

ZENGİN BESİYERİNDE BAZI DEZENFEKTAN
ÖZELLİKLİ KİMYASAL MADDELERİN
Escherichia coli'NİN OmpC VE OmpF PORİN
PROTEİN SENTEZ DÜZEYİNE ETKİSİ

Hülya YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim - 2008

**ZENGİN BESİYERİNDE BAZI DEZENFEKTAN ÖZELLİKLİ KİMYASAL
MADDELERİN *Escherichia coli*'NİN OmpC ve OmpF PORİN PROTEİN SENTEZ
DÜZEYİNE ETKİSİ**

Hülya YILMAZ

Dumlupınar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Cihan DARCAN

Ekim - 2008

KABUL ve ONAY SAYFASI

Hülya YILMAZ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı ZENGİN BESİYERİNDE BAZI DEZENFEKTAN ÖZELLİKLİ KİMYASAL MADDELERİN *Escherichia coli*'NİN OmpC ve OmpF PORİN PROTEİN SENTEZ DÜZEYİNE ETKİSİ başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

...../...../2008

Üye : Yrd.Doç. Dr. Cihan DARCAN

Üye : Yrd.Doç.Dr. Ferdağ ÇOLAK

Üye : Yrd. Doç. Dr.Özgen ARAS

Fen Bilimleri Enstitüsün Yönetim Kurulu'nun/...../2008 gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. M. SabriÖZYURT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**ZENGİN BESİYERİNDE BAZI DEZENFEKTAN ÖZELLİKLİ KİMYASAL
MADDELERİN *Escherichia coli*'NİN OmpC ve OmpF PORİN PROTEİN SENTEZ
DÜZEYİNE ETKİSİ**

Hülya YILMAZ

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2008
Tez Danışmanı:Yrd. Doç. Dr. Cihan DARCAN

ÖZET

Escherichia coli'de dış membran porin proteini olan OmpF ve OmpC farklı bir çok çevresel parametre tarafından düzenlenmektedir. Bu çalışmada, zengin besiyerine ilave edilen çeşitli dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin (Formaldehit, Etanol, SDS, Çamaşır suyu, Klor ve H₂O₂) *E. coli*'nin porin protein sentez düzeyine etkisi ve sentez mekanizmasını kontrol eden faktörler araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre çalışılmış olan bütün kimyasal maddeler *E. coli*'nin büyümesini azaltmıştır. Etanol ve sodyum dedosil sülfatın (SDS)negatif etkisi diğer kimyasal maddelerden daha fazla olmuştur. OmpC ve OmpF porin protein sentezi Formaldehit, Etanol, SDS, çamaşır suyu, Klor ve H₂O₂ varlığında değişmiştir. Bu çalışma çamaşır suyu, formaldehit ve klorun OmpC ve OmpF porin protein sentezini etkilediğini gösteren ilk rapordur. RpoS, H-NS, EnvZ ve Acp (pta) ın varlığı veya yokluğunun dezenfektan maddeli stres şartlarında *E.coli*'nin porin protein sentez düzeyinin ayarlanmasında önemli bir rol oynadıkları anlaşılmıştır. Porin protein sentez mekanizmasının daha açık bir şekilde açıklanabilmesi için bu çalışmanın ikili mutantlarla yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dezenfektanlar, Porin proteinleri.

**THE EFFECT OF SOME DISINFECTANT CHEMICALS ON OmpC and OmpF PORIN
PROTEINS SYNTHESIS LEVEL OF *Escherichia coli* IN THE RICH MEDIUM**

Hülya YILMAZ

Department of Biology, Master Degree Thesis, 2008

Thesis supervisor: Assist. Prof. Dr. Cihan DARCAN

SUMMARY

OmpF and OmpC porin which outer membrane protein in *Escherichia coli* are arranged by many different environmental parameters. In this study, the effect of some disinfection chemicals (Formaldehyde, sodium hypochlorite, chlorine, ethanol, SDS and H₂O₂) on *E. coli*'s porin protein synthesis level and the factors that control the synthesis mechanism were determined.

Regarding to results, all of the chemicals reduced the growth of *E. coli*. The negative effect of ethanol and SDS was more pronounced than formaldehyde, sodium hypochlorite, H₂O₂, and chlorine. OmpC and OmpF porin protein synthesis level were changed by formaldehyde, ethanol, SDS, sodium hypochlorite (bleacher), chlorine and H₂O₂. This study is the first report that demonstrates the effect of formaldehyde, chlorine and sodium hypochlorite on *E. coli* OmpC and OmpF porin proteins synthesis level. It is understood that, presence or absence of RpoS, H-NS, EnvZ ve Acp (*pta*) molecules play an important role in *E. coli* porin proteins synthesis under disinfectant stress conditions. But in the future, this study be carried out using double mutants to explain the mechanism of porin protein synthesis more clearly.

Keywords: Disinfetants, Porin proteins.

TEŞEKKÜR

Hepimiz insanoğlu olarak fitratımız gereği birer duygu harmanlarıyız. Hep sonsuzluğu istiyoruz, hep sonsuzluğa özlem duyuyoruz. Belki de sonsuz olan hiçbir Őeye sahip olamadığımız içindir. Mutluluđumuz sonsuz olsun, sevgimiz sonsuz olsun, dostluğumuz sonsuz olsun, başarımız sonsuz olsun gibi isteklerimiz var. Çalışmalarım süresince bu sonsuz isteklerimi en derinden hissettiğim zamanlarda bana destek olan, hiçbir yardımını esirgemeyen ve dahada önemlisi beni hayata hazırlayan sayın danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Cihan DARCAN' a emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hülya YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> 'nin Karakteristik özellikleri	1
1.2. Dış Membranın Genel Özellikleri	1
1.3. Porin Proteinlerinin Genel Özellikleri	2
1.4. Porin Proteinlerinin Anatomik Yapısı	2
1.5. Porin Proteinlerinin Fonksiyonları	3
1.5.1. Porin proteinlerinin açlık stresindeki fonksiyonu	3
1.5.2. Porin proteinlerinin osmotik stresteki fonksiyonu	4
1.5.3. Porin proteinlerinin pH stresindeki fonksiyonu	4
1.5.4. Porin proteinlerinin diğer çevresel şartlardaki fonksiyonları	6
1.5.5. Porin proteinlerinin antibiyotik direncindeki fonksiyonu	7
1.5.6. Porin proteinlerinin reseptör fonksiyonu	8
1.5.7. Pori proteinlerinin patojenitedeki fonksiyonu	8
1.6. OmpC ve OmpF Porin Proteinlerinin Sentez Mekanizması	9
1.6.1. EnvZ-OmpR İkili Fosforlama Sistemi	11
1.6.2. Porin protein sentezinde <i>micF</i> RNA'nin rolü	14
1.6.3. Porin protein sentezinde AcP'nin rolü	14
1.6.4. Porin protein sentezinde RpoS'nin rolü	15
1.6.5. Porin protein sentezinde H-NS'nin rolü	16
1.6.6. Porin protein sentez mekanizmasına karışan diğer faktörler	17
1.7. Kimyasal Maddelerin Bakteriler Üzerine Etkileri	19
1.8. Çalışmanın Amacı	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2. MATERYAL ve METOT	25
2.1 Kullanılan <i>E. coli</i> Suşları	25
2.2 Besiyerleri.....	25
2.2.1. Nutrient agar besiyeri	25
2.2.2. Nutrient brot besiyeri	26
2.3 Kimyasal Maddelerin besiyerine aktarılması	26
2.4 β -Galaktosidaz Enzim Aktivitesi Ölçümleri	26
3. BULGULAR	28
3.1. Zengin Besiyerinde <i>E. Coli</i> 'nin OmpC ve OmpF Porin Protein Sentez Durumu	28
3.2. Zengin Besiyerinde Kimyasal maddelerin <i>E. coli</i> 'nin OmpC ve OmpF Porin Protein Sentez Düzeyine Etkisi.....	31
3.2.1. Formaldehitin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi ve kontrol eden faktörler	35
3.2.2. H ₂ O ₂ 'in <i>E. coli</i> 'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi ve kontrol mekanizmaları	39
3.2.3. Klor'un <i>E. coli</i> 'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi	43
3.2.4. Etanol'un <i>E. coli</i> 'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi	47
3.2.5. SDS'nin <i>E. coli</i> 'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi.....	51
3.2.6. Çamaşır suyu'nun <i>E. coli</i> 'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi	55
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentez mekanizması ile ilgili tahmini model	12
3.1. Zengin besiyerinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutant strainlerin üreme grafiği	29
3.2. Zengin besiyerinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH225) ve mutantların üreme grafiği	29
3.3. Zengin besiyerinde yabani tip <i>E. coli</i> ve mutant strainlerin OmpC porin protein sentezi	30
3.4. Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF porin protein sentezi	31
3.5. Farklı kimyasal maddelerin etkisinde yabani tip <i>E. coli</i> 'nin (MH513) üreme grafiği	33
3.6. Farklı kimyasal maddelerin etkisinde yabani tip <i>E. coli</i> 'nin (MH225) üreme grafiği	33
3.7. Farklı kimyasal maddelerin yabani tip <i>E. coli</i> 'nin (MH513) OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi	34
3.8. Farklı kimyasal maddelerin yabani tip <i>E. coli</i> nin OmpC porin protein sentez düzeyine etkisi.....	35
3.9. Formaldehit yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutantların üreme grafiği	36
3.10. Formaldehit ilave edildiğinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH225) ve mutantların üreme grafiği ..	37
3.11. Formaldehit ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi	37
3.12. Formaldehit ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpC porin protein sentez düzeyine etkisi	39
3.13. H ₂ O ₂ ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutantların üreme grafiği	40
3.14. H ₂ O ₂ ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH225) ve mutantların üreme grafiği	40
3.15. H ₂ O ₂ ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF protein sentez düzeyine etkisi	41
3.16. H ₂ O ₂ ilavesinin Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpC porin protein sentez grafiği	43
3.17. Klor ilavesinde Yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutantların üreme grafiği	44
3.18. Klor ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF porin protein sentezine etkisi	44
3.19. Klor ilave edilmesiyle Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF porin protein sentez grafiği	45
3.20. Klor ilavesinin Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpC porin protein sentez grafiği.....	46
3.21. Etanol ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutantların üreme grafiği	48
3.22. Etanol ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH225) ve mutantların üreme grafiği	48
3.23. Etanol ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF Porin Protein Sentez düzeyine Etkisi.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.24. Etanol ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpC Porin Protein Sentez düzeyine Etkisi	50
3.25. SDS ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutantların üreme grafiği	52
3.26. SDS ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH225) ve mutantların üreme grafiği	52
3.27. SDS ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF porin protein sentezine etkisi	53
3.28. SDS ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpC porin protein sentezine etkisi.....	54
3.29. Çamaşır suyu ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutantların üreme grafiği.....	55
3.30. Çamaşır suyu ilavesinde yabani tip <i>E. coli</i> (MH225) ve mutantların üreme grafiği.....	56
3.31. Çamaşır suyu ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpF porin protein sentezine Etkisi	56
3.32. Çamaşır suyu ilavesinin yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantların OmpC porin protein sentezine etkisi	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> strainleri ve özellikleri	25
3.1. Yabani tip <i>E. coli</i> (MH225) ve mutantların OmpC protein sentez düzeyi verileri	30
3.2. Yabani tip <i>E. coli</i> (MH513) ve mutantların OmpF protein sentez düzeyi verileri.....	31
3.3. Farklı kimyasal maddeler ile büyüyen yabani tip <i>E. coli</i> 'nin OmpF sentez düzeyi.....	34
3.4. Farklı kimyasal maddeler ile büyüyen yabani tip <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentez düzeyi verileri.	34
3.5. Formaldehitli ve Formaldehitsiz yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpF sentez düzeyi verileri.....	38
3.6. Formaldehitli ve Formaldehitsiz yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentez düzeyi verileri.....	38
3.7. H ₂ O ₂ li ve H ₂ O ₂ siz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpF sentez düzeyi verileri	41
3.8. H ₂ O ₂ li ve H ₂ O ₂ siz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentez düzeyi verileri	42
3.9. Klorlu ve Klorsuz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentez düzeyi verileri.	45
3.10. Klorlu ve Klorsuz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentez düzeyi verileri	46
3.11. Etanollü ve Etanolsüz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpF sentezi verileri....	49
3.12. Etanollü ve Etanolsüz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentezi verileri ...	50
3.13. SDS'li ve SDS'siz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpF sentez düzeyi verileri	53
3.14. SDS'li ve SDS'siz büyüyen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentez düzey verileri	54
3.15. Çamaşır suyu ilave edilmiş ve edilmemiş büyütülen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpF sentez düzeyi verileri	57
3.16. Çamaşır suyu ilave edilmiş ve edilmemiş büyütülen yabani tip ve mutant <i>E. coli</i> 'nin OmpC sentez düzeyi verileri	57

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Acp	Asetil Fosfat
ArcB	Oksijen Sensör Proteini
cAMP	Siklik Amp
EnvZ	Osmesensör Protein
HNS	Histon Benzeri Nükleotid Protein
HU	Histon Protein
IHF	İntegrasyon Konak Faktörü
k Da	Kilodalton
LamB	Lamda B Porini
Lrp	Lösin Cevap Proteini
micF	OmpF'yi Posttranskripsiyonel Kontrol Eden RNA
nm	Nanometre
OmpA	Dış Membran Proteini A
OmpB	Dış Membran Proteini B
OmpC	Dış Membran Proteini C
OmpD	Dış Membran Proteini D
OmpF	Dış Membran Proteini F
OmpK35	Dış Membran Proteini K35
OmpK36	Dış Membran Proteini K36
OmpR	Dış Membran Protein Regülatörü
OmpT	Dış Membran Proteini T
OmpU	Dış Membran Proteini U
PhoE	Fosfat Porini
PorB	Porin Proteini B
RpoS	Alternatif Sigma Faktörü
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
StpA	Posttranskripsiyonel Proteini
Tsx	Porin Adı

1. GİRİŞ

1.1 *Escherichia coli*'nin Karakteristik Özellikleri

E. coli Enterobacteriaceae familyasına ait Gram (-), basit büyüme ortamlarında kültürü yapılabilen, çubuk şeklinde fakültatif anaerob bir bakteridir [1]. *E. coli* spor meydana getirmez. Genellikle tutunmak için fimbriaları ve hareket etmek için flagellası vardır. *E. coli* laktozu fermente ederek MacConkey agar üzerinde kırmızı koloniler oluşturur [2]. *E. coli*'nin koloni şekli yuvarlak ve yüzeyi düz olmasına rağmen bazı suşlar mukoid koloniler oluşturur [3]. *E. coli* ilk olarak memeli bağırsağında tespit edilen fekal koliform bir bakteridir. Triptofandan indol yaparlar, metil kırmızısı testi olumlu, Voges-Proskauer testi olumsuzdur. Simonun sitratlı besiyerinde negatif sonuç verirler. *E. coli* uzun yıllar boyunca suların kirlilik indikatörü olarak kabul edilmiştir. Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda *Salmonella typhimurium* için indikatör olamayacağı ortaya konmuştur [4].

1.2 Dış Membranın Genel Özellikleri

Bakterilerde (hücre duvarı olmayan bakteriler hariç), membran yapısını kuşatan ve koruma görevini daha güçlü olarak sağlayan bir hücre duvarı mevcuttur. Gram boyama yöntemi ile gram (+) ve gram (-) olarak iki gruba ayrılan hücre duvarı, güçlü yapısı ile hücrenin şeklini sağlayan, sitoplazmayı dış etkilerden koruyan bir tabakadır. Gram (-)'leri Gram (+)'lerden ayıran en temel farklardan birisi dış membranın varlığıdır. Dış membran, dış yüzeyi lipopolisakkaritlerle kaplanmış, iç membran gibi polisakkarit ve proteinler içeren, ikinci bir fosfolipit tabakasıdır. Dış membran ile iç membran arasında kimyasal kompozisyon ve fonksiyon bakımından farklılıklar vardır. Kimyasal kompozisyon açısından, iç membranın lipit bileşiği yalnızca fosfolipitlerden oluşur. Buna rağmen dış membranın iç tabakası, sitoplazmik membrandakine benzer olan fosfotidiletanolamine zengin bir lipit kompozisyonu içerirken, dış tabakası lipopolisakkaritlerden oluşmuş bir tabakadır [5]. Fonksiyonları ile ilgili temel farklılık dış membrandır. Dış membran, Gram (-) bakterilerin yaşamında oldukça önemli görevleri olan bir yapı olup, hücrenin dış etkenlerden korunmasında diğer bakteri gruplarına göre önemli bir avantaj sağlamaktadır [6]. Sitoplazmik membrana göre daha fazla delikli olmasını sağlayan, por oluşturan proteinlerin varlığı olup, bu proteinlere porin adı verilir. Bu proteinlerin yapısal ve fonksiyonel olarak önemli görevleri olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur [7, 8]

1.3 Porin Proteinlerinin Genel Özellikleri

Porin proteinleri, gerekli besinlerin seçici alımını sağlayan, çevresel değişimlere karşı sentez oranı değişen ve hücreyi koruyan yapılardır. Dış membranda bu proteinlerin varlığı ilk kez 1976 yılında tanımlanmış ve porin ismi verilmiş olup, ilk tanımlanan porinler *Escherichia coli*'deki OmpF ve OmpC porin proteinleridir [9]. *E. coli*'deki bu proteinlerden OmpF'nin kristal yapısı ilk kez 1980, anatomik yapısı ise 1992 yılında ortaya konmuştur [10, 11].

Porin proteinleri, membran permeabilitesinde rolü olan, ortalarında bulunan deliklerden 600 kDa'dan küçük hidrofilik bileşiklerin alımını sağlayan ve çapları 0,6-2,3 nm arasında değişen spesifik yada spesifik olmayan geçirgenlik özelliği gösteren su dolu kanallardır [12]. Porin proteinleri altta bulunan peptidoglikan tabakaya kovalent olmayan bağlarla bağlanmışlardır. Bu proteinler spesifik ve spesifik olmayan proteinler olarak 2 gruba ayrılmıştır. *E. coli* için spesifik porinlere LamB ve PhoE, spesifik olmayan porinlere ise OmpC ve OmpF örnek olarak verilebilir. *E. coli*'de LamB porininin ortasındaki kanal maltoz ve maltodekstrini, PhoE porininin ise fosfat moleküllerini geçirdiği için spesifik kanal olarak kabul edilirler [5]. *E. coli*'de OmpA, OmpF, OmpC, LamB, PhoE, Tsx olmak üzere 6 porin proteini tanımlanmıştır. OmpF porin proteini 37, OmpC ise 36 kDa moleküler ağırlığa sahiptir [13]. OmpA porininin ise madde transferinden farklı bir görevi olup, membranda oranı çevresel şartlar ile değişmeyen, dış membrana sağlamlık kazandıran bir proteindir [14,15]. Enterik grup bakterilerde ve diğer gram negatif bakterilerde bulunan porin proteinleri farklı adlar ile adlandırılmıştır. OmpC ve OmpF porin proteinleri çevresel şartlardaki değişimlere göre hücrede yaklaşık olarak 10^4 - 10^6 arasında bulunmaktadır [5].

1.4 Porin Proteinlerinin Anatomik Yapısı

Porin proteinlerinin ortalarında bulunan deliklerin anatomik yapıları birbirinden farklıdır. Porinler konformasyonel yapıları ve fizikokimyasal özelliklerine göre ya trimerik yada monomerik organizasyona sahiptir. Ortalarında tek kanal bulunan porinlere *P. aeruginosa*'nın protein P porini, 3 ayrı kanal bulunanlara ise OmpC, LamB ve PhoE porinleri örnek olarak verilebilir. Bazı porinlerde ise kanal dış yüzeyde 3 ayrı delikten orijin aldıktan sonra ortaya yakın bir noktada birleşir ve tek bir kanal olarak periplazmik boşluğa açılır, bu tip porinlere en iyi örnek de *E. coli*'nin OmpF porinidir [5]. 3 monomer ünitesi yüzeyde bulunan halkaların yakın ilişkileri ile birleşerek trimer yapıyı oluşturmaktadır. Yalnızca yüksek sıcaklıkta, SDS gibi deterjanların bulunduğu

ortamlarda çözülebilen bu yapı, dış membran içine yerleşmiş yoğun bir molekül organizasyonu gerçekleştirir [12].

Membranda bulunan porin proteinleri çok sayıda β -levha yapıları içerir [5]. Porinler pseudosiklik β fiçı yapısı ortaya koyan antiparalel β ipliklerden oluşur [10,16]. Spesifik porinler 18, spesifik olmayan porinler ise 16 iplikli β levhaya sahiptir [5]. Dış membranda bulunan proteinlerin tamamının β plakalı tabakalı protein yapısına, sitoplazmik membranda bulunan proteinlerin ise α heliks protein yapısına sahip olduğu ifade edilmiştir [5]. Bu farklılığın dış membran proteinlerinin sentezinden kaynaklandığı düşünülmektedir [17].

