nitrate-dependent regulation of dmsABC operon expression in *Escherichia coli*: sites for Fnr and NarL protein interactions”, BMC Microbiol. 2, 13.

Besold, A.N., Culbertson, E.M., Culotta, V.C., 2016. The yin and Yang of copper during infection. J. Biol. Inorg. Chem. 21, 137–144.

Blakesley, R.W. ve Boezi, J.A. 1977. “A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250”, Anal. Biochem. 82(2), 580-2.

Blattner, F. R., Plunkett, G. III, Bloch, C. A., Perna, N. T. et al., Science 1997, 277, 1453–1474.

Cariss, S.J., Tayler, A.E. ve Avison, M.B. 2008. “Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*”, J. Bacteriol. 190(11), 3930-3939.

Danese, P. N. ve Silhavy, T. J. 1998. “CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon”, J. Bacteriol. 180, 831–839.

Danese, P. N., Snyder, W. B. Cosma, C. L. Davis, L. J. ve Silhavy, T. J. 1995. “The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription

of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP”, *Genes Dev.* 9(4), 387-98.

Dziewit, L., Pyzik, A., Szuplewska, M., Matlakowska, R., Mielnicki, S., Wibberg, D., 2015. Diversity and role of plasmids in adaptation of bacteria inhabiting the Lubin copper mine in Poland, an environment rich in heavy metals. *Front. Microbiol.* 6, 152.

Egger, L. A., Park, H. and Inouye, M., 1997. "Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay", *Genes Cells*, 2: 167–184.

Egler, M., Grosse, C., Grass, G., and Nies, H. D., 2005 “Role of the Extracytoplasmic Function Protein Family Sigma Factor RpoE in Metal Resistance of *Escherichia coli*”, *Journal of Bacteriology*, 7: 2297–2307.

Flamez, C., Ricard, I., Arafah, S., Simonet, M., Marceau M., 2007. "Phenotypic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* 32777 response regulator mutants: New insights into two- component system regulon plasticity in bacteria", *International Journal of Medical Microbiology*, 298; 193-207.

Forst, S., Delgado, J. Rampersaud, A. ve Inouye, M. 1990. “In vivo phosphorylation of OmpR, the transcription activator of the ompF and ompC genes in *Escherichia coli*”, *J. Bacteriol.* 172, 3473–3477.

Foster W. J., 1991."Salmonella Acid Shock Proteins Are Required for the Adaptive Acid Tolerance Response", *Journal of Bacteriology*, 173 (21): 6896-6902.

Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D. H., 2003. "Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of *Escherichia coli* " *Journal of Bacteriology*, 3804–3812.

Fried, L., Behr, S. ve Jung, K. 2013. "Identification of a Target Gene and Activating Stimulus for the YpdA/YpdB Histidine Kinase/Response Regulator System in *Escherichia coli* ", *J. Bacteriol.* 195(4), 807-815.

Gassel, M., Mollenkamp, T. Puppe, W. ve Altendorf, K. 1999. “The KdpF subunit is part of the K(+)-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex in vitro”, *J. Biol. Chem.* 274, 37901–37907.

Golby, P., Davies, S. Kelly, D. J. Guest, J. R. ve Andrews, S. C. 1999. “Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C4-dicarboxylates in *Escherichia coli* ”, *J. Bacteriol.* 181, 1238–1248.

Göpel Y., Khan M. A., Görke B., 2014. "Post-transcriptional control of the key enzyme for cell envelope synthesis by a base-pairing small RNA, an RNase adaptor protein, and a small RNA mimic", *RNA Biology* 11:5, Landes Bioscience, 433-442.

Göpel Y., Lüttmann D., Heroven A. K., Reichenbach B., Dersch P., Görke B., 2011."Common and Divergent Features in Transcriptional Control of The Homologous

Small RNAs GlmY and GlmZ in Enterobacteriaceae", *Nucleic Acids Research*, 39 (4): 1294–1309.

Grant, W. D., Long, P. E., 1981. "Environmental Microbiology" Thomson Litho Ltd., Glasgow/Scotland, 215.

Grass G., Rensing C., "CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli* ", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286: 902–908 (2001).