Porinlerin madde transferini nasıl gerçekleştirdikleri tam olarak ortaya konamamış, fakat yapılan çalışmalar sonunda bazı hipotezler ortaya atılmıştır. Kanalin ortasında L_3 loop olarak adlandırılan, kanalın ortasından daralmasını sağlayan ve porine kum saati şeklini kazandıran fonksiyonel bir yapının varlığı tespit edilmiştir [18]. Bu yapının, kanalın madde transferinde önemli bir görevi olduğu ortaya konmuştur [19, 20]. Porinlerin madde transferi ile ilgili ortaya atılan hipotezlerden birisi, genel porinler için voltaj kapısı mekanizması olup, bu mekanizma hala tam olarak çözülememiştir [21]. Substrat spesifik porinlerde ise bu mekanizmanın olmadığı, madde transferinin yağda kayma mekanizması olarak adlandırılan başka bir mekanizma ile gerçekleştiği tespit edilmiştir [22].

1.5 Porin Proteinlerinin Fonksiyonları

1.5.1 Porin proteinlerinin açlık stresindeki fonksiyonu

Besin sınırlaması, büyüme oranının azalmasına neden olan ve bakterilerde fizyolojik ve biyokimyasal düzenlemeleri içeren geniş bir adaptasyon sağlayan stres şartlarından birisidir. Besin sınırlamasındaki bu düzenlemelerin arasında porin sentezinin de bakterilerde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir [23,24]. Açlık stresinde porinlerin düzenlenme mekanizmaları ile ilgili olarak kapsamlı çalışmalar yapılmasına rağmen mekanizma henüz tam olarak çözülememiştir [23, 25] *E. coli*'de glukoz sınırlanmasında OmpF, azot sınırlanmasında ise OmpC'nin daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir [25]. Liu ve Ferenci (2001) çalışmalarında, açlık stresi altında porin sentezinin OmpR'ye bağımlı olduğunu ifade etmişlerdir [25]. Kemostat kültürler kullanarak, açlığın etkisi ile porin sentezini düzenleyen mekanizmaları çözmeye yönelik çalışmalarında, EnvZ sensörü olmadan da porin transkripsiyonunun olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu faktörlerin açlık

stresindeki etkilerinin tam olarak bilinmediğini ifade etmişlerdir [25]. Porinlerin madde transferindeki rolleri düşünüldüğünde açlık stresinde bakterilerin besin maddelerini toplayabilmek için membran permeabilitesini porinler ile değiştirdiği ifade edilmiştir [26].

Özkanca (1993, 2002)'nin çalışmalarında da açlık stresinde porin sentezinin düzenlendiği ortaya konulmuştur [24,27]. Özkanca ve Flint (2002) çalışmalarında göl suyunda 38 günlük açlık stresine maruz bırakılan *E. coli*'nin OmpF porin protein sentez düzeyinin 25 °C ve 37 °C'de artış gösterdiğini rapor etmişlerdir [27]. OmpC'nin ise nisbi olarak fazla değişiklik göstermediği, OmpA'nın miktarında azalma olduğu belirlenmiştir.

1.5.2 Porin proteinlerinin osmotik stresteki fonksiyonu

Ortam osmolaritesi değiştiği zaman gram (-) bakteriler porin sentezlerini düzenleyerek dış membran permeabilitesini adapte ederler. OmpC ve OmpF porin proteinlerinin çevresel şartlara bağımlı olarak değişimi, ilk olarak osmotik stres ile yapılan çalışmalarda ortaya konmuş ve bu nedenle osmolariteye karşı kullanılan proteinler olarak ifade edilmiştir. Direkt osmolarite ile düzenlenen bu proteinlerden OmpF düşük osmolariteli şartlarda sentezlenirken, yüksek osmolariteli şartlarda ise OmpF baskılanarak OmpC porin proteini sentezlenmektedir [28]. EnvZ, osmosensör olarak osmolaritedeki değişimi regülatöre iletmekle görevlidir. Ancak EnvZ'nin osmolaritedeki değişimleri nasıl hissettiği henüz tam olarak bilinmemektedir [29].

1.5.3 Porin proteinlerinin pH stresindeki fonksiyonu

Heyde ve Portalier (1987)'in bildirdiğine göre, *E. coli*'nin *ompF*, *ompC* ve *lamB* porin genleri nötral ve asidik pH ile düzenlenmektedir [30]. Asidik pH'da *E. coli*'nin OmpF, LamB porininin ve 30 kDa'luk proteinlerinin sentezinde azalma, OmpC sentezinde ise artış olduğu gözlenmiştir [30]. EnvZ ile yapılan çalışmalarda 2 farklı mutasyonun porin sentezindeki kontrolü değiştirdiği görülmüş ve bu mutant suşlardan birisinin *ompF* ve *ompC* genlerinin pH bağımlı düzenlenmesini oldukça etkilediği ifade edilmiştir. Aynı zamanda nötral pH'da ise her iki mutasyonda da bir değişim olmadığı ve OmpR sentezinin pH'dan etkilenmediği ortaya konmuştur [30]. pH bağımlı porin düzenlenmesinin transkripsiyonel düzeyde olduğu, ayrıca *ompF*'nin posttranskripsiyonel düzenlenmesinin de varlığı ifade edilmiştir. Heyde ve Portalier (1987) çalışmalarında *ompF* ve *ompC* genlerinin sentezi üzerine hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel düzeyde pH'ya bağlı olarak regülatör etkinin EnvZ bağımlı olduğunu ortaya koymuşlar, bunun yanında *ompF* sentezi için ayrıca bir düzenlemenin de varlığını vurgulamışlardır

[30]. Sato ve ark. (2000) ise çalışmalarında asidik pH şartlarında OmpC porin sentezinin EnvZ'den bağımsız başka bir mekanizma ile çalıştığını ortaya koymuşlar, ancak mekanizmanın bilinmediğini ifade etmişlerdir [31]. Darcan (2005) OmpC nin asidik pH da EnvZ den bağımsız olarak gerçekleşen sentezinde rol alan faktörleri tespit etmek için yapmış olduğu çalışmada RpoS, H-Ns, Acp'ı çalışmış ancak bu faktörlerin asidik pHdaki sentezden sorumlu olmadıklarını tespit etmiştir [32].

Thomas ve Booth (1992), sabit osmotik şartlarda pH 7.8 ve pH 6.0'da yaptıkları çalışmalarında, asidik pH'da üretilen *E. coli* kültürlerinde OmpC porin sentezinin arttığını, fakat OmpF porininin ise pH 7.8'de daha fazla sentezlendiğini ortaya koymuşlardır [33]. Ortamın osmolaritesi arttırıldığında OmpC'nin sentezinin her iki pH'da da, pH'dan bağımsız olarak arttığını, OmpC üzerine pH ve osmolaritenin farklı mekanizmalar ile etkilediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada cAMP'nin pH 6.0'da OmpC sentezini arttırdığını, OmpF sentezine ise etkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır. OmpC'nin osmotik düzenlemesinin ise ortamdaki karbon kaynağından bağımsız olduğunu göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalarda kompleks ortamlarda üreyen hücrelerde pH bağımlı porin düzenlenmesi ortaya konmuşken [30, 33], sadece glukoz karbon kaynağı olarak kullanıldığı zaman porin genlerinde pH bağımlı bir düzenlemenin olduğunu ifade etmişlerdir.

Heyde ve ark. (2000) *E. coli*'de pH 6.0'da OmpC, pH 7.8'de ise OmpF'nin sentezlendiğini, EnvZ mutant *E. coli*'de ise pH 6.0'da OmpC ve OmpF'nin, pH 7.8'de ise OmpF'nin sentezlendiğini ve OmpC'nin ise yok denecek kadar az olduğunu vurgulamışlardır [34]. EnvZ yokluğunda *ompF* ve *ompC* sentezinin pH ve AcP ile etkilendiğini ifade etmişler, düşük pH'da daha yüksek OmpR-P miktarının bu düzenlemeden sorumlu olabileceğini, pH vasıtası ile AcP'in miktarının değişerek OmpR-P düzeyini değiştirdiği, böylece EnvZ'nin karışmadığı pH bağımlı porin sentezini AcP'in kontrol ettiğini ortaya koymuşlardır [34]. EnvZ aktivitesinin pH ile porin düzenlemesine karışmadığını ifade ederek AcP'in OmpR'yi nasıl fosforladığının bilinmediğini ifade etmişlerdir [34]. Ayrıca Kim ve ark. (1996)'da AcP'in OmpF ve OmpC'nin osmotik düzenlenmesini EnvZ olmadan gerçekleştirdiğini ortaya koymuşlardır [35]. Buna ilaveten farklı karbon kaynaklarında porinlerin farklı düzenlenmesini sağlamada AcP'in rolü ifade edilmiş, pirüvat ile gerçekleşen farklı bir mekanizma ile düzenlenen porin sentez mekanizmasının olduğu vurgulanmış, ancak henüz bu mekanizmanın nasıl çalıştığının bilinmediğini ifade etmişlerdir [34].

1.5.4 Porin proteinlerinin diğer çevresel şartlardaki fonksiyonları

Lugtenberg ve ark. (1976) çalışmalarında porin protein sentez düzeyinin büyüme sıcaklığına bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir [36]. Yine Andersen ve ark. (1989) çalışmalarında porinlerin sentezinin sıcaklığa bağlı olarak *micF* RNA ile kontrol edildiğini tespit etmişlerdir [37]. Başka bir çalışmada da OmpF sentezinin 37 °C’de düşük sıcaklıklara göre daha fazla azaldığı, OmpC sentezinin ise 5 ve 15 °C’de daha fazla azalma gösterdiği ifade edilmiştir [24]. Bağırsaklarda bakterilerin safra tuzları ve diğer toksik bileşiklerden korunmasına yardımcı olmak için yüksek sıcaklıklarda, OmpF miktarının azaldığı ifade edilmiştir [38].

E. coli’nin büyüme ortamına salisilat veya etanol katıldığında OmpF sentezinin arttığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur [37, 39, 40]. Darcan ve ark. (2001) etanol ile muamele edilen *E. coli* ve *S. typhimurium*’un OmpC ve OmpF porin proteinlerinin ve dış membran proteinlerinin büyük çoğunluğunun sentezinde dikkate değer artış olduğunu göstermişlerdir [39]. Ayrıca yapılan bir çalışma da salisilik asitin OmpF porin sentezini *micF* RNA ile bloke ettiği tespit edilmiştir [41]. Darcan (1999) deniz suyunda yaptığı çalışmasında, formaldehit ve SDS gibi dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *E. coli* ve *S. typhimurium*’un dış membranındaki proteinlerin, OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentez düzeyini azalttığını göstermiştir [42]. Özkanca (1993)’da göl suyunda yaptığı bir çalışmada SDS gibi deterjanlara maruz kalmış *E. coli*’de OmpC ve OmpF porin proteinlerinin neredeyse yok denecek kadar azaldığını belirtmiştir [24]. Kimyasal kirletici maddelerden olan monoklorofenol, pentaklorofenol ve kadmiyum klorid kimyasallarının da etkisi ile OmpF sentezinin azaldığı gösterilmiştir [43]. Mar regülönun (kimyasal maddelere direnç regülönü) porin proteinlerinin sentezini, özellikle OmpF porinini kontrol ettiği ortaya konmuştur [44]. Mar regülönunun kimyasal maddelerin hücre dışına atılması ve hücrenin korunmasında önemli rolü vardır [45].

E. coli’de porinlerin ArcB ile düzenlenmesinin tespit edilmesiyle birlikte, porinlerin sentez düzeyinin oksijen miktarı ile de kontrol edildiği gösterilmiştir [46]. ArcB, *E. coli*’nin farklı oksijen şartlarına adapte olmasını sağlamada kompleks regülatör ağlarda hayati rol oynamaktadır. Matsubara ve ark. (2000) çalışmalarında OmpR’nin, farklı bir fosforlama sistemi olan ArcB-ArcA’nın sensörü ArcB ile fosforlandığını ortaya koymuştur [46]. Ancak *E. coli*’nin neden anaerobik şartlarda güçlü bir porin sentezine ihtiyaç duyduğunun henüz bilinmediğini ifade etmişlerdir. Ayrıca anaerobik şartlar altında porinlerin sentezini düzenleyen *micF* RNA, Lrp, HNS,

IHF, RpoS gibi faktörlerin olabileceğini ifade etmişler ve bu faktörler ile anaerobik şartlarda çalışmaların olmadığını belirtmişlerdir.

1.5.5 Porin proteinlerinin antibiyotik direncindeki fonksiyonu

Porinlerin önemli görevlerinden biriside gram negatif bakterilere antibiyotik direnci sağlamalarıdır. *Neisseria meningitidis*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter aerogenes* gibi bazı klinik izolatlarda, membranda ortaya çıkan dikkat çekici bir porin varyasyonu görülmektedir [47]. Bu varyasyon genel antibiyotik tedavilerine rağmen bakteriyal direnci açıklayan bir fenotipi ortaya koymaktadır. Bu dirençli klinik izolatlarda gözlenen durum porinin daralma bölgesindeki değişken pozisyonu ve kısa yan zincirlerdeki aminoasitler veya daralma alanındaki yüklerle ortaya çıkmaktadır. Bu ilave yükler lümen içinde antibiyotiklerin normal diffüzyonunu etkileyerek direnci sağlamaktadır [12].

Por yapısındaki düzenlemelere ilaveten, porin sentezindeki değişkenlikte antibiyotik direncinde önemli rol oynar. Bu direnç, bazı antibiyotiklerin varlığında bakteriyal patojenlerin porinlerin sentezini azaltması veya kapatması ile gerçekleşmektedir. OmpC ve OmpF porin kaybı ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki özellikle *E. coli* ve *S. typhimurium*'da çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [48, 49]. *K. pneumoniae*'da porinlerin kaybının cefoxitine dirence neden olduğu görülmüş, ayrıca 3. nesil sefaalosporinler ve monobaktamlara direnci arttırdığı ve floroquinolonlara hassaslığı azalttığı tespit edilmiştir. *K. pneumoniae*'da ayrıca β -laktamaz üretimi ile porin sentezi arasında bir ilişki bulunmuştur. Buna göre geniş spektrumlu β -laktamaz sentezi yapamayan *K. pneumoniae*'nın bir çok izolatında OmpK36 ve OmpK35 porinleri sentezlenirken, β -laktamaz üreten bakterilerde yalnızca OmpK36 porininin sentezlendiği, OmpK35'in ya çok düşük ya da sentezlenmediği gösterilmiştir [50]. Ayrıca bir çok β -laktam antibiyotikğin dış membranı porinler vasıtası ile geçtiği bilinmektedir [51]. Bu nedenle dış membranın permeabilitesi β -laktam antibiyotiklere gram (-) bakteriyal direncin oluşmasında önemli mekanizmalardan birisidir [6]. Nitzan ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada farklı β -laktam antibiyotiklerin taşıdıkları yük özelliklerine göre dış membranı porinlerden geçişlerinde farklılıklar olduğunu göstermişlerdir [49].

Uzun süreli antibiyotik tedaviye maruz kalan hastalarda, çoklu antibiyotik direnci olan bakterilerin ortaya çıktığı görülmüştür. Bu dirençte OmpC porin proteini ve gen bölgesindeki varyasyonların önemi Low ve ark. (2001) tarafından *E. coli* üzerinde yapılan çalışmada ortaya

konmuştur [48]. Ayrıca De ve ark. (2001)'da çalışmalarında *E. aerogenes*'de yeni bir antibiyotik direnç mekanizmasının dış membranda mevcut olan bir porin ile gerçekleştiğini ortaya koymuştur [52]. Ancak *E. aerogenes*'de antibiyotiklerin geçişinde bu porinin fonksiyonel ve moleküler rolü hakkında bir bilgi olmadığı vurgulanmıştır. Li ve ark. (1997) çalışmalarında porinleri eksik *E. coli* mutant suşlarının gümüşe dirençli olduğunu ifade etmişlerdir [53]. Yapılan çalışmada gümüş dirençli olarak gösterilen ve izole edilen *E. coli*'nin ya OmpF ya da OmpF-OmpC porin proteinlerinin eksik olduğu, permeabilitenin yabancı tipe göre 5 kat daha az olduğu tespit edilmiştir.

1.5.6 Porin proteinlerinin reseptör fonksiyonu

Porinlerin fonksiyonlarından birisi de reseptör fonksiyonudur. Fajlar ve bakteriosinler için reseptör olarak görevleri olduğu gibi farklı bileşiklerin tutunma alanı olarak görevleri de vardır. Porinlerin bu rollerine hücre dış yüzeyinde bulunan hücre yüzey iplikleri karışır [12]. Lactoferrin *E. coli*'ye tutunma alanı olarak PhoE ve OmpC porinini kullanır [54]. *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* ve *Aeromonas hydrophila* gibi farklı bakterilerde C1q'nun, porin proteinlerine çeşitli yollar ile bağlanmasının komplemanı aktive ederek hücre yüzey alanı üzerindeki obsonic proteinlerin (C3b veya iC3b) dağılmasını sağladığı ifade edilmiştir. Bu yüzden porin proteinleri bu ölüm zincirinde stratejik rol oynar [55].

LamB porini ilk bulunduğu lamda fajı reseptörü olarak tanımlanmış daha sonra maltoz gibi sakkaritler için geçiş özelliği olan bir porin olduğu tespit edilmiştir. Zaten LamB adı lamda fajından gelmektedir. Porin proteinlerinin virüslerin bakteriye tutunmasını sağlayacak reseptör olarak görevleri de olduğu görülmektedir. Tula, Tulb ve Mel adı verilen virüslerin de OmpF ve OmpC porin proteinlerini reseptör olarak kullandıkları ifade edilmiştir [12].

1.5.7 Porin proteinlerinin patojenitedeki fonksiyonu

Bakterilerin bitki köklerine tutunmasında porinlerin rolü olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Örneğin, *in vitro* şartlarda *Rahnella aquatilis*'in buğday köklerine tutunmasında OmpC porininin rolü gösterilmiştir [56]. Başka bir çalışmada da *P. fluorescens*'in OmpF porin proteininin tahıl köklerine tutunmada rolü olduğu ortaya konmuştur [57].

S. typhimurium'dan OmpD (Dorman ve ark., 1989) ve *Shigella flexneri*'den OmpC (Bernardini ve ark., 1993) porinlerinin bakterilerin yayılma yollarında virulans faktörü olarak hareket ettiği tespit edilmiştir [58, 59]. *OmpB* ve *ompC* genleri silinmiş mutant suşlarda virulans

fenotipleri oldukça azalmış, mutant suşun hücreden hücreye yayılabilmesi ve epitel hücrelerini hasara uğratması ciddi şekilde etkilenmiştir. Bu mutant suşların virulansının *E. coli*'nin OmpC genini taşıyan bir plazmitli rekombinantla tekrar eski haline geldiği tespit edilmiştir [58]. *Vibrio cholerae*'da ToxR transkripsiyonel aktivatörü, virulans faktörünün sentezini kontrol eder. Ayrıca bu aktivatörün *V. cholerae*'nin OmpU ve OmpT porinlerinin sentezini de kontrol ettiği belirtilmiştir [60].

Porinler ile patojenite arasındaki en dikkat çekici örneklerden birisi de *Neisseria gonorrhoeae*'nin patojenitesini sağlayan PorB porinidir. Bu porin bakterinin uretra, endoservix, konjunktiva, fallopian tüpleri, rektum ve farinksin mukozasına kolonize olmasını sağlar. Klasik bir porin olan PorB, dış membranda iyon ve besin taşıma kanalı olarak görev yapar. Aynı zamanda bakterinin konak hücre membranları içine yerleşmesine yardımcı olur [61]. Membrana yerleşen neisserial porinin, kalsiyum bağımlı sistein proteaz calpaini ve merkezi apoptosis yapan molekül caspası aktive ederek hızlı bir kalsiyum akışını sağladığı ve böylece apoptosisi indüklediği tespit edilmiştir [61].

Porinlerin aynı zamanda Gram (-) bakteriler ile görülen kemik yıkımına karıştığı tespit edilmiştir. Kemik hastalıklarının en temel gruplarından birisi, dünya nüfusunun %15'ini etkileyen bakterial alveolar kemik hastalıkları gibi periodontal hastalıklardır [62]. Bu nedenle bakteriler ile indüklenen kemik yıkım mekanizmasının belirlenmesi çok önemlidir. Son yıllara kadar lipopolisakkaritlerin kemik enfeksiyonlarındaki doku yıkımının sorumlusu olduğu bilinirdi. Meghji ve ark. (1997) çalışmalarında *S. typhimurium* porinlerinin kemiklerden kalsiyum salınımını indüklediğini göstermişlerdir [62].

S. typhimurium'da *ompB* lokusunda meydana gelen bir mutasyonun HeLa hücrelerinde Sif oluşumunu etkilediği tespit edilmiş, *ompR* mutant suşlarının farelerde virulans özelliğinin olmadığı gösterilmiştir [59]. Sif oluşumu, dolayısı ile virulansın oluşmasında OmpR gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca *S. typhimurium ompR* mutant suşlarının fare makrofaj hücrelerinde apoptosisi indüklemediği ve patojenenezden sonraki adımı gerçekleştirmediği tespit edilmiştir [63].