Groisman, E. A. 2001. "The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ", *J. Bacteriol.* 183, 1835–1842.

Guo, L., Huang, L., Su, Y., Qin, Y., Zhao, L., Yan, Q., 2018. *secA*, *secD*, *secF*, *yajC*, and *yidC* contribute to the adhesion regulation of *Vibrio alginolyticus*. *Microbiologyopen* 7, e00551.

Günel A, Hasançebi S., Yalçın T., Emir M., Demirci Y.E., Dinç M., Güray M. Z. 2020 "Bitki Proteomik Çalışmalarında Kullanılan Yaklaşımlar ve Uygulama Yöntemleri" *BSEU Journal of Science* 7(1), 497-528, 2020. DOI: 10.35193/bseufbd.667838.

Hagiwara, D., Yamashino, T. ve Mizuno, T. 2004. "A genome-wide view of the *Escherichia coli* BasS–BasR two-component system implicated in iron-responses", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1758–1767.

Hea R., Zuo Y., Zhao L., Maa Y., Yana Q., Huang L. "Copper stress by nutritional immunity activates the CusS-CusR twocomponent system that contributes to *Vibrio alginolyticus* anti-host response but affects virulence-related properties" *Aquaculture* Volume 532, 15 February 2021, 736012.

Hoch, J.A., 2000. "Two component and phosphorelay signal transduction", *Current Opinion in Microbiol.* 3: 165-170.

Itou, J., Eguchi, Y. ve Utsumi, R. 2009. "Molecular mechanism of transcriptional cascade initiated by the EvgS/EvgA system in *Escherichia coli* K-12", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 870–878.

Janausch, I.G., Garcia-Moreno, I. ve Uden, G. 2002. "Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase in vitro", *J. Biol. Chem.* 277, 39809 –39814.

Jenkins, L. S. ve Nunn, W. D. 1987. "Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli* : the *ato* system", *J. Bacteriol.* 169, 42–52.

Kabir M.M., Shimizu K. "Metabolic regulation analysis of *icd*-gene knockout *Escherichia coli* based on 2D electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry and enzyme activity measurements" *Appl Microbiol Biotechnol* (2004) 65: 84–96; DOI 10.1007/s00253-004-1627-1.

Kaspar, S. ve Bott, M. 2002. "The sensor kinase CitA (DpiB) of *Escherichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor", Arch. Microbiol. 177, 313–321.

Kato, A., Tanabe, H. ve Utsumi, R. 1999. "Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters", J. Bacteriol. 181, 5516–5520.

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

Kraxenberger, T., Fried, L., Behr, S. ve Jung, K. 2012. "First Insights into the Unexplored Two-Component System YehU/YehT in *Escherichia coli* ", J. Bacteriol. 194(16), 4272-4284.

Langen, G. R., Harper, J. R. Silhavy, T. J. ve Howard, S. P. 2001. "Absence of the outer membrane phospholipase A suppresses the temperature-sensitive phenotype of *Escherichia coli* degP mutants and induces the Cpx and E extracytoplasmic stress responses", J. Bacteriol. 183, 5230–5238.

Larsen A., 2011. Growth Studies of the Copper Sensing Histidine Kinase, Cuss. <https://repository.arizona.edu/handle/10150/144570>.

Laubacher, M.E ve Ades, S.E. 2008. "The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance", J. Bacteriol. 190(6), 2065-74.

Lee, A. I., Delgado, A. ve Gunsalus, R. P. 1999. "Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite", J. Bacteriol. 181, 5309–5316.

Lee, L. J., Barrett, J. A. ve Poole, R. K. 2005. Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc", J. Bacteriol. 187, 1124–1134.

Link, A. J., Robison, K., Church, G. M., Electrophoresis. 1997, 18, 1259–1313.

Luchi, S. and Lin, E. C. C., 1988. "arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways", Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 85: 1888–1892.

Luchi, S. and Lin, E. C. C., 1991. "Adaptation of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression", Cell, 66: 5–7.

Ma, Z., Masuda, N. ve Foster, J. W. 2004. "Characterization of EvgAS, YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*", J. Bacteriol. 186, 7378–7389.