1.6. OmpC ve OmpF Porin Proteinlerinin Sentez Mekanizması

E. coli gibi Enterobacteriaceae familyası üyeleri ve diğer bakteriler topraktan bağırsak alanlarına kadar çok çeşitli çevresel şartlarda bulunurlar. Bu farklı çevresel şartlar içerisinde

oksijen miktarı, organik ve inorganik elementlerin miktarındaki değişimler, toksinler, sıcaklık, pH, osmolarite gibi farklı şartların ekstrem değerleri ile karşılaşabilmektedirler [64]. Bakteriyal regülatör sistemleri, bu farklı şartlarda optimal büyüme oranı ve yaşamını sağlamakla görevlidirler. Bakteriler meydana gelecek her türlü çevresel değişimi algılayıp, bu değişimlere göre metabolik önlemler alabilen sistemlere sahiptirler. Bu sistemler iki bileşikli fosforlama sistemleri olarak adlandırılır [65]. Porin proteinleri de iki bileşikli fosforlama sistemi ile çalışmaktadır [66]. OmpC ve OmpF porin proteinleri *E. coli* ve *S. typhimurium*'da *ompB* lokusu tarafından düzenlenir [67, 68]. *OmpB* lokusu OmpR-EnvZ iki bileşikli regülatör sistemin genlerini kodlar, EnvZ bir histidin kinaz sensör, OmpR ise transkripsiyonel aktivatördür [67].

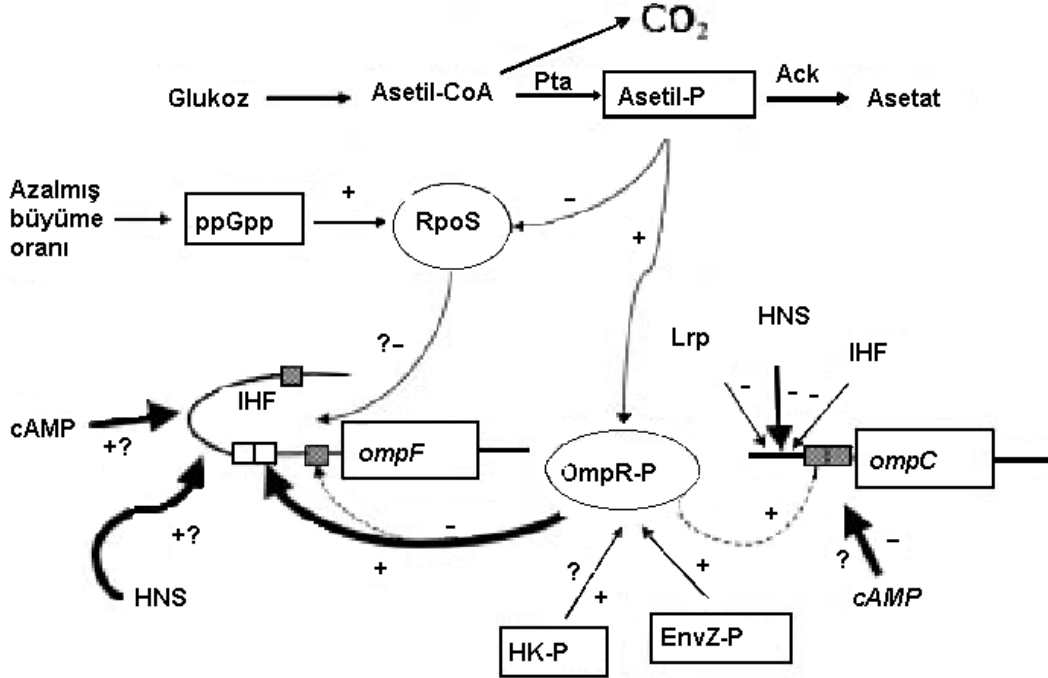
Porin sentez mekanizmasının çok kompleks olduğu ve bir çok faktörün porin transkripsiyonel ve translasyonel kontrolüne karıştığı bilinmektedir. EnvZ sensörü, OmpR fosforilasyonu ve defosforilasyonu için temel rol oynar [69]. Düşük osmolarite, EnvZ fosfataz aktivitesini indükleyerek OmpR-P'ın defosforilasyonunu sağlarken OmpR miktarını arttırır. Yüksek osmolarite ise EnvZ kinaz aktivitesini arttırır ve OmpR fosforilasyonunu sağlayarak OmpR-P miktarını arttırır [28]. OmpR-P yüksek düzeyde ise *ompC* genini uyarırken *ompF* genini baskılar [70]. Ancak porin düzenlenmesinin tamamen EnvZ bağımlı olmadığı tespit edilmiştir [71]. Çeşitli alternatif histidin kinaz donörleri [72] ve asetil fosfat (AcP) [34] fosforamidat, karbamyl fosfat gibi bazı yüksek enerjili moleküllerinde OmpR'yi fosforladığı gösterilmiştir [73]. EnvZ ve OmpR'nin yanında bir çok global regülatörler ki bunlar alternatif sigma faktörü (RpoS) [74], histon benzeri DNA bağlama proteini (H-NS) [75] integrasyon konak faktörü (IHF) [76] gibi moleküllerinde porin sentezini transkripsiyonel düzeyde düzenlediği tespit edilmiştir. Porin sentezini bilinmeyen bir yolla etkileyen diğer bir sinyalde cAMP'dir [25]. Ayrıca OmpF translasyonunun kontrolünü sağlayan bir faktöründe *micF* RNA olduğu ortaya konmuştur [77].

Şekil 1.1'de Liu ve Ferenci (2001)'nin makalesinde çizdiği, OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentezini kontrol eden ve şu ana kadar elde edilen bilgiler ışığında ortaya konan tahmini mekanizma verilmiştir [25]. Ancak burada senteze karışan mekanizmalar tam olarak kesin bilgiler içermemekte ve ilave başka faktörlerinde olabileceği tahmin edilmektedir. Farklı çevresel şartlar altında bu mekanizmaların nasıl çalıştığı da tam olarak ortaya konamamıştır. Osmotik strese porinlerin çalışma mekanizması aşağı yukarı bilinmekte olup yapılan literatür araştırmalarında diğer stres şartları ile (pH, açlık, sıcaklık, çeşitli kimyasal maddeler vb) yeterli çalışmaya rastlanmamıştır

1.6.1 EnvZ-OmpR ikili fosforlama sistemi

EnvZ-OmpR sistemi, çevresel değişimleri algılayan bir sensör ve bu sensörün sinyali ilettiği bir regülatörden oluşan iki bileşikli fosforlama sistemlerinden birisidir [66]. Bu sistemlerde bulunan iki bileşikten birisi korunmuş aspartil alanı geçici olarak fosforlanabilen cevap regülatörü olarak bilinir. Cevap regülatör proteinlerinin büyük çoğunluğu transkripsiyonel faktörlerdir ve fosforlandıktan sonra transkripsiyon aktivitesini sağlar [78]. İki bileşikli sistemlerin diğer bileşiği histidinkinaz proteindir. Bu protein aynı zamanda sensör veya transmitter protein olarak ifade edilir [79]. Histidin kinazlar ATP deki γ -fosforil grubunu kendi üzerindeki histidin residüsünün imidazol zincirindeki bir N'a transfer eder. Regülatör ise histidin kinazdan fosforil grubunu kendi üzerindeki aspartat residüsüne aktarır [78]. Fosforile olmuş regülatör proteinlerin hücrel konsantrasyonlarını düzenlemede, farklı transdüksiyon sistemlerinde farklı mekanizmalar kullanılır. Örneğin bazılarında kontrol, histidin kinazın otofosforilasyonunun düzenlenmesi ile ortaya çıkarken [73] bazı durumlarda ise fosforile olmuş cevap regülatörün hücrel konsantrasyonunun fosfataz aktivitesi ile düzenlenerek sağlanır [79]. Başka bir durumda ise fosfataz aktivitesinin düzenlenmesi histidin kinaz aktivitesini düzenleyen proteinden ayrı bulunurken, bazı durumlarda ise fosfataz aktivitesi aynı proteindedir. EnvZ'de sensör yani çevresel uyarıyı alan yapı histidin kinaz aktivitesine sahip proteinin üzerinde yer almaktadır [79]. *E. coli*'de yaklaşık olarak 30 farklı iki bileşikli sistem olduğu tahmin edilmektedir [73].

İki bileşikli fosforlama sistemlerinin bir örneği olan EnvZ/OmpR sistemi porin proteini olan *ompF* ve *ompC* gen bölgelerini düzenlediği tespit edilmiştir [67, 80]. OmpR proteini seçici olarak *ompF* ve *ompC* genlerinin üst bölgelerine bağlanarak sentezi kontrol eder [81, 82]. *ompB* operonunda bulunan *ompR* geni 239 aminoasitten oluşan ve 90 baz çifti *ompF* ve *ompC* gen bölgesi ile uyumlu bir DNA bağlanma regülatörüdür [83]. EnvZ'nin toplam 450 aminoasitlik kısmının 115 aminoasitlik kısmı periplazmik alanda, 270 aminoasitlik kısmı ise sitoplazmik alanda olduğu bulunmuştur [84]. Bir hücrede EnvZ'nin yaklaşık 10 kopya [85], OmpR'nin ise 1000 kopya olduğu tahmin edilmektedir [86]. EnvZ, ATP varlığında otofosforilasyona sahip osmosensördür [84]. Osmolaritenin hissedilmesi ile ilgili olarak dış osmotik basınçtaki değişim sonucunda ortaya çıkan potasyum ve glutamatın sitoplazma konsantrasyonundaki artış ile EnvZ sensörün fosfataz bileşiği inaktive edilerek OmpR-P düzeyini yükselttiği ifade edilmiştir [87].



Şekil 1.1 OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentez mekanizması ile ilgili tahmini model [25].

EnvZ'nin sitoplazmadan daha çok periplazmadan veya dış membrandan gelen uyarılara cevap oluşturacağı vurgulanmış (Igo ve Silhavy, 1988), ancak Leonardo ve Forst, (1996) çalışmalarında periplazmik kısmın sensörün görevi için gerekli olmadığını ortaya koymuşlardır [88, 89]. Son olarak EnvZ'nin osmolariteye bağımlı aktivitesinin düzenlenmesinde potasyumun rol aldığı tespit edilmiştir [90]. *In vitro* deneylerde OmpR olmadan RNA polimerazın *ompF* ve *ompC* transkripsiyonunu gerçekleştiremediği tespit edilmiş ve saflaştırılmış OmpR ilave edildiğinde sentezin gerçekleştiği görülmüştür [67]. Yapılan çalışmalardan hem *ompF* hem de *ompC* için OmpR-P gerekli olduğu ortaya konmuş (Russo ve Silhavy, 1991) ve 2 farklı promotora farklı konsantrasyonlarda, farklı bağlanma affinitesi ile etki gösterdiği belirlenmiştir [70, 69].

Bakterilerde EnvZ/OmpR gibi bir çok iki bileşikli fosforlama sistemleri vardır. Bunlar arasında kemotaksis, nitrojen düzenlemesi, virulans, sporulasyonu kontrol eden mekanizmalar sayılabilir [66]. Ayrıca *in vitro* çalışmalardan birbiri ile çapraz düzenlemeler ortaya koydukları gösterilmiştir [46]. İki bileşikli sistemlerin sensörlerinde otofosforilasyon alanları evrimsel olarak

oldukça iyi korunmuştur. Ancak EnvZ diğer sensörlere göre sahip olduğu fosfataz aktivitesi ile farklı bir özelliğe sahiptir [79]. EnvZ, kinaz ve fosfataz aktiviteleri arasında denge sağlayarak OmpR-P miktarını kontrol ile porin sentezini düzenler [70].

Bazı *in vivo* şartlarda OmpR'nin fosforlanmasını sağlayan EnvZ'den başka alternatif faktörlerin varlığını ortaya koyan kanıtlar vardır [31,70,71,72]. Fosforamidat (NH_2PO_3), acetyl fosfat ve karbamil fosfat ile 7 saflaştırılmış cevap regülatör proteininin (CheB, NR1, PhoB, CheY, OmpR, ArcA ve AlgR) *in vitro*'da fosforlanabildiği ortaya konmuştur [73]. Bu sonuçlar cevap regülatörlerinin kendi otofosforilasyonlarını gerçekleştirebildiğini göstermektedir.

OmpR ile düzenlenen porinler dışında başka genlerinde olduğu ortaya konmuştur. Shin ve Park, (1995) çalışmalarında *E. coli*'nin flagella sentezinin düzenlenmesinde AcP ile fosforlanan OmpR'nin etkisi ortaya konmuş, OmpR-P ile flagellar sentezin düzenlendiği gösterilmiştir [91]. Ayrıca *S. typhimurium*'un tripeptid permease kodlayan *tppB*, dış membran protease *opr*, *pho* regülönunun PhoA ve PhoE proteinleri, maltoz operonunun pozitif regülatörü MalT'nin OmpR/EnvZ ikili sistemi ile düzenlendiği tespit edilmiştir [92]. Başka bir çalışmada OmpR'nin *S. typhimurium*'un virulansında çok önemli fonksiyonu olan SsrA-SsrB iki bileşikli regülatör sisteminin *ssrA* promotoruna direkt olarak bağlanabildiğini ve pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir [93]. Ayrıca OmpR'nin hücre bölünmesi ve fatty asitlerin taşınmasında da rolü tespit edilmiştir [94, 95].

E. coli'de porin proteinlerinin *arcB* ile de düzenlendiği ifade edilmiştir. Böylece porin sentezinin oksijen düzeyi ile de kontrol edildiği görülmektedir. *sdhCDAB* operonu, süksinat dehidrogenaz enzimini kodlayan operon, ArcB-ArcA sistemi ile düzenlenir [46]. Matsubara ve ark. (2000) çalışmalarında anaerobik ve aerobik şartlarda büyütülen *E. coli*'nin porin profillerinde oldukça farklılıklar olduğunu göstermişlerdir [46]. Dolayısı ile anaerobik şartlarda porin sentezinin ArcB ile kontrol edildiği ortaya konmuştur. Porinlerin anaerobik şartlarda düzenlenmesinin OmpR bağımlı olduğu, ArcA bağımsız olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca ArcB anaerosensörün başka bir regülatörü fosforlaması göz önüne alındığında EnvZ osmosensöründe başka regülatörleri fosforlayabileceği belirtilebilir. Ancak şu ana kadar bununla ilgili bir çalışma ortaya konmamıştır. Bu sonuçlar *E. coli*'de mevcut olduğu tahmin edilen 30 fosforlama sistemi arasında bir ağ olabileceğini gösterir ve birbiri ile bilinmeyen çapraz düzenlemeler ortaya koyabilir [46].

1.6.2. Porin protein sentezinde *micF* RNA'nin rolü

micF geni stres uyarılarına cevap olarak OmpF porin sentezini posttranskripsiyonel olarak kontrol eden, *E. coli* ve benzeri organizmalarda bulunan bir antisense RNA'dır [38]. *micF* geni 5' ucu 3 fosforlu olan ve 3' ucu transkripsiyon terminasyon sinyali taşıyan 93 nükleotidlik translasyonu yapılmayan bir RNA kodlar [38]. OmpC porin geni ile bitişik olup, promotor bölgesindeki bazı regülatör sekansları ortak kullanılmaktadır [96]. OmpF'nin düzenlenmesi bu sayede hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde olmaktadır. OmpF'nin translasyonel kontrolü, sentezlenmiş OmpF mRNA'sı ile *micF* RNA'nin, OmpF mRNA'sının translasyon başlangıç noktasını içine alan 150 nükleotidlik kısımdan bir RNA-RNA dubleksi oluşturarak porin mRNA'sının translasyonu engellenerek sağlanır [38]. Osmolarite [37], oksidatif bileşikler [97], Hidrojen peroksit [98], toksik bileşikler ve sıcaklık [37], besin azalması [99], antibiyotikler [100] *micF* RNA sentezini etkileyen çevresel faktörlerdir. Bu gen ekstrem çevresel şartlara geçişte hızlı bir cevap olarak hücre yaşamının korunmasını sağlamaktadır. *micF* RNA oranı minimal mediumda düşük, zengin besiyerinde yüksektir. *micF* RNA'nin sentezini HNS, [101], StpA [102], HU [103], Lrp [99] gibi faktörlerin de etkilediği gösterilmiştir.

MicF mutant suşlar ile yapılan çalışmalarda osmotik şartlarda OmpC miktarının etkilenmediği, aksine OmpF sentezini düşük osmolariteli şartlarda arttırdığı görülmüştür [104,105], *micF* RNA geninin sentezinin osmolariteye cevapta OmpR ile kontrol edildiği ifade edilirken, sıcaklık değişimlerine karşı ise sentezin farklı bir yol ile kontrol edildiği tespit edilmiştir [96].

1.6.3 Porin protein sentezinde AcP'in rolü

AcP, asetat metabolizmasında glukozdan 2 enzim vasıtası ile asetat oluşması sırasında ortaya çıkan bir ara üründür. Bu metabolizmada rol alan enzimlerden birincisi *pta* geni ürünü olan Asetil coA'dan AcP üretimini sağlayan fosfotransasetilaz, ikincisi ise *ackA* gen ürünü olan AcP'dan asetat oluşumunu sağlayan asetat kinazdır [73]. Dolayısı ile *pta*'da meydana gelecek bir mutasyon AcP üretimini keserken, *ackA*'daki mutasyon ise AcP üretimini artırır.

AcP'in, OmpR'yi fosforlayarak porin proteinlerinden OmpC'nin sentezinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir [106]. Ayrıca AcP'in düşük pH şartlarında porin sentezini kontrol ettiği gösterilmiştir [34]. Yapılan başka bir çalışmada ise *ackA* mutant suşlarında hem N hem de glukoz sınırlamasında OmpC sentezinin 4-5 kat, OmpF sentezinde ise N sınırlamasında 27 katlık bir artış olduğu tespit edilmiştir [25]. Ayrıca AcP'in RpoS gibi başka mekanizmaları etkilediği yapılan

çalışmalar ile ortaya konmuştur [107]. Glukoz sınırlı açlık şartları ile yapılan bir çalışmada *pta* mutant suşlarında OmpF sentezinin azaldığı, OmpC sentezinin ise oldukça arttığı tespit edilmiştir [25]. AcP'nin OmpF üzerine RpoS ile, OmpC sentezine ise EnvZ ve bilinmeyen başka bir yol ile etkili olduğu ifade edilmiştir [25]. Ayrıca AcP'nin DNA süper sarmal oluşumu arasında OmpF ve OmpC porin düzenlenmesine katılan kompleks bir mekanizmayı tetikleyebileceği ifade edilmiştir [25]. Bakterilerde AcP düzeyi, büyüme ortamındaki karbon kaynaklarına oldukça bağlıdır. Fosfat sınırlı şartlar ve gliserol üzerinde üretilen bakterilerde çok düşük (40 µM), glukoz üzerinde üretilenlerde orta düzeyde (300 µM) ve pirüvat üzerinde üretildiği zaman ise oldukça yüksek (1.5 mM) AcP seviyesi tespit edilmiştir [73]. *ackA pta* ikili mutant suşunda AcP sentezi tamamen kaybolurken, *pta* mutant suşlarında ortama asetat ilave edilmedikçe AcP sentezi tamamen bloke olmaktadır [73]. İki bileşikli cevap sistemlerinin bir çoğunda AcP'nin fonksiyonu ortaya konmuştur. *In vitro* çalışmalarda farklı cevap regülatörlerinin küçük fosfat molekülleri ile fosforilasyona hassaslıklarında farklılıklar olduğu, bu nedenle regülatörlerin fosforile olması ve bu fosfatlardan ayrılması ile kurulan denge sonucunda genlerin transkripsiyonunun kontrol edildiği ifade edilmektedir [73]. McCleary ve ark. (1994) çalışmalarında karbon kaynağı olarak gliserol içeren MOPS minimal ortamda büyütülen bakterilerin büyüme ortamına asetat ilave edildiğinde OmpC sentezinin artan AcP miktarına paralel olarak arttığını, OmpF miktarının ise hafifçe azaldığını göstermiştir [106]. Bu sonuçla OmpR'nin AcP ile fosforlanarak OmpC sentezinde rol aldığı görülmektedir. Yapılan çalışmalar ile AcP'nin cAMP'nin düzenlenmesinde de rol oynadığı tespit edilmiştir [108]. AcP'nin porinler üzerindeki rolü ortaya konmasına rağmen hangi çevresel şartlarda, hangi mekanizmaları nasıl etkilediği hususunda kesin bilgiler yoktur [109]

1.6.4. Porin protein sentezinde RpoS'nin rolü

Bakteriler tarafından çevresel şartlara cevap olarak ortaya konan bir çok genin sentezi, RpoS global stres faktörü olarak adlandırılan bir sigma faktörün kontrolü ile çalışmaktadır [110]. *rpoS* geninin transkripsiyonel düzenlenmesi oldukça kompleks olup, RpoS regülonu, genel stres direnci, (UV, hiperosmolarite, asit şoku, oksidatif ve sıcaklık stresi), karbon metabolizması, hücre zarf ve morfolojisi gibi çok farklı fonksiyonlarda görev alan genleri içerir [110,111] Ancak bu faktörün karıştığı olaylar ve nasıl düzenlendiği hala bir muamma olup hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır [110]. Ayrıca RpoS regülonu HNS, Lrp, CRP veya IHF gibi faktörlerin etkisi altında olup, RpoS proteininin degradasyonu da ATP bağımlı ClpXP proteaz ile kontrol edilir. Ayrıca bu degradasyon sisteminin nasıl çevresel sinyaller ile uyarılarak çalıştığı henüz tam olarak

bilinmemektedir [110]. RpoS transkripsiyonu ve translasyonu osmolarite artışı, düşük pH, düşük sıcaklık ve yüksek hücre yoğunluğu tarafından arttırılır. RpoS'nin kontrolünde önemi olan DsrA, RprA [112] ve OxyS [113] adı verilen 3 küçük RNA tespit edilmiştir. Bu faktörler translasyonel düzeyde kontrolü sağlamaktadır, fakat etki mekanizmaları henüz tam olarak tespit edilememiştir [110]. Aynı zamanda DsrA'nın aşırı sentezinin global regülatör HNS'yi de düzenlediği tespit edilmiş, ancak bu etkinin önemi de henüz tam olarak bilinmemektedir [114]. Liu ve Ferenci (2001) çalışmalarında hem glukoz hem de azot açlığında *rpoS* mutant *E. coli*'nin OmpF porin sentezinde artış olduğunu göstermiştir [25]. Bu sonuca göre RpoS'nin OmpF porin proteininin üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu ortaya çıkmaktadır. OmpC sentezi üzerine ise *rpoS* mutasyonunun etkisi olmadığını ifade etmiştir. RpoS'nin hem OmpC hem de OmpF promotorları üzerinden transkripsiyonu nasıl kontrol ettiği henüz bilinmemektedir [25, 110].

1.6.5 Porin protein sentezinde H-NS'nin rolü

H-NS, *E. coli* DNA'sına birleşen proteinlerden birisi olarak bulunmuştur [75]. Yapılan çeşitli araştırmalarda eukaryotik histonlara benzer bir tarzda *in vitro* ve *in vivo*'da DNA'yı yoğunlaştırabilen bir DNA bağlanma proteini olduğunu ortaya koymuş, bu nedenle histon benzeri nükleoit proteini (H-NS) olarak adlandırılmıştır [115]. Fakat histonlar ile herhangi bir dizi benzerliğine sahip değildir. Bir çok genin düzenlenmesine karışıp genelde transkripsiyonu negatif etkileyen proteinler olduğu tespit edilmiştir [75]. H-NS bakterial nükleoidin temel bir bileşimidir ve DNA rekombinasyonu, genom stabilitesi ve gen ekspresyonu üzerine farklı etkilere sahiptir [75, 115, 116]. Yaklaşık olarak 30 genin düzenlenmesinde rolü olduğu tespit edilmiş [75] ancak sentezi nasıl kontrol ettiği henüz bilinmemektedir [102]. Çevresel şartlardan osmolarite, pH, sıcaklık, oksijen azalması ve büyüme fazı gibi faktörlerin tetiklediği genleri kontrol ettiği bilinmektedir [75]. Porin proteinlerinden OmpC ve *micF* RNA'nin düzenlenmesinde de rolü olduğu çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur [102]. *micF* RNA üzerine negatif etkisi ile OmpF'nin sentezinde artışa neden olurken, OmpC üzerine ise negatif etkisi ile sentezi azalttığı tespit edilmiştir [101]. H-NS nin ayrıca sıcaklık değişimlerine karşı porin düzenlenmesini *micF* RNA vasıtası ile sağladığı bilinmektedir [75, 117]. Ancak H-NS mutant suşları ile bu çalışmalar yapılmamıştır [102].

H-NS, RpoS sentezini hem transkripsiyonel olarak hem de RpoS stabilitesini inhibe ederek kontrol eder. Liu ve Ferenci (2001) açlık şartlarında yaptığı çalışmalarında Lrp ve Fis mutantlarında porin sentezinde bir değişim olmadığını tespit etmişlerdir [25]. Başka bir çalışmada ise IHF'nin *ompF* ve *ompC* genlerinin transkripsiyonunda hafifce azalmaya sebep olduğunu göstermişler ve bu

bağlanma proteininin *ompF* ve *ompC* genlerinin promotorlarının aşağı bölgelerine bağlanabildiği ifade edilmişlerdir [118]. H-NS, *ompC* ve *micF* arasındaki intergenik bölgeye bağlanarak porin sentezini düzenler. Liu ve Ferenci (2001) yaptığı çalışmalarında *hns* mutasyonunun OmpC sentezi üzerine pozitif bir etkisini, OmpF'nin ise oldukça baskılandığını tespit etmişlerdir [25]. Ayrıca *hns^{shim}* mutant suşunda sentezin arttığını, ancak yabani tip kadar olmadığını ifade etmişler, dolayısı ile IHF ve H-NS'nin bilinmeyen bir ilişkisini ortaya koymuşlardır [25].

StpA yeni keşfedilmiş, H-NS benzeri bir protein olup porinlerin sentezinde rolü olduğu tespit edilmiştir [102]. Bu proteinler *E. coli*'de yaklaşık olarak 15 kDa ağırlığında ve H-NS ile %58 aminoasit dizisi düzeyinde uyumlu yapılardır. Deighan ve ark. (2000) çalışmalarında StpA'nın H-NS ile birlikte OmpF sentezini kontrol ettiğini ortaya koymuşlar ve OmpF'nin StpA'ya bağımlı düzenlendiğini ifade ederek yeni bir mekanizma ortaya çıkarmışlardır [102]. Bu mekanizma, *micF* RNA stabilitesinin düzenlenmesidir. H-NS, transkripsiyonel düzeyde *micF* RNA'nın üretimini etkilerken sentezlenmiş *micF* mRNA üzerine bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir [101]. Aksine StpA'nın ise OmpF sentezini *micF* RNA'nın kendisi ile ilişkiye girerek düzenlediği ortaya konmuştur [102]. Yabani tip hücrelerde StpA etkili bir RNA:RNA ilişkisi ile, uygun olmayan bir yapı oluşturarak OmpF mRNA ve *micF* RNA arasındaki ilişkiye mani olarak OmpF sentezinin gerçekleşmesini sağlar. Değişen *micF* RNA yapısı RNAase E ile parçalanarak ortamdaki uzaklaştırılır [102]. StpA, HNS'nin represyon etkisini ortadan kaldıran şartlar altında çevresel uyarılara cevap olarak OmpF sentezini düzenlemede önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Ayrıca Deighan ve ark. (2000) çalışmalarında H-NS ile düzenlemenin sadece *micF* RNA ile olmadığını ifade etmişler, bu durumda StpA'nın direkt olarak OmpF mRNA'sı ile bir ilişkisi olabileceği ihtimalini ortaya koymuşlardır [102]. Aynı zamanda yapılan bir çok çalışma ile DNA bağlama proteinlerinden SoxRS [97], Lrp [99], HNS [101], HU [103], Rob [119] ve MarA [120]'nın *micF* promotor aktivitesini düzenlediği, dolayısı ile OmpF mRNA translasyonunu etkilediği ortaya konmuştur. StpA'nın OmpC transkripsiyonunu etkilemediği tespit edilmiştir [102].

1.6.6 Porin protein sentez mekanizmasına karışan diğer faktörler

E. coli'de HU proteinleri, bakteriyal kromozom ile birleşen, bol miktarda bulunan DNA bağlanma proteinlerinden birisidir. Bu küçük, bazik dimer protein, *in vitro*'da topoizomeraz I ile birlikte gevşemiş DNA molekülünde negatif süper sarmal meydana getirme yeteneğindeki histonlar ile aynı özelliği paylaşır ve 2 alt üniteden oluşur. HU proteini bu özelliği ile bakteriyal kromozomda DNA süper sarmal yapısını zorlayan en kuvvetli adaylardan birisidir. HU proteinleri *E. coli*'de

süper sarmalın global düzeyde düzenlenmesinde topoizomeraz ile birlikte çalışır [121]. Ayrıca, HU proteininin *oriC* bağımlı DNA replikasyonu ve DNA tamirini içeren bir çok metabolik yolda görevi olduğu gösterilmiştir [122,123]. Painbeni ve ark. (1997) çalışmalarında *hupAB* mutant suşlarında deterjan ve antibiyotiklere aşırı derecede hassasiyetin arttığını göstermişlerdir [103]. Bunun nedeni olarak OmpF porin proteininin aşırı sentezlenmesi olarak ifade edilmiş, yüksek miktarda OmpF sentezinin bu porinin negatif düzenleyicisi olan *micF* RNA ile etkileşiminin bir sonucu olarak ortaya çıktığını tespit etmişlerdir [103]. HU proteinin iki alt ünitesi eksik olan *hupAB* mutant suşları direnç genleri içerse bile anormal şekilde kloramfenikol antibiyotikğine karşı hassastır. Bu hassaslığın membran permeabilitesinde meydana gelen değişim nedeni ile olduğu vurgulanmıştır [103]. Yabani tip *E. coli*'de OmpF sentezinin düşük, OmpC sentezinin ise yüksek olduğu görülürken, *hupAB* mutant suşlarında OmpF porin proteininin oldukça yüksek düzeyde sentezlendiği, OmpC porin proteininin ise sentezinde bir değişim olmadığı tespit edilmiştir [103]. Osmotik şartlarda *hupAB* mutant suşlarında OmpF sentezinin azaldığı görülmüş ve aynı zamanda antibiyotiklere dirençde artmıştır. Ayrıca osmolariteye ilaveten sıcaklık faktöründe bu mutant suşlarda porin sentezini etkilediği ifade edilmiştir [103]. HU yokluğunda düşük osmolariteli şartlarda büyüyen hücrelerde *micF* RNA konsantrasyonunda bir azalma görülmektedir. Bu durum da OmpF miktarını arttırır [103].

IHF'nin OmpC porininin upstream bölgesine bağlanmasının *in vitro*'da OmpC transkripsiyonu üzerine negatif bir etki yaptığı tespit edilmiştir [124]. Yapılan başka bir çalışmada IHF mutant *E. coli*'nin OmpF düzeyinin çok yüksek olduğu bulunmuş, yüksek osmolariteli ortamdaki OmpF sentezinin azalması için IHF gerekli olduğu, HU proteininin ise gerekli olmadığı tespit edilmiştir [125]. Mar regülununun hem OmpF hem de *micF* RNA'da değişimlere sebep olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur [45]. *E. coli*'nin OmpF düzeyinde bir azalma ile antibiyotiklere direnç gösterdiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada *mar* mutant suşlarında *micF* RNA sentezinin artışı ile OmpF düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir [126]. Hidrofobik β -laktam antibiyotiklerin ve organik solvent moleküllerin OmpF porininden geçtiği, dolayısı ile OmpF sentezinin azalmasının veya kaybının antibiyotik ve solvent direncini ortaya çıkardığı tespit edilmiştir [127]. MarA, *micF* RNA sentezinin pozitif düzenleyicisidir ve bu RNA'nın aşırı sentezi OmpF sentezinin azalmasını tetikler [120]. Asako ve ark. (1999)'nin çalışmalarında MarA'nın OmpF sentezini osmolariteden bağımsız olarak *micF* RNA ile baskıladığı, Rob nedeni ile osmotik

stres olmadığı zaman OmpF sentezinin azaldığı ve SoxS ile osmotik stres varlığında OmpF üretiminin baskılandığı tespit edilmiştir [126].

Porin sentezinin düzenlenmesinde cAMP'nin rolünün olduğuna ilişkin çalışmalar da mevcuttur. cAMP düzeyinin N sınırlamasından daha çok glukoz sınırlamasında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [128]. Liu ve Ferenci, (2001) *cya* mutant suşlarında cAMP eksikliğinin OmpF sentezini glukoz sınırlamasında oldukça azaltmış, OmpC sentezini ise hem glukoz hem de N sınırlaması altında oldukça arttırmıştır [25]. Bunun sebebi olarak, cAMP yokluğunda OmpR'nin indüklendiği ve daha fazla OmpR-P nedeni ile *ompF*'nin baskılandığı, *ompC*'nin ise sentezinin arttığı belirtilmiştir. Diğer bir olasılık ise cAMP'nin azalması RpoS düzeyini artırır. cAMP'nin rpoS transkripsiyonunu negatif etkilediği yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir . Ayrıca Huang ve ark. (1992) çalışmalarında OmpC sentezi üzerine cAMP ilavesinin baskılayıcı bir etkisi olduğunu göstermişlerdir [129]. Huang ve ark. (1992) çalışmalarında porin transkripsiyonunda indirekt olarak cAMP/crp'nin *ompR/envZ* promotorundan sentezi hem pozitif olarak hem de negatif olarak etkilediğini ve *ompB* operonunun promotor bölgesine bağlanabildiğini göstermişlerdir [129]. Ancak Pratt ve ark. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada ise direkt bir etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür [74]. Ancak cAMP'nin porin sentezindeki rolü ve mekanistik ilişkisi tam olarak tespit edilememiştir [25].

Çevresel streslere adaptasyon yollarından birisi de DNA süper sarmal oluşumudur [130]. Büyüme oranı, osmolarite, sıcaklık ve anaerobik şartlar gen ekspresyonlarında adaptif değişimleri sağlayan DNA'nın negatif süper sarmal derecesinde değişimlere sebep olur [131, 132]. DNA'da negatif süper sarmal ile meydana gelen değişim ile osmolarite ve anaerobik şartlarda OmpR-P ile ortaya çıkan OmpC sentezindeki değişimin aynı olduğu ifade edilmiştir [132].

1.6 Kimyasal Maddelerin Bakteriler Üzerine Etkileri

Çamaşır suyu ve Klor; Çamaşır suyunun etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak yapılan deneyler sonucu elde edilen bilgiler ışığında bazı görüşler ileri sürülmüştür:

1. Klor hücre membranındaki proteinler ile birleşerek N-klor bileşikleri oluşturur ve bu son ürün hücre metabolizmasını bozarak hücrenin ölümüne neden olur.
2. Klor hücre membranına etki ederek hücre içindeki maddelerin dışarıya sızmasına ve hücrenin ölümüne neden olur.

3. Klor hücre içinde anahtar rolü oynayan enzimleri etkileyerek hücrenin ölümüne neden olur. Bu son görüş diğerlerine göre daha geçerlilik kazanmış, bunun nedeni olarak klorun hızlı antimikrobiyal etkisi gösterilmiştir

Dezenfeksiyonda çamaşır suyu kullanımının avantajları:

1. Geniş spektrumlu antimikrobiyal madde olması,
2. Hızlı bakterisidal özelliği sahip olması,
3. Kalıcı etki özelliğinin olması,
4. Kullanımının kolay olması,
5. Suda erime özelliğinin olması,
6. Konsantre ve seyreltilmiş formlarında stabil olması,
7. Kullanım konsantrasyonunda toksik olmaması,
8. Organik ve inorganik bileşikler oksitleyerek ortaya çıkan klorun zehirleyici özelliğinin olmaması,
9. Koku giderici, renksiz, yanıcı ve boyama özelliğinin olmaması ve ucuz olması

Dezavantajları:

1. Mukoz membrana irritasyon etkisinin olması,
2. Bazı kimyasal maddelerle reaksiyonlara girerek toksik klor gazının oluşması,
3. Konsantre olarak kullanıldığı zaman kokulu olması,
4. Organik maddeler varlığında etkisinin azalması,
5. Bazı metallerle karşı olumsuz etki yapması

Klor; Klor bileşiklerinin en aktif olan hipoklorit'in (HOCl), karbonhidrat metabolizmasında önemli bazı enzimleri sülfidril gruplarının klorla oksidasyonu vasıtasıyla glikozu inhibe ederek mikrobiyal hücreyi öldürdüğü görüştür [133].

Klorun dezenfektan bir etki göstermesi konusunda ileri sürülen diğer olasılıklar:

1. Protein sentezini bozulması.
2. Aminoasitlerin nitritler ve aldehitlerle oksitativ dekarboksilasyonu.
3. Nükleik asitler, purinler ve primidinlerle oluşturduğu reaksiyonlardır.
4. Anahtar enzimlerin tahrip olması sonucu metabolizmadaki sentezlenme bozuklukları.
5. DNA'da bozulma sonucunda DNA transformasyon yeteneğinde azalmanın görülmesi.
6. Oksijen kullanımı ve oksidatif fosforilasyon ve inkübasyonu ile beraber bazı makro moleküllerin hücre dışına sızması.
7. Sitozin'in toksik N-klor türevlerinin oluşumu
8. Kromozomal bozuklukların oluşumu [133].

Gıda endüstrisinde organik temele veya anorganik temele dayalı aktif klor bileşikleri kullanılmaktadır [134]

Hidrojen peroksit; Hidrojen peroksit (H_2O_2) özellikle aseptik paketlemede kullanılan plastikte kaplanmış mukavva kutular, teneke güğümler, kaplar ve kapların yüzeylerini sterilize etmek için kullanılmaktadır. Sterilize edilecek yüzeyler, sörfektan içeren %15'lik H_2O_2 çözeltisi ile 3-4 dakika temas ettirildikten sonra yüzey $105^\circ C$ 'ye ısıtılarak hidrojen peroksit buharlaştırılır. Bir başka yöntem ise %35'lik hidrojen peroksit çözeltisini $80^\circ C$ ' de 8-9 saniye süre ile söz konusu yüzey ile temas ettirilmesidir [133].

Hidrojen peroksit Gram(+) ve Gram(-) mikroorganizmalar karşı oldukça etkilidir. H_2O_2 su ve oksijene parçalandığında kullanımı ile artık madde problemi de söz konusu değildir. Hidrojen peroksit, oksidatif etkisi nedeni ile mikroorganizmaların biyolojik aktif sistemlerine dönüşümsüz şekilde zarar vermekte ve onları böylelikle öldürmektedir. H_2O_2 korozyona neden olmamaktadır. Bu madde, dezenfektan olarak örneğin UHT sütün aseptik dolumundan önce ambalaj materyalinin sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Burada yüksek konsantrasyon (%25-50) ve yüksek sıcaklık ($60-100^\circ C$) ile çalışılmakta ve böylelikle birkaç saniyede *Bacillus* sporları dahil, mikroorganizmaların tamamen öldürülmesi mümkün olmaktadır [134].

Formaldehit; Dezenfektan olarak en yaygın kullanılan aldehit; formaldehittir ($HCHO$). Formaldehitin sudaki %35-40 lık çözeltisini formalin adı verilmektedir. Aldehitler, bakterilere,

virüslere, bakteri sporlarına, küflere ve mayalara karşı geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Aldehitlerin mikrobisit etkisi mikroorganizmaların hücre proteinlerinin fonksiyonel grupları ile reaksiyonlarından ileri gelmektedir. Etkili olduğu pH aralığı genellikle hafif asidikten nötral pH değerine kadardır. Aldehitlerin asidik solüsyonlarla karıştırılması mümkündür. Ancak, alkalilerle karıştırmak mümkün değildir. Sıvı şeklindeki formaldehid formol (formalin) %37-40 oranında formaldehid ihtiva eder. Formaldehid, proteinlerin karboksil, hidroksil, veya SH gibi fonksiyonel gruplarını alkile eder. Bu grupların alkile olması ile proteinler inaktive olurlar. Alkilasyon, hidrojen atomları yerine hidroksimetil grubunun girmesiyle meydana gelir. Formaldehid bakteriler ve sporlar üzerine etkilidir. Gaz halindeki formaldehit deri, mukoz membranlar ve göze yakıcı, aşındırıcı etki etmektedir [14].

SDS (Deterjanlar); Sentetik deterjanlar yüzey gerilimini düşürme ve ıslatma yetenekleri olması nedeniyle yüzey aktif maddeler olup, hidrofobik ve hidrofilik gruplara sahiptirler. Hidrofobik kısım, uzun zincirli hidrokarbonlardan oluşmuştur. Sentetik deterjanlar kendilerinde bulunan hidrofilik polar grupların kimyasal karakterlerine göre 3 kısma ayrılırlar [14].

a) Katyonik deterjanlar: Bunlar quaternar amonyum bileşiklerinden oluşmuş yüzey aktif maddelerdir. Kendilerinde bulunan hidrofobik kısım, pozitif elektrikle yüklü olan hidrofilik kısım ile denge halindedir. Böyle bir madde bakteri ile karşı karşıya gelirse pozitif yüklü kısım, bakterinin negatif elektrikle yüklenmiş olan ve membranda bulunan fosfolipidlerin fosfat kökü ile reaksiyon verir. Bu sırada deterjanın polar olmayan kısmı da membranın hidrofobik olan porsiyonlarının içine girerek etkisini sürdürür. Bu durum, bakterideki yarı geçirgenlik özelliğini bozar ve membranda bulunan fosfor, nitrogen, protein, lipid ve diğer önemli substanslar arasındaki bağlantılarda kopmalar meydana getirir. Böylece, membrandaki maddeler arasındaki bütünlük bozulur. Dezenfektan hücre içine girdikten sonra da etkisine devam ederek çok önemli göreve sahip olan enzimleri denatüre ve inaktive eder [14].