Marisch K, Bayer K, Scharl T, Mairhofer J, Krempl PM, et al. (2013) A Comparative Analysis of Industrial *Escherichia coli* K-12 and B Strains in High-Glucose.

Masuda, N. ve Church, G. M. 2002. “*Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA”, J. Bacteriol. 184, 6225–6234.

Masuda, N. ve Church, G. M. 2003. “Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*”, Mol. Microbiol. 48, 699–712.

Moat, G. A., Foster, W. J. and Spector P. M., 2002. “Microbial Stress Responses” Microbial Physiology, Wiley-Liss, Inc., New York, 582-585.

Munson G., Lam D., Outten F. W., O’halloran T. V., "Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12", Journal of Bacteriology, 182 (20): 5864–5871 (2000).

Munson, G. P., Lam, D. L. Outten, F. W. ve O’Halloran, T. V. 2000. “Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12”, J. Bacteriol. 182, 5864–5871.

Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T. ve Yamaguchi, A. 2002. “The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC”, J. Bacteriol. 184, 4161–4167.

Noll, M., Petrukhin, K. ve Lutsenko, S. 1998. “Identification of a novel transcription regulator from *Proteus mirabilis*, PMTR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in *Escherichia coli*”, J. Biol. Chem. 273, 21393-21401.

Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K. ve Inouye, M. 1986. “Interaction of a transcriptional activator, OmpR, with reciprocally osmoregulated genes, ompF and ompC, of *Escherichia coli*”, J. Biol. Chem. 261 (36), 17113-17119.

O’Farrell, T.P. 1975. “High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins”, J. Biol. Chem. 250(10), 4007-21.

Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B. L., Mori, H. ve Mizuno, T. 2002. “Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants *Escherichia coli* K-12”, Mol. Microbiol. 46, 281–291.

Otto, K. ve Silhavy, T.J. 2002. “Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 2287–2292.

Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O’Halloran T. V., "The Independent cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*", The Journal of Biological Chemistry, 276 (33): 30670–30677 (2001).

Peng S., Tasara T., Hummerjohann J., Stephan O., 2011. "An Overview of Molecular Stress Response Mechanisms in *Escherichia coli* Contributing to Survival of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* during Raw Milk Cheese Production", Journal of Food Protection, 74 (5): 849–864.

Pernestig, A. K., Georgellis, D. Romeo, T. Suzuki, K. Tomenius, H. Normark, S. ve Melefors, O. 2003. “The *Escherichia coli* BarA-UvrY two component system is needed for

efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources”, *J. Bacteriol.* 185, 843–853.

Petersen, C., Moller, L. B., "Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator CopR”, *Gene*, 261: 289–298 (2000).

Radin, J.N., Kelliher, J.L., Solórzano, P.K.P., Grim, K.P., Ramezanifard, R., Slauch, J.M., Kehl-Fie, T.E., 2019 a. Metal-independent variants of phosphoglycerate mutase promote resistance to nutritional immunity and retention of glycolysis during infection. *PLoS Pathog.* 15, e1007971.

Radin, J.N., Zhu, J., Brazel, E.B., McDevitt, C.A., Kehl-Fie, T.E., 2019b. Synergy between nutritional immunity and independent host defenses contributes to the importance of the MntABC manganese transporter during *Staphylococcus aureus* infection. *Infect. Immun.* 87 e00642-00618.

Reichenbach B., Göpel Y., Görke B., 2009. "Dual Control by The Perfectly Overlapping σ_{54} -and σ_{70} Promoters Adjust Small RNA GlmY Expression to Different Environmental Signals", *Molecular Microbiology*, 74 (5): 1054-1070.

Rensing C. and Grass G., 2003. "Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment" *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 197-213.

Russo, F. D., Slauch, J. M., ve Silhavy, T. J. 1993. "Mutations that affect separate functions of OmpR the phosphorylated regulator of porin transcription in *Escherichia coli* ", *J. Mol. Biol.* 231, 261-273.

Saito, H., and Kobayashi, H., 2003. "Bacterial responses to alkaline stress", Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675.

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

Sigman, D. S., Kuwabara, M. D. Chen, C. H., ve Bruice, T. W. 1991. "Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper in study of protein-DNA interactions", *Methods Enzymol.* 208, 414–433.