Katyonik deterjanlar, Gram pozitif ve negatif mikroplar için bakterisidal etkiye sahiptirler. Anyonik deterjanlarla aralarında uyumsuzluk bulunduğundan, birbiriyle olan karışımları etkisiz kalır. Bu nedenle katyonik deterjanlar, anyonik olmayanlarla birleştirilebilirler. Alkali sular aktivitelerini arttırır. Asidik ve sert sularda presipitasyon göstermezler [14].

b) Anyonik deterjanlar: Anyonik deterjanlar suda dissosiyeye oldukları zaman negatif elektrikle yüklü iyonlar meydana getirirler ve düşük pH'da bile aktivite gösterebilirler. Anyonik

deterjanlar arasında sabunlar önemli yer tutarlar. Bunlar yüksek yağ asitlerinin sodyum veya potasyum tuzlarıdır. Yumuşak sabunlar KOH ile ve sert sabunlar da NaOH ile elde edilirler. Sabunlar, yüzey gerilimini düşürür ve suyun ıslatma kabiliyetini arttırlar. Birçok maddeler sabunlara katılarak kullanılabilirse de, ancak, bu maddelerin esas etkisi de azalabilir. Örn. kresol ihtiva eden sabunun etkisi, sadece kresoldan daha azdır [14].

Anyonik deterjanların tesiri genellikle Gram pozitif etkenlere karşıdır. Gram negatiflere etkisi çok zayıftır. *S. pneumoniae* ve *T. pallidum* etkenleri üzerine bakterisidal tesire sahiptir. Anyonik deterjanlar arasında sabunlardan ayrı olarak sodyum lauryl sulfat ve alkil benzen sulfonat da bulunur [14].

c) İyonik olmayan deterjanlar: İyonik olmayan deterjanlar arasında polieter ve poligliserol esterler vardır. Bunlar etkili bir antiseptik veya dezenfektan olmayıp, derideki bakterileri saponifikasyonla (mikropların içine girerek lipoid maddeyi saponifiye ederek) giderirler. Böylece, ellerin sabunla yıkanması mikropların giderek azalmasına yol açar [14].

Etanol; Etil alkol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$, etanol): etil alkol, genellikle, mikrobiostatik etkiye sahip olup derinin dezenfeksiyonunda kullanılan bir antiseptiktir. Dezenfeksiyon amacı ile %50-70 oranında sulandırılarak kullanılır. Metil alkol ($\text{CH}_3\text{.OH}$) etkisi etanoldan daha zayıftır [14].

Alkoller, genellikle, hücre membranındaki hidrokarbon molekülleri ile bağlantı kurmuş lipidleri ayırarak bunlara etkilerler. Deri üzerinde lipoidal sekretlerde bulunan mikroplara da bu sekretleri eritmek suretiyle tesir ederler. Organik solventlerin sporlar üzerine etkisi yoktur. Mikroorganizmalar üzerine olan tesiri de zayıf olduğundan dezenfeksiyon amacı ile kullanılamazlar [14].

1.7 Çalışmanın Amacı

Bir çok kimyasal madde doğaya evsel yada fabrika atıkları ile karışmaktadır. Bu atıklar doğal ortamlarda bakterielrin yaşamına çeşitli etkilerde bulunduğu bilinmektedir. Bu etki bazı durumlarda halk sağlığı açısından oldukça ciddi sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu sebeple mikroorganizmaların çeşitli kimyasal maddelere karşı gösterecekleridirenç mekanizmalarının tespit edilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca doğal ortam ile laboratuvar şartları arasında bazen farklar görülmektedir. Halk sağlığı açısından bakterilerin geliştirmiş oldukları direnç mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışmada farklı dezenfektan özellikli kimyasal maddelerden seçilen

formaldehit, klor, çamaşır suyu, H₂O₂, deterjan (SDS), etanol'ün porin protein sentezine zengin besiyeri olan nutrient brotta etkisine ve bu sentezdeki değişimde RpoS, H-NS, EnvZ ve Acp'ın rolü araştırılmış, böylece kimyasal maddelerin varlığında OmpC ve OmpF sentez mekanizması özölmeye çalışmıştır.

2. MATERYAL METOD

2.1. Kullanılan *E. coli* Suşları

Bu çalışmada kullanılan *E. coli* yabancı tip ve mutant suşları yurt dışından temin edilmiş (H. Kobayashi-Chiba Üniv., Japonya; T. Ferenci-Sidney Üniv., Avustralya; R. G. Matthews-Michigan Üniv., USA; T. J. Silhavy-Princeton Üniv., USA) ve Çizelge 2.1’de özellikleri verilmiştir. Antibiyotik direnç özelliklerini koruyup korumadıkları test edilmiştir. Daha sonra %20 gliserol (Merck) içeren Nutrient brot’da (Merck) stokları hazırlanmış ve derin dondurucuda -20 °C’de saklanmıştır. Çalışmalar sırasında Nutrient agar besiyerinde üretilmiş ve taze kültür olarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan *E. coli* strainleri ve özellikleri

Bakteri	Genotip	Kaynak
MH225	MC4100 U(<i>ompC-lacZ</i> ⁺)10-25 (yabancı tip)	[25]
MH513	MC4100 <i>araD</i> +U(<i>ompF-lacZ</i> ⁺)16-13 (yabancı tip)	[25]
BW3343	MH513 <i>envZ60::Tn10</i>	[25]
BW3345	MH225 <i>envZ60::Tn10</i>	[25]
BW3303	MH513 <i>ompR::Tn10</i>	[25]
BW3304	MH225 <i>ompR::Tn10</i>	[25]
BW3301	MH513 <i>rpoS::Tn10</i>	[25]
BW3302	MH225 <i>rpoS::Tn10</i>	[25]
BW3305	MH513 <i>hns::neo</i>	[25]
BW3306	MH225 <i>hns::neo</i>	[25]
BW3601	MH513 <i>pta::kan</i>	[25]
BW3602	MH225 <i>pta::kan</i>	[25]

2.2. Besiyerleri

2.2.1. Nutrient agar besiyeri

Bu besiyeri bakterilerin stok olarak buzdolabında saklanması ve koloni sayımlarında kullanılmıştır. 20 g Nutrient agar (Merck) 1 L distile suda eritilerek otoklavda (Nüve) 121 °C’de 15 dk steril edildi ve petrilere dökülerek hazırlandı.

2.2.2. Nutrient brot besiyeri

Nutrient brot besiyeri bakterilerin üretilmesinde ve zengin besiyerinde porin protein sentezinin araştırıldığı deneylerde üreme ortamı olarak kullanıldı. 8 g Nutrient brot (Merck) tartılarak 1 L suda eritildi. Daha sonra 121 °C’de 15 dk otoklav ile steril edildi.

2.3. Kimyasal Maddelerin besiyerine aktarılması

Yabani tip ve mutantlar 5 ml NB besiyerinde 24 saat 37 °C de 160 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. Daha sonra bu örneklerden 100 µl bakteri örneği alınarak 50 ml NB bulunan besiyerlerine aktarıldı. 37 °C’de 160 rpm de 3 saat inkübasyondan sonra 0.1-0.2 absorbansa gelince belirlenen konsantrasyonlarda kimyasal maddeler ilave edildi. Final konsantrasyonları H₂O₂ 0,00576 M, Etanol 0,6 M, Formaldehit 0,004 M, SDS 0,012 M, ve Klor 1,96 ppm, Çamaşır suyu olarak kullanılan kimyasal madde ise Domestos’un satışı olan ürününün %10 luk sulandırılmış stok solusyonundan 35 µl/ml olacak şekilde kimyasal maddeler ilave edildikten sonra inkübasyona devam edildi.

2.4. β-Galaktosidaz Enzim Aktivitesi Ölçümleri

Zengin besiyerinde belirlenen dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin yabani tip ve mutant *E. coli*’nin OmpC ve OmpF porin sentezi üzerine etkisinin tespitinde raportör gen olan β-Galaktosidaz enzim aktivitesi kullanıldı. β-Galaktosidaz aktivitesi ölçümleri Miller (1992)’in yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemine göre elde edilen veriler Miller Ünitesi olarak adlandırılmaktadır [135]. Miller ünitesi, Bakteri başına dakikadaki o-nitrofenil deki artışı ifade etmektedir. β-Galaktosidaz’ın bir ünitesi 28 °C de 1 dakikada 1nmol ONPG’yi hidrolize eden enzim miktarı olarak ifade edilir. Spektrofotometrik olarak ölçümü yapılan, ONPG’nin enzim tarafından parçalanması sonucunda açığa çıkan o-nitrofenil miktarıdır. Ortamda laktoz olmadıkça normal β-galaktosidaz aktivitesi göstermeyeceği için, ölçülen enzim aktivitesi mutasyonel olarak eklenen raportör genin aktivitesidir.

5 ml Nutrient brot besiyerine ekimi yapılan yabani tip ve mutant suşlar 37 °C de 160 rpm de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 100 µl bakteri örneği hazırlanan ve steril 50 ml NB içeren 100 ml lik erlenlere aktarıldı. Bu erlenler 37 °C de 160 rpm hızda inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık 3 saatlik inkübasyon sonunda spektrofotometrik olarak OD 600 de ölçüm yapılarak bakteri yoğunluğunun 0.1-0.2 arasına gelip gelmediği kontrol edildi. Bu yoğunluk elde edildiğinde etkisine

bakılacak kimyasal maddelerin belirlenen konsantrasyonları ilave edildi. Kimyasallar ilave edilmeden önce β Galaktosidaz aktivitesi için örnekler alındı. Ayrıca bakteri yoğunluğunu ölçmek için 1 ml bakteri içeren nutrient brot alındı. Bu örnek spektrofotometrede 600 nm’de bakteri olmayan steril nutrient brota karşı okunarak bakteri yoğunluğu ölçüldü. β -Galaktosidaz aktivitesi için alınan 100 μ l örnek üzerine 900 μ l Z tampon ilave edildi. Daha sonra üzerine pastör pipeti ile bir damla konsantre toluen (Sigma) damlatıldı. Kısa bir süre karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 45 dk 160 rpm de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 45 dk sonra alınan örnekler 28 °C’ye ayarlanmış su banyosuna alınarak 5 dk bekletildi ve üzerine ONPG (Sigma) stoğundan (4 mg/ml ONPG) 200 μ l ilave edilerek 10 dk su banyosunda inkübasyona bırakıldı. 10 dk sonra örneklerin üzerine 1 M Na₂CO₃ (Carlo Erba) den 500 μ l ilave edilerek enzimin reaksiyonu durduruldu. Daha sonra 420 nm de o-nitrofenol miktarı ve 550 nmde ise ışık dağılımı spektrofotometrede ölçüldü.

Elde edilen değerler formüle göre hesaplandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550})}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

t = Inkübasyon zamanı (dk olarak)

V = Ölçümü yapılmak için kullanılan örnek miktarı

OD₆₀₀ = Ölçümü yapılan örneğin bakteri konsantrasyonu

OD₄₂₀ ve OD₅₅₀ = Numunelerin 550 ve 420 nm’de okunan değerleri

Z tamponu hazırlanması: 60 mM Na₂HPO₄ (Merck), 40 mM NaH₂PO₄.2H₂O (Merck), 10 mM KCl (Merck), 1 mM MgSO₄.7H₂O (Merck), 50 mM β -Mercaptoetanol (Sigma), 1000 ml’de hazırlanarak 4°C de saklandı.

3. BULGULAR

3.1. Zengin Besiyerinde *E. coli*'nin OmpC ve OmpF Porin Protein Sentez Durumu

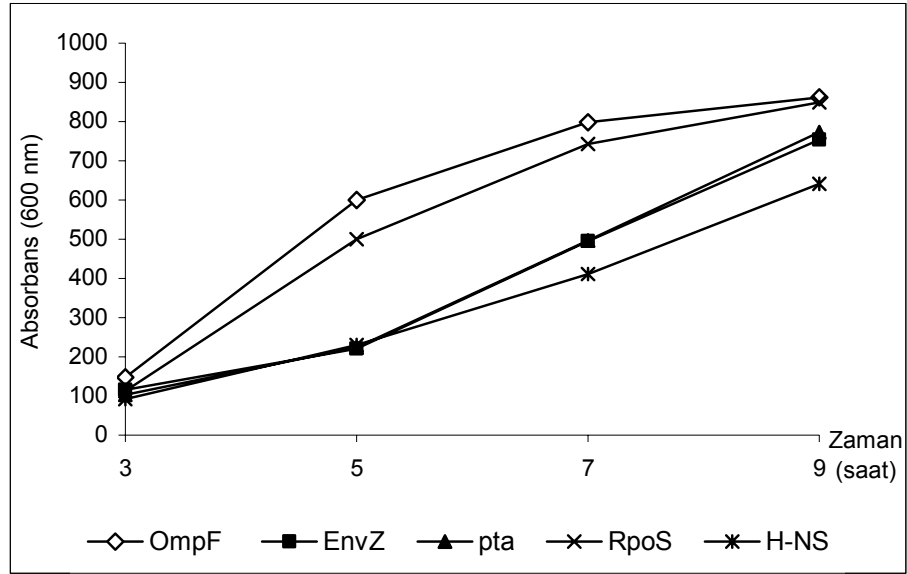
Bu çalışmanın amacı besiyerine ilave edilen dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *E. coli* OmpC ve OmpF porin protein sentezini nasıl etkilediğini ve bu sentezi düzenleyen faktörleri tespit etmektir. Şekil 3.1'de 9 saatlik 37 °C de 160 rpm çalkalama hızı ile inkübasyon süresince yabancı tip (MH513) ve mutantların üreme grafikleri çıkarılmıştır. Yabancı tip *E. coli* 5. saatte 600 absorbansa erişirken *rpoS* mutasyonunda 500 ve diğer mutasyonlarda ise 220 absorbans yoğunluğa ulaşmıştır. Buradanda görüldüğü gibi *hns*, *pta* ve *envZ* mutasyonlarının *E. coli*'yi üreme açısından 9 saatlik periyot içinde etkilediği belirlenmiştir. *rpoS* mutasyonunun çok fazla etkilemediği görülmektedir.

Aynı şekilde Şekil 3.2 de MH225 yabancı tip ve mutantlarının yaşam grafikleri incelendiğinde *hns*, *pta* ve *envZ* mutasyonlarının 9 saatlik inkübasyon süresince yabancı tip *E. coli*'ye göre (MH225) daha yavaş üreme gösterdiği belirlenmiştir.

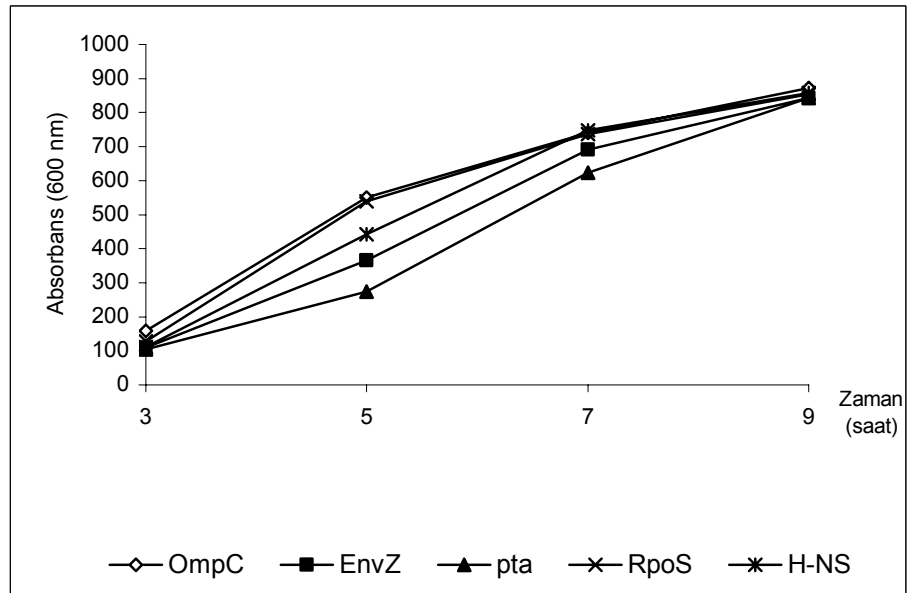
Her iki grafikteki sonuçların yaklaşık olarak aynı çıkması beklenen bir sonuç olup *E. coli* ilk 5 saat içinde eksponential büyüme periyodunda olup hızlı bir şekilde bölünerek çoğalmaktadır. Bu çoğalmanın yapılan mutasyonlardan *hns*, *pta* ve *envZ* ile etkilendiği ve bu bölünme süresinin uzaması dolayısı ile ikiye katlanma zamanının değişmesine sebep olduğu görülmektedir. 7. saatte eksponential büyümenin hemen hemen sonlandığı, ikiye katlanma zamanının uzadığı ve bu aşamadan sonra durgunluk fazına girdiği söylenebilir.

Zengin besiyeri olarak kullanılan Nutrient Brot besiyerinde yabancı tip *E. coli* ve mutantlar üretildiği zaman üreme sırasında OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentezi β -Galaktosidaz aktiviteleri ölçülerek tespit edilmiştir. Şekil 3.3 ve 3.4 de görüldüğü gibi üreme sırasında 3. saatte OmpF sentezinin yaklaşık 5 katlık bir artışla 1029 Miller ünitesine ulaştığı daha sonra yavaş yavaş azaldığı tespit edilmiştir. OmpC sentezi ise (Şekil 3.4) zaman periyodu içinde 9. saate kadar yavaş yavaş yükselmiş, beklendiği gibi OmpC ve OmpF porin protein sentezinin birbirine zıt olarak çalıştığı görülmüştür. Şekil 3.3 de görüldüğü gibi *E. coli*'nin *rpoS* geni mutasyona uğratıldığında başlangıç aşamasından itibaren yabancı tip *E. coli*'ye göre oldukça yüksek sentez olduğu belirlenmiştir. 3. saatte 900, 5. saatte yaklaşık yabancı tiple aynı, 7 ve 9. saatlerde ise yabancı tipten yüksek sentez olduğu görülmektedir. EnvZ sensörünün mutasyona uğratılması sonucunda hem OmpC hemde OmpF sentezinin oldukça azaldığı ve bu sensörün her iki porinin sentezinde ne kadar

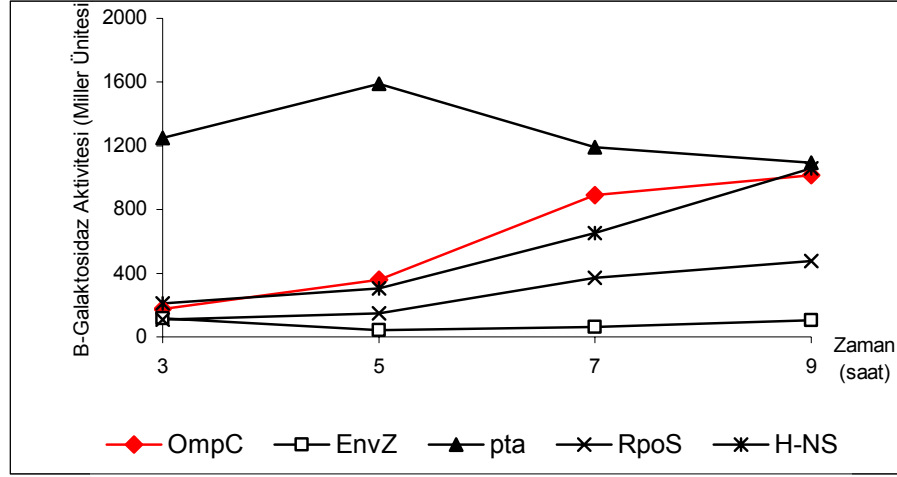
önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 3.1 ve 3.2). Ancak *envZ* mutasyona uğratılmış olsada her iki porinde belirli miktarda sentezlenmektedir. Buda EnvZ olmadan da OmpC ve OmpF nin başka faktörlerin kontrolü ile sentezlerinin gerçekleşebildiğini göstermektedir.



Şekil 3.1 Zengin besiyerinde yabancı tip *E. coli* (MH513) ve mutant strainlerin üreme grafiği



Şekil 3.2 Zengin besiyerinde yabancı tip *E. coli* (MH225) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.3 Zengin besiyerinde yabani tip *E. coli* ve mutant strainlerin OmpC porin protein sentezi

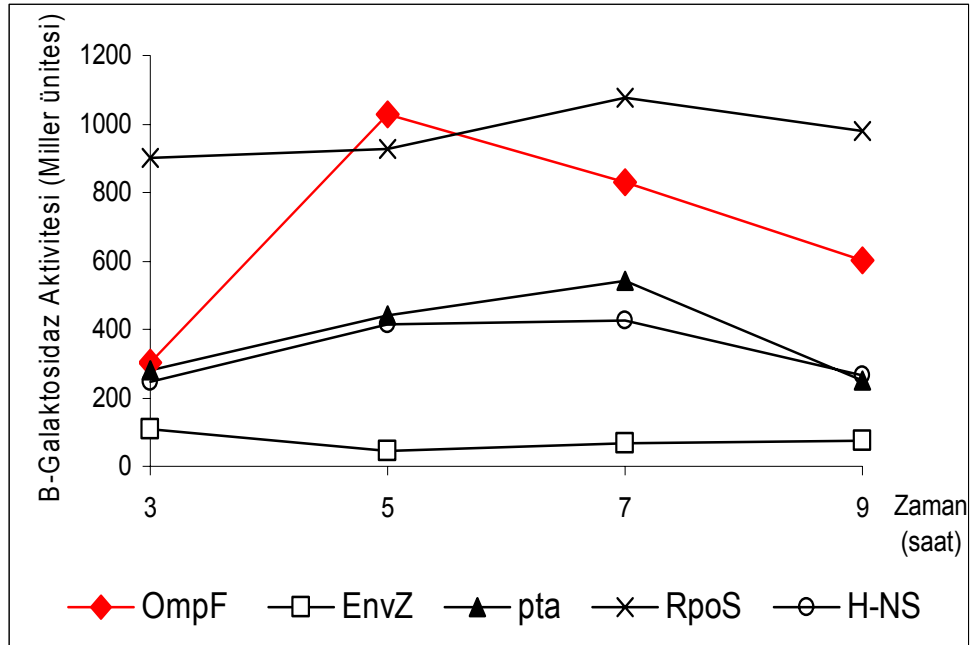
Çizelge 3.1 Yabani tip *E. coli* (MH225) ve mutantların OmpC protein sentez düzeyi verileri

	MH225	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	175,24	115,98	1251,15	110,31	211,31
5. saat	358,34	41,93	1589,09	148,91	306,27
7. saat	889,11	62,59	1190,38	369,19	654,30
9. saat	1016,02	106,87	1095,01	477,12	1059,66

Pta enziminin mutasyona uğratılması ile Acp sentezi ortama asetat ilave edilmedikçe gerçekleşmemektedir. Dolayısı ile Acp eksikliği ortaya çıkmaktadır. Acp eksikliğine neden olan *pta* mutasyonu sonucunda OmpC sentezinin oldukça arttığı (Çizelge 3.1), 9. saatte yabani tip ile yaklaşık aynı miktarda olduğu görülmektedir. OmpF sentezinin ise yabani tipe göre azaldığı yada yabani tipte görülen artışın *pta* mutasyonunda görülmediği tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Dolayısı ile Acp eksikliğinin OmpF artışına engel olduğu ifade edilebilir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların OmpF protein sentez düzeyi verileri

	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	302,79	109,59	282,11	902,50	248,25
5. saat	1029,00	43,43	440,41	928,30	414,10
7. saat	829,88	66,90	541,97	1075,07	426,14
9. saat	600,23	73,73	251,22	978,75	266,19

**Şekil 3.4** Yabani tip *E. coli* ve mutantların OmpF porin protein sentezi

3.2. Zengin Besiyerinde Kimyasal maddelerin *E. coli*'nin OmpC ve OmpF Porin Protein Sentez Düzeyine Etkisi

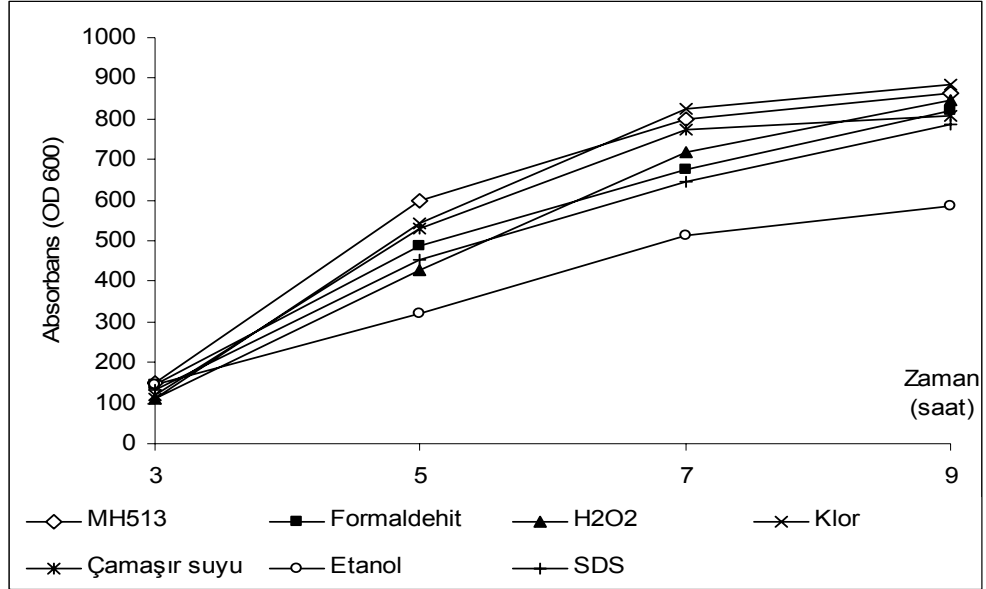
Besiyerine mikroorganizmaların ekimi yapıldıktan sonra 3 saat 37 °C de 160 rpm de inkübasyona tabii tutuldu. 3 saat sonunda 1'er ml örnek alınarak spektrofotometrik olarak 600 absorbans karşılığı yoğunluk ölçümleri gerçekleştirildi. 0.1- 0.2 absorbans aralığında olan bakteri örneklerinden β -Galaktosidaz aktivitesi ölçümleri için 0.1 ml örnek alındı. Daha sonra yabani tip ve mutantların olduğu besiyerlerine belirlenen miktarlarda kimyasal maddeler ilave edildikten sonra

aynı şartlarda tekrar inkübasyona bırakıldı. 5, 7, ve 9. saatlerde örnekler alınarak β -Galaktosidaz aktivitesi ve bakteri yoğunluğu için örnekler alındı ve OmpC ve OmpF porin protein sentezindeki değişimler tespit edildi.

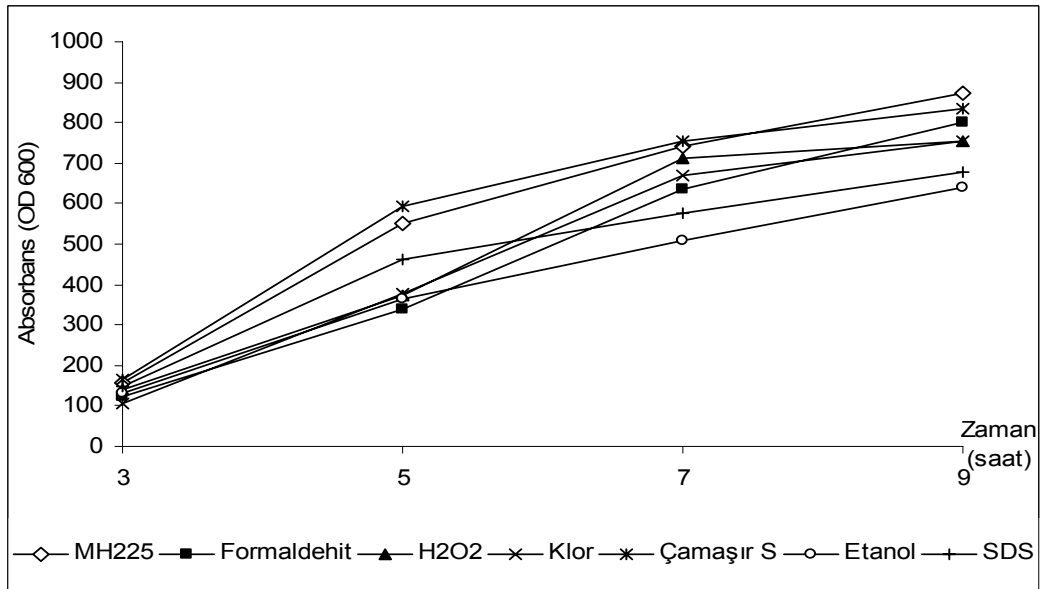
Elde edilen sonuçlara göre Şekil 3.5 ve 3.6 daki grafikler incelendiğinde yabani tip MH225 ve MH513 kimyasal maddelerin ilave edilmesi ile üreme hızlarında yavaşlama olduğu açıkça görülmektedir. Özellikle etanol ve SDS ilave edildiğinde üremenin oldukça yavaşladığı görülmektedir.

Şekil 3.7 deki verilerde OmpF porin sentezindeki değişime bakıldığında zaman yabani tip *E. coli*'nin (MH513) OmpF porin sentezi 5. saate kadar 1030 Miller ünitesine ulaşırken daha sonra 7. saatte 830, 9. saatte ise 600 Miller ünitesine azalmıştır. Besiyerine 3. saatte H₂O₂, Klor ve Çamaşır suyu ilave edildiğinde 5. saatte OmpF sentezinin yabani tip ile aynı olduğu hiçbir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Ancak 5. saatten sonra Çamaşır suyu ve H₂O₂ ilave edilen örneklerin yabani tip OmpF sentezine göre daha fazla sentezlendiği belirlenmiştir. H₂O₂ ilave edilen örnekler 898 Miller ünitesi, Çamaşır suyu ilave edilen örneklerde ise 785 miller ünitesi OmpF sentezi belirlenmiştir. Kontrolde ise 600 ünite sentez olduğuna göre bu iki kimyasal madde ilavesi OmpF sentezini arttırmıştır. Formaldehit, etanol ve SDS ilave edilen örneklerde ise OmpF sentezinin yabani tipe göre oldukça azaldığı görülmektedir. 5. saate kadar yabani tipte görülen artışın çok altında formaldehit ilavesinde 591, etanol ilavesinde 524 ve SDS ilavesinde ise 500 miller ünitesi sentez elde edilmiştir. Yabani tipte ise 1030 ünite sentez olması bu maddelerin sentezi oldukça yavaşlattığını göstermektedir (Çizelge 3.3).

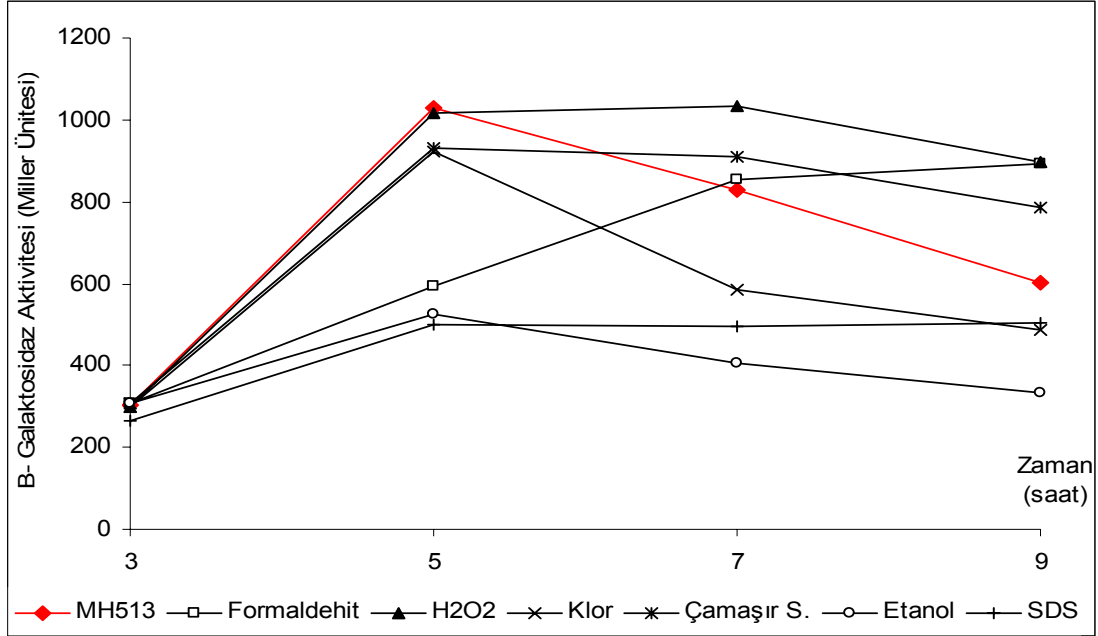
OmpC sentezi üzerine kimyasal maddelerin etkisine bakıldığında zaman şekil 3.8 deki veriler incelendiğinde Etanol ilavesinin OmpC sentezini değiştirmediği görülmüştür. Yabani tip ile yaklaşık aynı sentez miktarına sahip olması etanol ilavesinin OmpC sentezini değiştirmediğini göstermektedir (şekil 3.8 ve çizelge 3.4). Ancak büyüme oranına bakıldığında zaman yabani tipten daha yavaş bir oran gösterdiği de görülmektedir (şekil 3.6). Çamaşır suyu ve SDS ilavesi ise ilave edildikten sonraki 5. saatte yabani tipten daha fazla OmpC sentezi sağlarken 7. ve 9. saatlerde ise yaklaşık olarak yabani tip ile aynı sentez oranı gösterdiği tespit edildi. (çamaşır suyu 1117, SDS 1152 Miller ünitesi, yabani tip ise 1016 Miller ünitesidir).



Şekil 3.5 Farklı kimyasal maddelerin etkisinde yabancı tip *E. coli*'nin (MH513) üreme grafiği



Şekil 3.6 Farklı kimyasal maddelerin etkisinde yabancı tip *E. coli*'nin (MH225) üreme grafiği



Şekil 3.7 Farklı kimyasal maddelerin yabani tip *E. coli*'nin (MH513) OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi

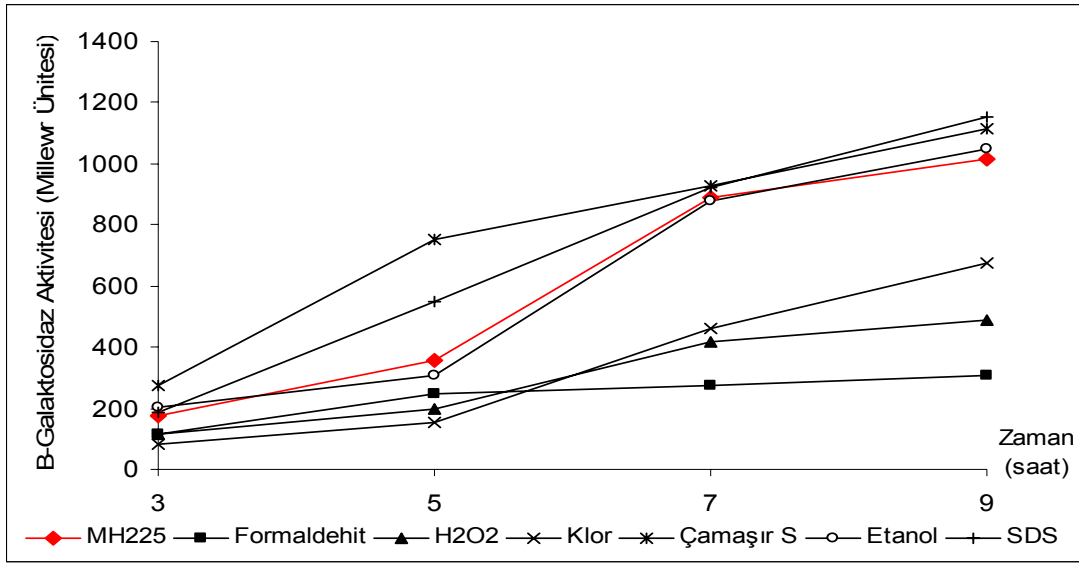
Çizelge 3.3 Farklı kimyasal maddeler ile büyüyen yabani tip *E. coli*'nin OmpF sentez düzeyi

	MH513	Formaldehit	H ₂ O ₂	Klor	Çamaşır Suyu	Etanol	SDS
3. saat	302,79	308,35	300,06	300,33	305,54	307,81	264,64
5. saat	1029,00	591,74	1015,33	921,83	928,96	524,43	499,10
7. saat	829,88	853,00	1033,98	583,54	908,96	404,36	495,61
9. saat	600,23	891,66	898,28	488,70	785,79	333,00	504,05

Çizelge 3.4 Farklı kimyasal maddeler ile büyüyen yabani tip *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyi

	MH225	Formaldehit	H ₂ O ₂	Klor	Çamaşır Suyu	Etanol	SDS
3. saat	175,24	114,50	114,54	81,87	277,19	201,74	186,54
5. saat	358,34	246,59	195,78	153,61	752,72	306,43	547,98
7. saat	889,11	276,78	419,99	462,23	925,79	877,68	921,95
9. saat	1016,02	308,99	490,80	675,18	1117,04	1051,10	1152,73

Şekil 3.8 den de açıkça görüldüğü gibi test edilen kimyasal maddelerden Formaldehit, Klor ve H₂O₂ ilave edildiği zaman yabancı tipte görülen artışın olmadığı daha düşük OmpC sentezi olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 5. saatten sonraki inkübasyon sürecinde yabancı tipte OmpC sentezi artarken bu 3 kimyasaldan formaldehitin sentezi durdurduğu görülmektedir.



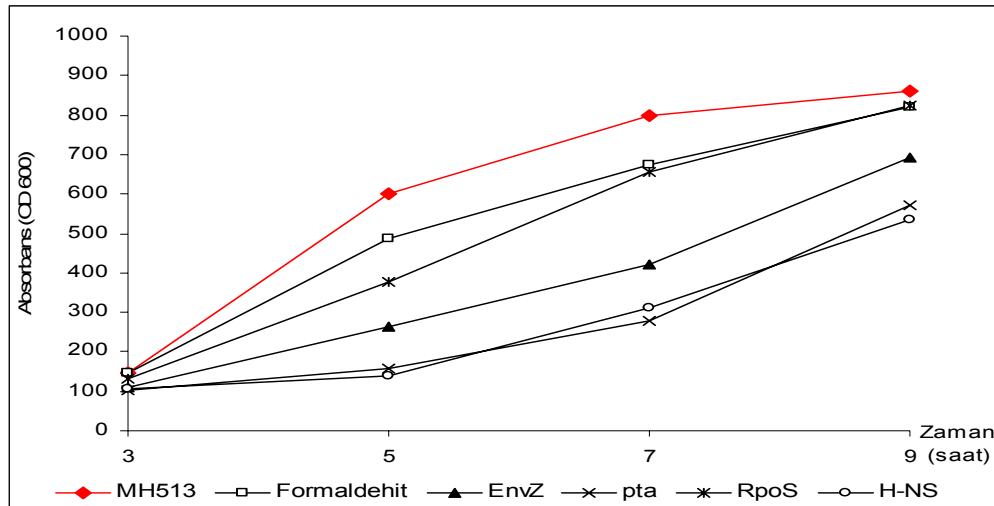
Şekil 3.8 Farklı kimyasal maddelerin yabancı tip *E. coli* nin OmpC porin protein sentez düzeyine etkisi

3.2.1 Formaldehitin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi ve sentezi kontrol eden faktörler

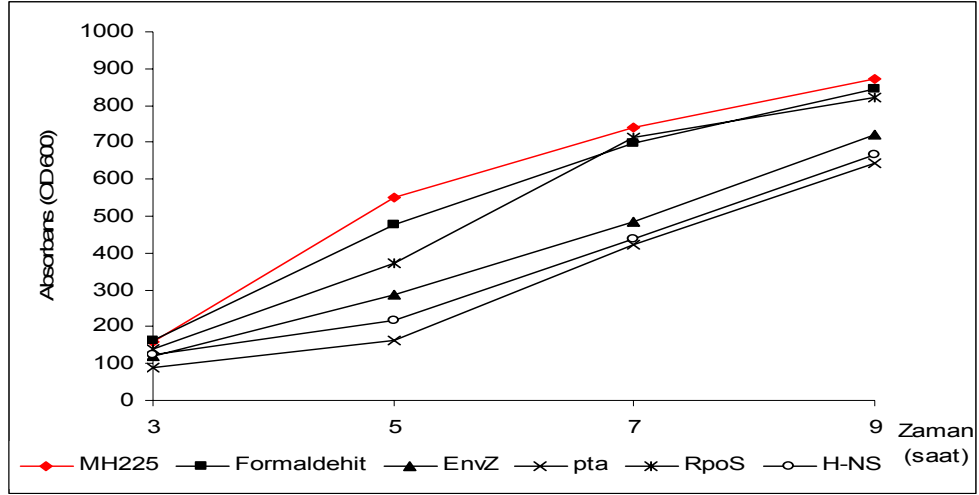
Besiyerine 0.004 M formaldehit katılması sonucunda yabancı tip ve mutantların üreme grafiklerine bakıldığında (şekil 3.9 ve 3.10) kontrole göre azalma olduğu görülmektedir. Formaldehit bakterilerin üreme hızlarına ve ikiye katlanma sürelerini etkilemiştir. Özellikle şekil 3.9 dan görüldüğü gibi *hns*, *pta* ve *envZ* mutasyonlarının *E. coli*'nin formaldehit olan ortamda üremesinde önemli görevi olduğu söylenebilir. Aynı şekilde şekil 3.10 da da aynı mutasyonların üremeyi oldukça etkilediği görülmektedir. *rpoS* mutasyonunun formaldehitli ortamda üreme açısından çok önemli denilebilecek bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Hem şekil 3.9 hemde şekil 3.10 da *rpoS* mutasyonu açısından benzer sonuçları yansıtmaktadır.