Snyder, W. B., Davis, L. J. Danese, P. N. Cosma, C. L., Silhavy, T. J. 1995. "Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway", *J. Bacteriol.* 177, 4216–4223.

Sperandio, V., Torres, A. G., Kaper, J. B. 2002. "Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli* ", *Mol. Microbiol.* 43, 809–821.

Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, L. S., Robinson, V. C., Ilag, L. L., Heijne, G., and Daley, O. D., Protein Complexes of the *Escherichia coli* Cell Envelope, *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (41): 34409–34419 (2005).

Stock, J. B., Ninfa, A. D., Stock, A. M., 1989. "Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria", *Microbiol. Rev.*, 53: 450-490.

Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., Brown, N.L., "CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA", *Mol Microbiol.*, 39: 502–511 (2001).

Su, C.C., Long, F., Yu, E.W., 2011. The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle. *Protein Sci.* 20, 6–18.

Tonella, L., Hoogland, C., Binz, P. A., Appel, R.D., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C. 2001. "New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation", *Proteomics*, 1, 409-423.

Tonella, L., Walsh, B. J., Sanchez, J.-C., Ou, K. et al., *Electrophoresis* 1998, 19, 1960–1971.

Tsukada, T., Fink, J. S., Mandel, G., Goodman, R. H. 1987. "Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cAMP", *J. Biol. Chem.*, 262, 8743-8747.

Walderhaug, M. O., Polarek, J. W. Voelkner, P. Daniel, J. M. Hesse, J. E. Altendorf, K., Epstein, W. 1992. "KdpD and KdpE, proteins that control expression of the kdpABC operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators", *J. Bacteriol.* 174, 2152–2159.

Wanner, B.L., 1993. "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria", *J. Cell Biochem.*, 51 (1): 47-54.

Wanner, B.L., 1996. "Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*", *Kidney Int.*, 49 (4): 964-7.

Webber, C. A., Kadner, R. J. 1997. "Involvement of the amino-terminal phosphorylation module of UhpA in activation of uhpT transcription in *Escherichia coli*", *Mol. Microbiol.* 24, 1039–1048.

Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, Aiba H, Utsumi R, Ishihama A., 2005. "Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*", *J Biol Chem*, 280 (2): 1448-1456.

Yamamoto K. and Ishihama A. 2005. "Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper" *Molecular Microbiology*, 56 (1): 215–227.

Yamamoto K., Ishihama A., "Characterization of Copper-Inducible Promoters Regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70 (7): 1688-1695 (2006).

Yamamoto, K., Matsumoto, F., Oshima, T., Fujita, N., Ogasawara, N., Ishihama, A. 2008. “Anaerobic regulation of citrate fermentation by CitAB in *Escherichia coli*”, Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(11), 3011-4.

Yan J. X., Devenish A. T., Wait R., Stone T., Lewis S., Fowler S. “Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of *Escherichia coli*” Proteomics 2002, 2, 1682–1698.

Yu, W-B., and Ye, B-C., 2016. “Transcriptional Profiling Analysis of *Bacillus subtilis* in Response to High Levels of Fe³⁺”, Curr Microbiol., (72): 653–662.

Zapotoczna, M., Riboldi, G.P., Moustafa, A.M., Dickson, E., Narechania, A., Morrissey, J.A., 2018. Mobile-genetic-element-encoded hypertolerance to copper protects *Staphylococcus aureus* from killing by host phagocytes. mBio. 9 (e00550-00518).

Zhang, X.X., Rainey, P.B., 2007. The role of a P1-type ATPase from *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in copper homeostasis and plant colonization. Mol. Plant-Microbe Interact. 20, 581–588.

Zhang, X.X., Rainey, P.B., 2008. Regulation of copper homeostasis in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Environ. Microbiol. 10, 3284–3294.

Zientz, E., Bongaerts, J., Uden, G. 1998. “Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system”, J. Bacteriol. 180:5421–5425.

Zimmer, D.P., Soupene, E. Lee, H. L. Wendisch, V. F. Khodursky, A. B. Peter, B. J. Bender, R. A., Kustu, S., 2000. “Nitrogen regulatory protein C controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation”, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 97: 14674–14679.