Yabani tip *E. coli* (MH513) normal besiyerinde üreme sırasında 5. saate kadar 1029 miller ünitesi OmpF porin sentezine ulaşırken daha sonra azalmaktadır. Ortama formaldehit ilave edildiğinde 5 saate kadar olan hızlı artışın yerine yavaş yavaş bir artış söz konusu olduğu görülmektedir. Kontrol örneğinde 1029 ünite, formaldehit ilave edilmiş yabani tipte ise 600 ünite sentez olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile OmpF sentezini Formaldehit ilavesinin azalttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde *envZ*, *hns* ve *pta* mutasyonlarındada 3. saat değerlerine göre azaldığı ancak 5 saatten sonra artmaya başladığı görülmektedir. Burada dikkat çekici bir sonuç olarak *rpoS* mutasyonunda formaldehit ilavesinin sentezi oldukça azaltmış olmasıdır. Bu durum *rpoS* mutasyonunun kontrol örneklerinde yabani tipten daha fazla bir sentez sağladığı görülürken formaldehit ilavesinin yabani tipten daha düşük OmpF sentezi ortaya koyması *rpoS* mutasyonunun formaldehit varlığında OmpF sentezi için önemli olduğunu göstermektedir (çizelge 3.5).

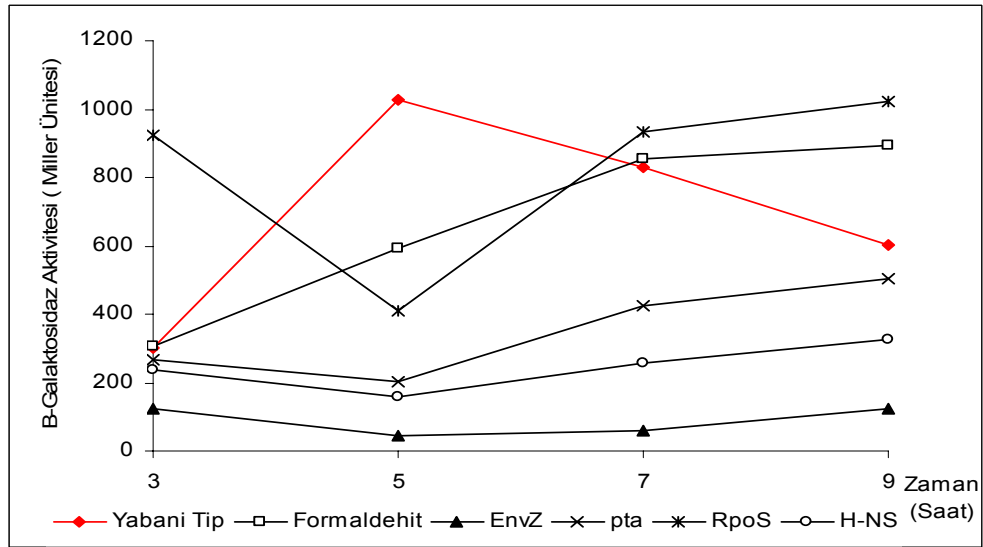
Şekil 3.12'deki sonuçlara göre OmpC sentezinde formaldehit ilave edildiği zaman dikkat çekici bir değişim olmadığı görülmektedir. Yaklaşık olarak kontrol örneği ile aynı oranda sentez tespit edilmiştir. 3. saatten sonra ilave edilen formaldehitin 5. saatte sentezde çok az da olsa bir azalmaya sebep olması adaptasyon süreci içinde bu proteininde sentezinin ayarlandığı ancak sonradan kontrol örneğindeki gibi bir sonuç verdiği görülmektedir. *envZ*, *hns* ve *rpoS* mutasyonlarında yabani tipten daha düşük OmpC sentezi tespit edilmiştir (çizelge 3.6).



Şekil 3.9 Formaldehit ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.10 Formaldehit ilave edildiğinde yabancı tip *E. coli* (MH225) ve mutantların üreme grafiği



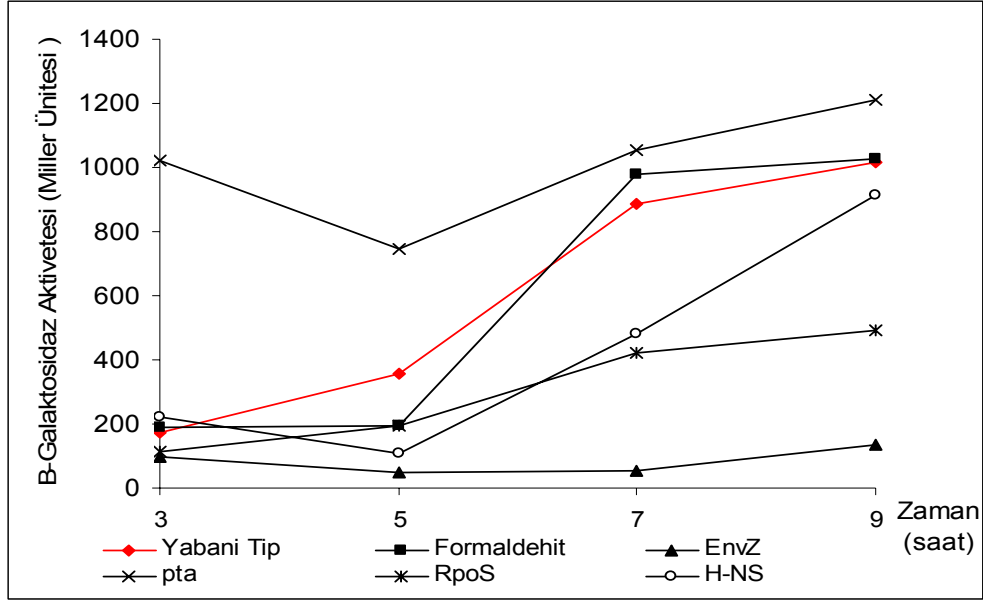
Şekil 3.11 Formaldehit ilavesinin yabancı tip *E. coli* ve mutantların OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi

Çizelge 3.5 Formaldehitli ve Formaldehitsiz yabancı tip ve mutant *E. coli*'nin OmpF sentez düzeyi verileri

Formaldehit	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	308,35	124,51	266,03	922,93	236,82
5. saat	591,74	46,53	201,49	408,15	155,57
7. saat	853,00	61,33	424,25	934,98	254,56
9. saat	891,66	122,03	505,21	1023,38	328,21
Kontrol	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	302,79	109,59	282,11	902,50	248,25
5. saat	1029,00	43,43	440,41	928,30	414,10
7. saat	829,88	66,90	541,97	1075,07	426,14
9. saat	600,23	73,73	251,22	978,75	266,19

Çizelge 3.6 Formaldehitli ve Formaldehitsiz yabancı tip ve mutant *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyi verileri

Formaldehit	MH225	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	187,04	97,44	1021,23	114,54	221,87
5. saat	195,54	51,21	747,71	195,78	108,47
7. saat	979,63	52,15	1053,09	419,99	479,15
9. saat	1028,42	135,89	1208,49	490,80	915,39
Kontrol	OmpC	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	175,24	115,98	1251,15	110,31	211,31
5. saat	358,34	41,93	1589,09	148,91	306,27
7. saat	889,11	62,59	1190,38	369,19	654,30
9. saat	1016,02	106,87	1095,01	477,12	1059,66



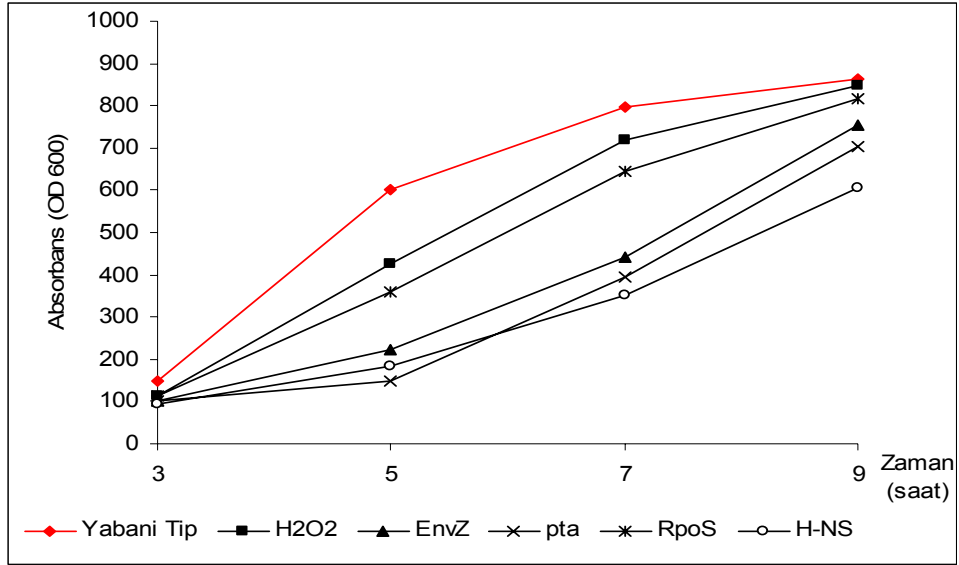
Şekil 3.12 Formaldehit ilavesinin yabani tip *E. coli* ve mutantların OmpC porin protein sentez düzeyine etkisi

3.2.2 H₂O₂'in *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi ve kontrol mekanizmaları

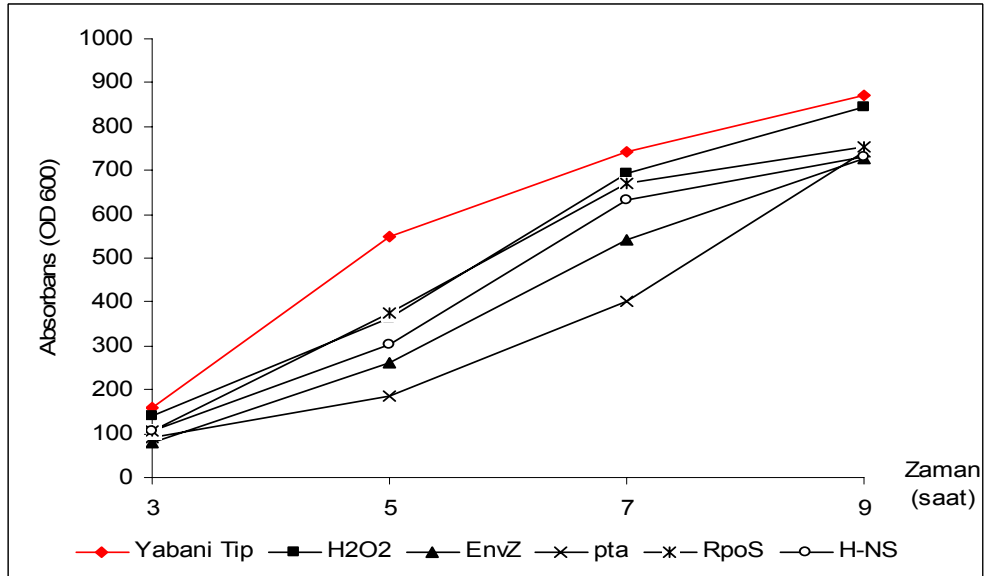
Besiyerine 5,76 mM H₂O₂ ilave edildiği zaman *pta*, *hns* ve *envZ* mutant *E. coli* suşlarının RpoS ve yabani tip strainlere göre büyüme oranlarının daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. Yani mutasyona uğrayan 3 gen bölgesinin H₂O₂ varlığında *E. coli*'nin büyümesi için önemli olduğu görülmektedir.

H₂O₂ ilavesinde elde edilen veriler OmpF porin protein sentez düzeyine nasıl etkilediğine bakmak için Şekil 3.15 incelendiğinde H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stresin OmpF sentezini 5. saate kadar kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği ancak 7. ve 9. saatlerde kontrolden daha fazla OmpF sentezi olduğu görülmüştür. Burada kontrol OmpF sentezi 600 ünite iken H₂O₂ ilave edildiğinde 898 ünite sentez gerçekleşmektedir. *rpoS*, *envZ*, *hns* ve *pta* mutant *E. coli* OmpF sentezine H₂O₂'in nasıl etkilediğine bakılacak olursa *rpoS*, *pta* ve *envZ* mutasyonlarının önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. *hns* mutant *E. coli*'de ise H₂O₂ ilavesinden sonra 5. saatte OmpF sentez düzeyinde azalma olmaktadır. *hns* mutant *E. coli*'de H₂O₂ ilavesi olmayan kontrol örneğinde

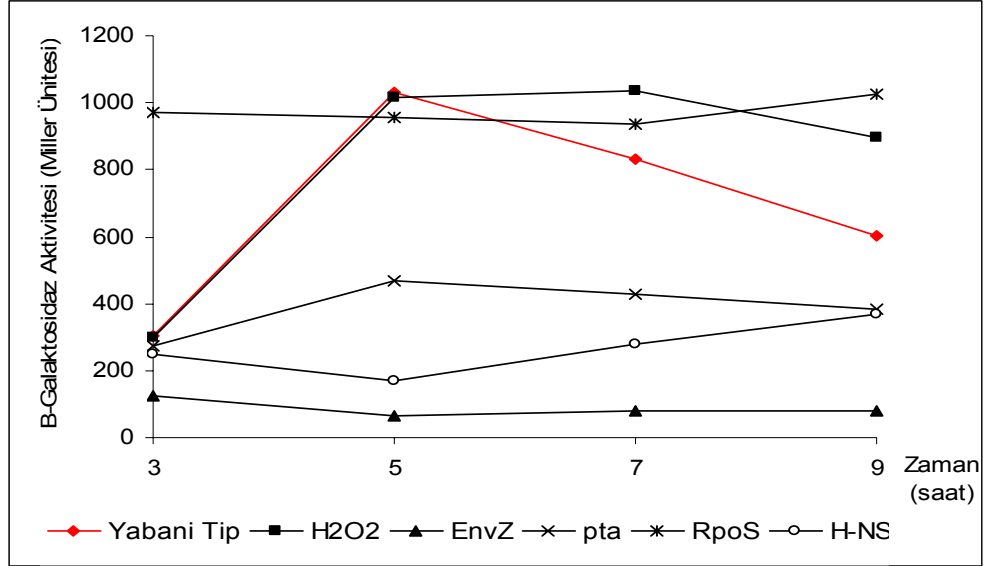
OmpF sentezi 414.10 ünite iken H_2O_2 ilave edilen örnekte 167.87 Miller ünitesi olarak gerçekleşmiştir (çizelge 3.7).



Şekil 3.13 H_2O_2 ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.14 H_2O_2 ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH225) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.15 H₂O₂ ilavesinin yabani tip *E. coli* ve mutantların OmpF protein sentez düzeyine etkisi

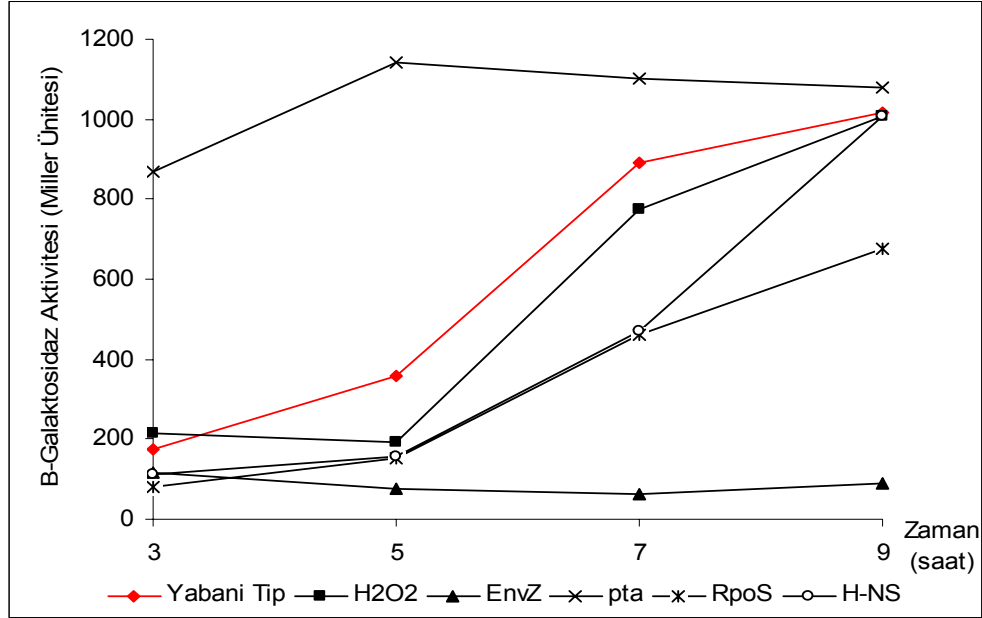
Çizelge 3.7 H₂O₂ li ve H₂O₂ siz büyüyen yabani tip ve mutant *E. coli*'nin OmpF sentez düzeyi verileri

H ₂ O ₂	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	300,06	126,91	275,75	972,60	250,12
5. saat	1015,33	62,54	466,58	956,84	167,87
7. saat	1033,98	78,14	427,23	935,57	279,67
9. saat	898,28	80,42	384,78	1024,36	366,95
Kontrol	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	302,79	109,59	282,11	902,50	248,25
5. saat	1029,00	43,43	440,41	928,30	414,10
7. saat	829,88	66,90	541,97	1075,07	426,14
9. saat	600,23	73,73	251,22	978,75	266,19

Çizelge 3.8 H₂O₂ li ve H₂O₂ siz büyüyen yabani tip ve mutant *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyi verileri

H ₂ O ₂	MH225	EnvZ	Pta	RpoS	H-NS
3. saat	212,80	118,65	869,43	81,87	112,48
5. saat	192,69	74,78	1142,25	153,61	157,99
7. saat	772,61	64,30	1101,96	462,23	468,31
9. saat	1007,35	89,48	1079,85	675,18	1006,09
Kontrol	MH225	EnvZ	Pta	RpoS	H-NS
3. saat	175,24	115,98	1251,15	110,31	211,31
5. saat	358,34	41,93	1589,09	148,91	306,27
7. saat	889,11	62,59	1190,38	369,19	654,30
9. saat	1016,02	106,87	1095,01	477,12	1059,66

OmpC sentez düzeyinde H₂O₂ ilave edilmesinin kontrol ile karşılaştırıldığında hafif bir azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16 ve Çizelge 3.8). Ancak dikkate değer bir fark olmadığı ifade edilebilir. *envZ* mutant *E. coli*'nin OmpC sentezi H₂O₂ ilave edilmesi ile değişmemiştir. Yine *rpoS* mutant *E. coli*'de ise 7 ve 9. saatlerde ilave edilmemiş örneklere göre artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artışın H₂O₂ ilavesi için önemli olduğu ifade edilebilir. H-NS mutant suşun OmpC sentezi 5. ve 7. saatlerde kontrol örneğine göre azalma olduğu ancak 9. saatte yabani tip ile aynı seviyede sentez gerçekleştiği belirlenmiştir.

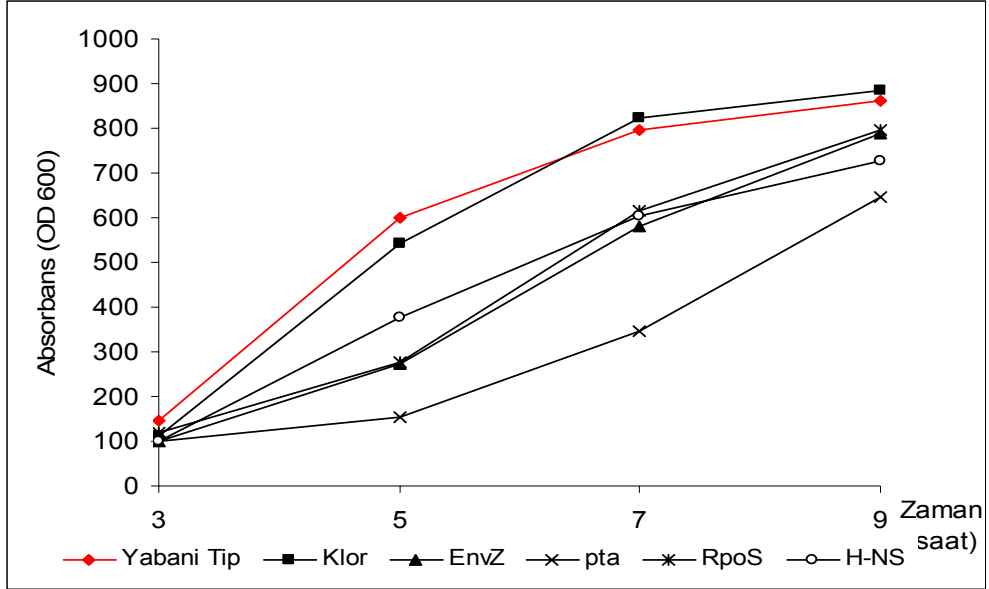


Şekil 3.16 H₂O₂ ilavesinin yabani tip *E. coli* ve mutantların OmpC porin protein sentez düzeyine etkisi

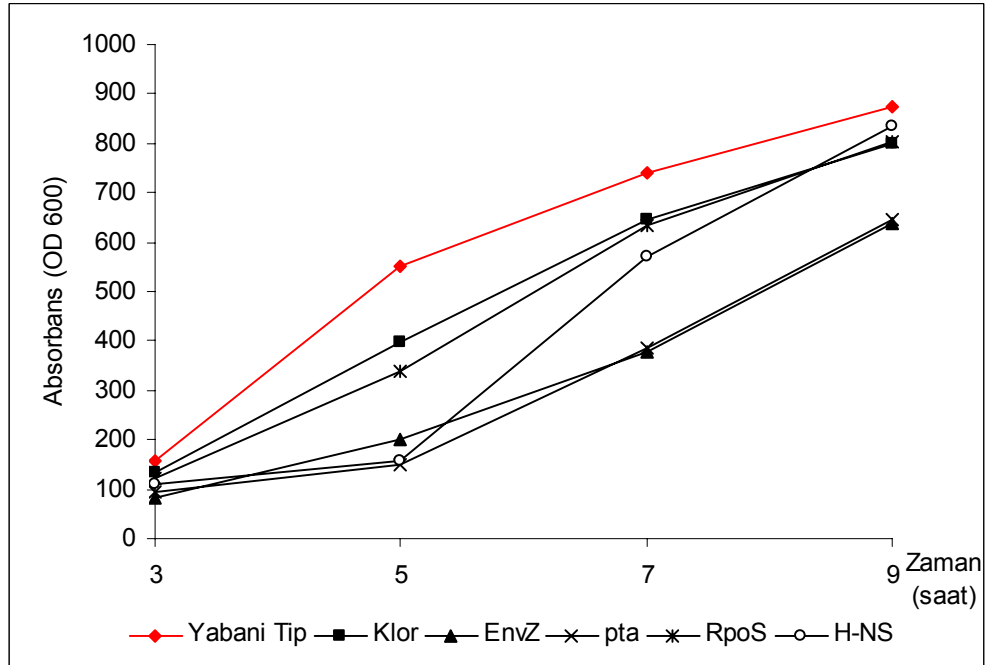
3.2.3 Klor'un *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi

Klor besiyerine ilave edildiğinde *E. coli*'nin üremesini etkilemiş olduğu Şekil 3.17 ve 3.18 den görülmektedir. Mutantlardan *pta*, *envZ* ve *hns*, *rpoS* ye göre daha fazla etkilenmiş olup klor varlığında bu bölgelerin oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

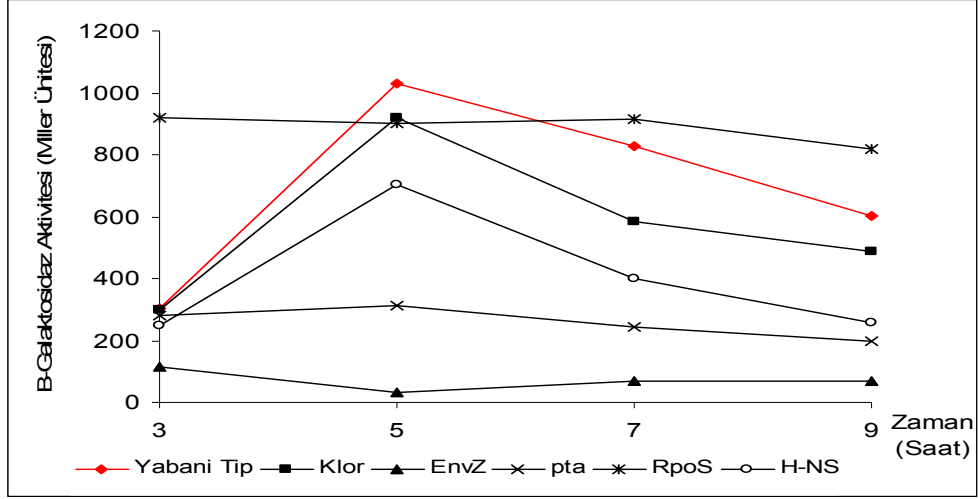
Yabani tip *E. coli* OmpF sentezi klor ilave edildiğinde kontrole göre biraz azalma göstermiştir. *rpoS* ve *envZ* mutantlarda klor ilavesi OmpF sentezini değiştirmemiş ancak *pta* mutant *E. coli*'de OmpF sentezin azalmasına neden olmuştur. Kontrol *pta* mutantında 7. saatte 541,97 Miller ünite sentez görülürken, klor ilave edilen *E. coli* de 241,68 ünite sentez tespit edilmiştir. *hns* mutant *E. coli*'de ise yabani tip *E. coli*de ki kadar olmasada 5. saatte sentezde artışa nede olmuş, 7. saatten sonra OmpF düzeyi azalmıştır (Çizelge 3.9 ve şekil 3.19). OmpC sentezinde kontrole göre hafifçe azalmasına neden olmuş, *pta* ve *envZ* mutant *E. coli*'de etkilememiş, *rpoS* mutasyonunda 5. saatten sonra azalmaya neden olmuş, *hns* mutasyonunda ise sentezi azaltmıştır (Çizelge 3.10 ve Şekil 3.20).



Şekil 3.17 Klor ilavesinde Yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.18 Klor ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH225) ve mutantların üreme grafiği



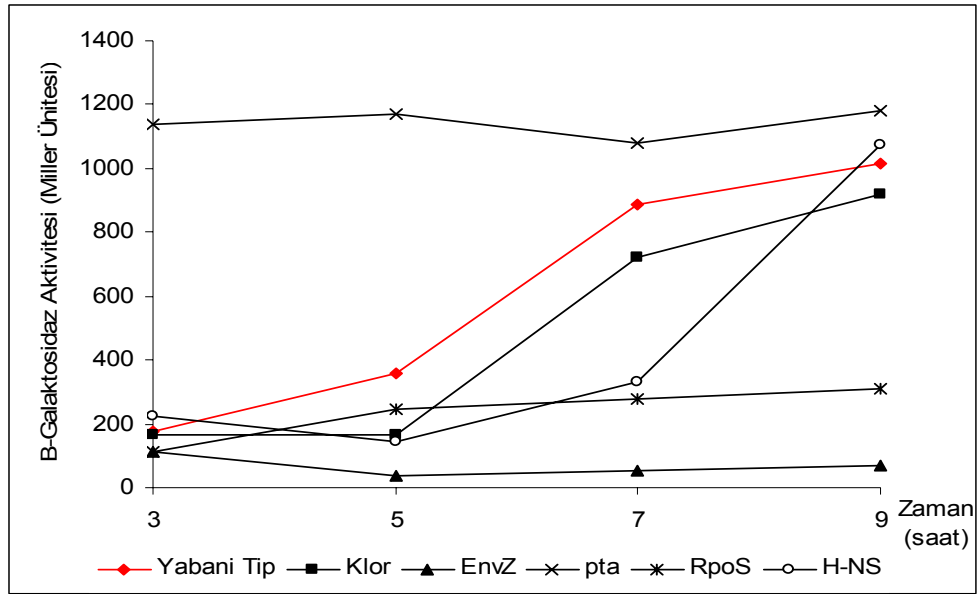
Şekil 3.19 Klor ilavesinin yabancı tip *E. coli* ve mutantların OmpF porin protein sentezine etkisi

Çizelge 3.9 Klorlu ve Klorsuz büyüyen yabancı tip ve mutant *E. coli*'nin OmpF sentez düzeyi verileri

Klor	MH513	EnvZ	Pta	RpoS	H-NS
3. saat	300,33	116,95	279,13	917,49	248,31
5. saat	921,83	33,19	311,49	899,61	704,31
7. saat	583,54	68,73	241,68	914,48	401,46
9. saat	488,70	70,28	199,22	817,18	258,81
Kontrol	OmpF	EnvZ	Pta	RpoS	H-NS
3. saat	302,79	109,59	282,11	902,50	248,25
5. saat	1029,00	43,43	440,41	928,30	414,10
7. saat	829,88	66,90	541,97	1075,07	426,14
9. saat	600,23	73,73	251,22	978,75	266,19

Çizelge 3.10 Klorlu ve Kloruz büyüyen yabancı tip ve mutant *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyi verileri

Klor	MH225	EnvZ	Pta	RpoS	H-NS
3. saat	163,40	114,65	1135,59	114,50	224,57
5. saat	167,02	37,47	1168,04	246,59	141,65
7. saat	722,86	55,68	1080,47	276,78	329,50
9. saat	920,54	69,38	1178,89	308,99	1073,32
Kontrol	OmpC	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	175,24	115,98	1251,15	110,31	211,31
5. saat	358,34	41,93	1589,09	148,91	306,27
7. saat	889,11	62,59	1190,38	369,19	654,30
9. saat	1016,02	106,87	1095,01	477,12	1059,66



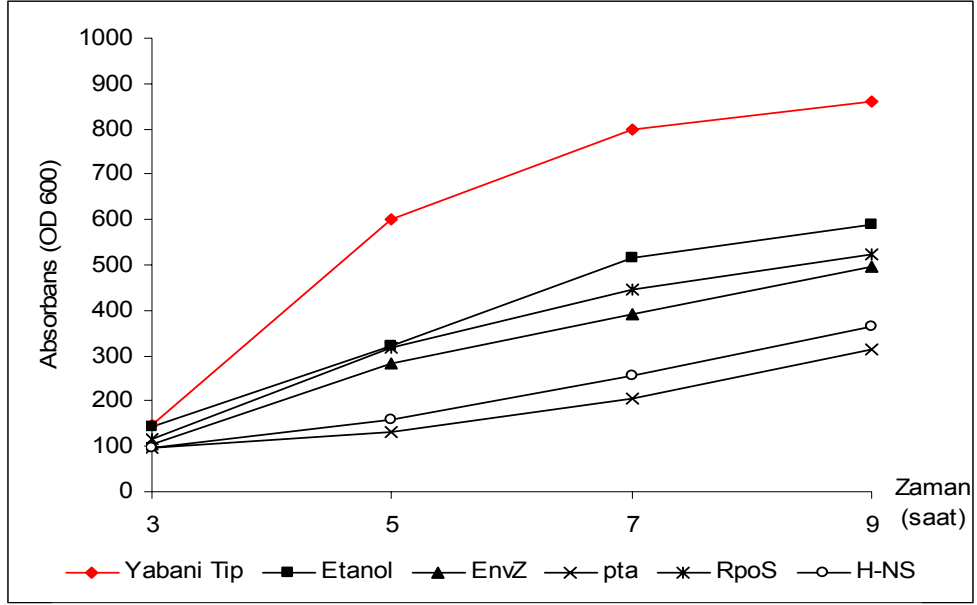
Şekil 3.20 Klor ilavesinin yabancı tip *E. coli* ve mutantların OmpC porin protein sentezine etkisi

3.2.4 Etanol'ün *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi

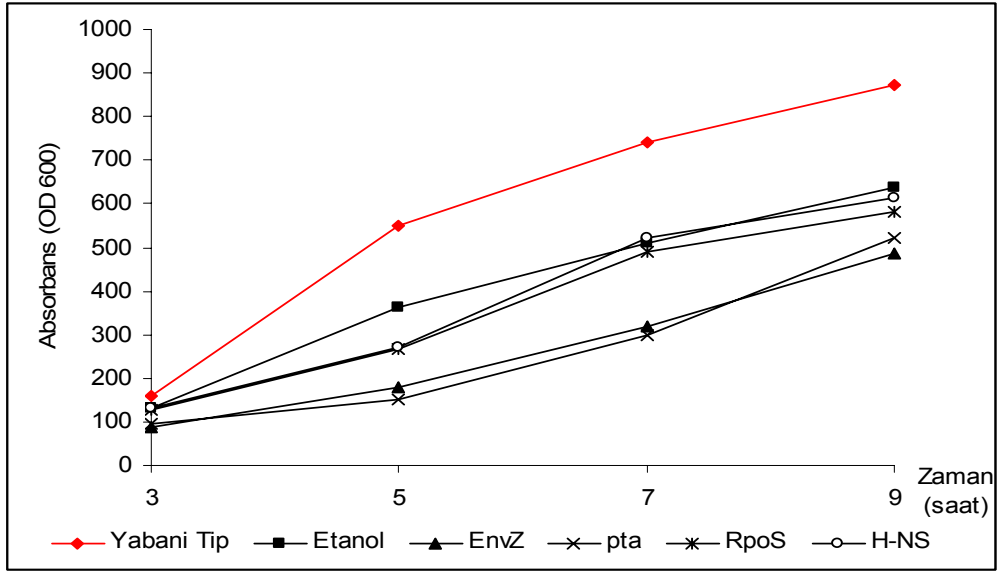
Nutrient brot besiyerinde *E. coli* ürerken 3. saatte etanol ilave edildiğinde kontrole göre (etanol ilave edilmemiş örnek) üreme hızında dikkate değer bir azalma görülmüştür (şekil 3.21 ve 3.22). *envZ*, *rpoS*, *pta* ve *hns* mutasyonlarının etanol varlığında üremeyi etkilediği ve yabani tip *E. coli*'ye göre daha yavaş bir üreme gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu mutasyonların porin proteinlerinin yanında bilinen ve bilinmeyen başka birçok faktörleride kontrol etmekte oldukları tahmin edilmektedir. Ayrıca diğer kimyasal maddeler ile karşılaştırıldığında etanolün daha fazla üremeyi etkilediği görülmektedir. Diğer kimyasal maddelerde olduğu gibi en fazla etkilenen mutasyonlar *envZ* ve *pta* mutasyonları olmuştur.

OmpF ve OmpC sentez düzeyine nasıl etkilediğine bakılacak olursa çizelge 3.11 ve 3.12 ile şekil 3.23 ve 3.24 incelendiğinde OmpF sentezinin etanol ilave edildikten sonra yabani tip kontrole göre oldukça azaldığı görülmüştür. Aynı şekilde çalışmada kullanılan *rpoS*, *envZ*, *pta* ve *hns* mutasyonlarında da etanol ilave edilmesinin OmpF sentezini azalttığı belirlenmiştir. EnvZ mutant *E. coli*'de ise 5. saatte kontrole göre artış ve 7. ve 9. saatlerde hemen hemen kontrol örneği ile aynı sonuçlar alınmıştır.

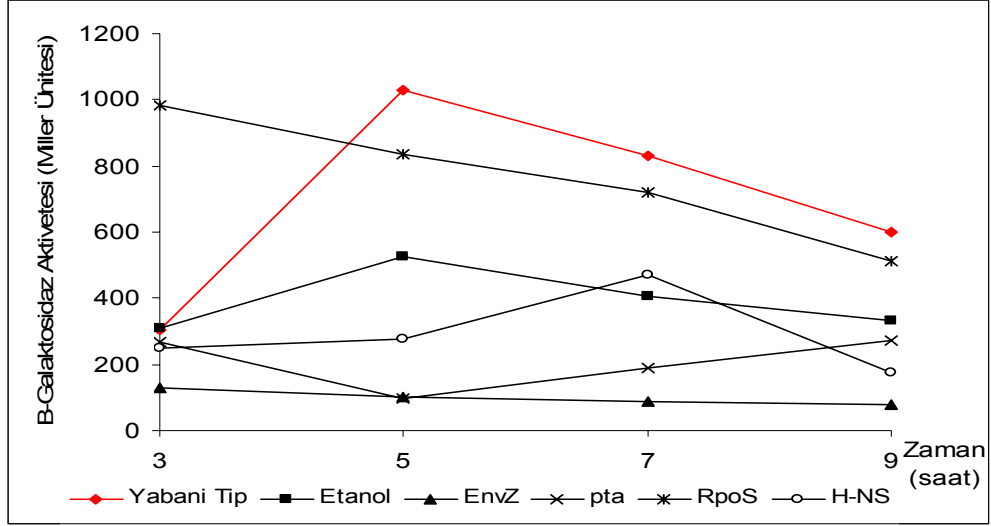
OmpC sentezi üzerine etanol ilavesinin etkisine bakıldığı zaman şekil 3.24 deki sonuçlara göre OmpC sentezinin etkilenmediği tespit edilmiştir. Hatta etanol ilave edilmemiş yabani tip ile etanol ilave edilmiş yabani tip OmpC sentezinin hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. Ayrıca mutantlarla elde edilen sonuçlarda göstermektedir ki etanolün *envz* ve *pta* mutant *E. coli*'de OmpC porin protein sentezi üzerine herhangi bir etkisi yoktur. Hns mutant *E. coli*'nin etanol ilave edilmemiş OmpC sentez düzeyi ile etanol ilave edilmiş düzey karşılaştırıldığında *hns* mutasyonunda etanol ilavesinin azda olsa OmpC sentezini azalttığı görülmektedir. *rpoS* mutant *E. coli*'de ise etanol bulunan ortamda büyütülen *E. coli*'nin OmpC sentezinde 5. saatten itibaren artış olduğu belirlenmektedir (Çizelge 2.12 ve şekil 3.24).



Şekil 3.21 Etanol ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.22 Etanol ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH225) ve mutantların üreme grafiği



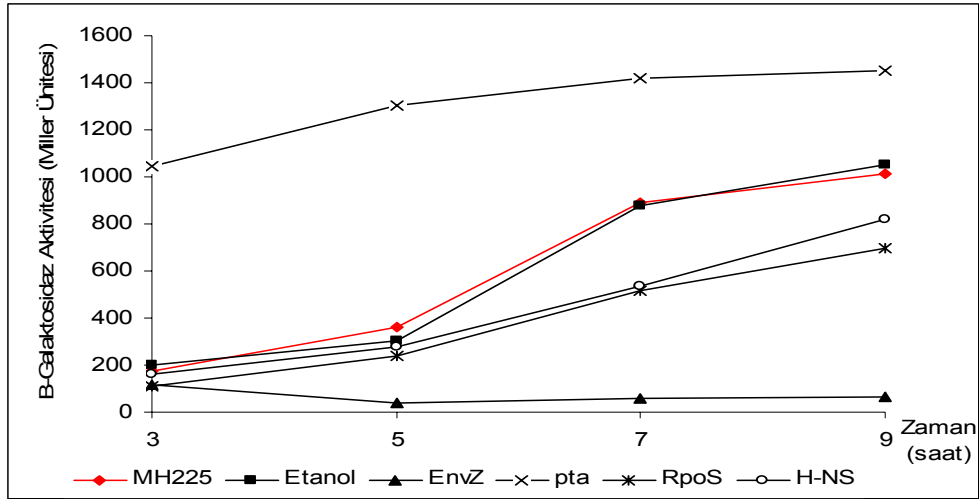
Şekil 3.23 Etanol ilavesinin yabani tip *E. coli* ve mutantların OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi

Çizelge 3.11 Etanol ilavesinin yabani tip ve mutant *E. coli*'nin OmpF sentez düzeyine etkisi

Etanol	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	307,89	126,96	266,12	981,93	251,53
5. saat	524,43	100,54	95,71	835,03	278,70
7. saat	404,36	87,89	188,50	722,04	468,65
9. saat	333,00	77,69	272,61	511,25	175,99
Kontrol	OmpF	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	302,79	109,59	282,11	902,50	248,25
5. saat	1029,00	43,43	440,41	928,30	414,10
7. saat	829,88	66,90	541,97	1075,07	426,14
9. saat	600,23	73,73	251,22	978,75	266,19

Çizelge 3.12 Etanol ilavesinin yabancı tip ve mutant *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyine etkisi

Etanol	MH225	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	201,74	117,14	1046,46	112,57	164,49
5. saat	306,43	39,33	1305,72	240,89	279,93
7. saat	877,68	58,69	1418,50	516,71	533,38
9. saat	1051,10	66,03	1450,11	695,98	821,51
Kontrol	OmpC	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	175,24	115,98	1251,15	110,31	211,31
5. saat	358,34	41,93	1589,09	148,91	306,27
7. saat	889,11	62,59	1190,38	369,19	654,30
9. saat	1016,02	106,87	1095,01	477,12	1059,66

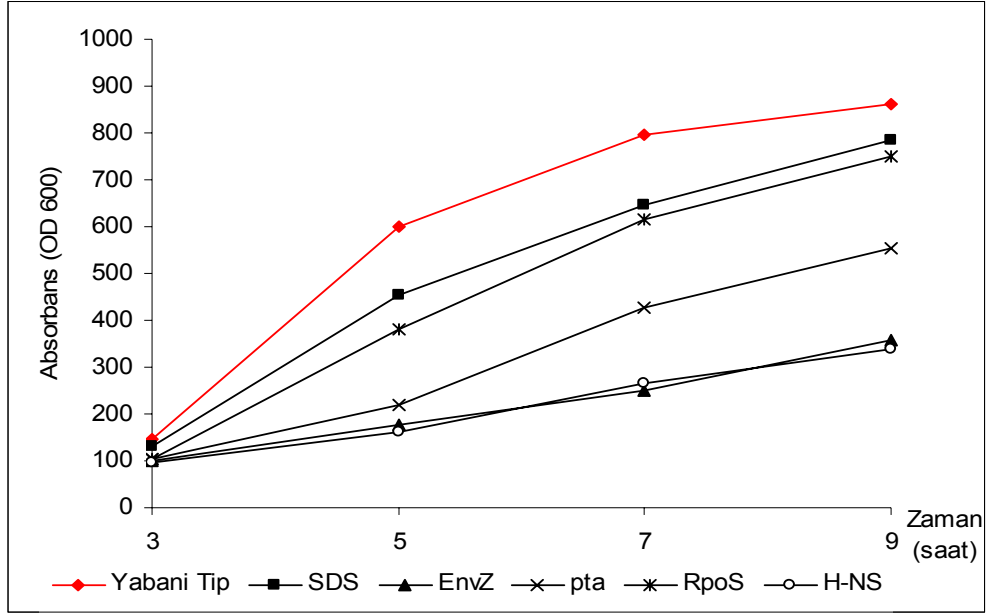


Şekil 3.24 Etanol ilavesinin yabancı tip *E. coli* ve mutantların OmpC porin protein sentez düzeyine etkisi

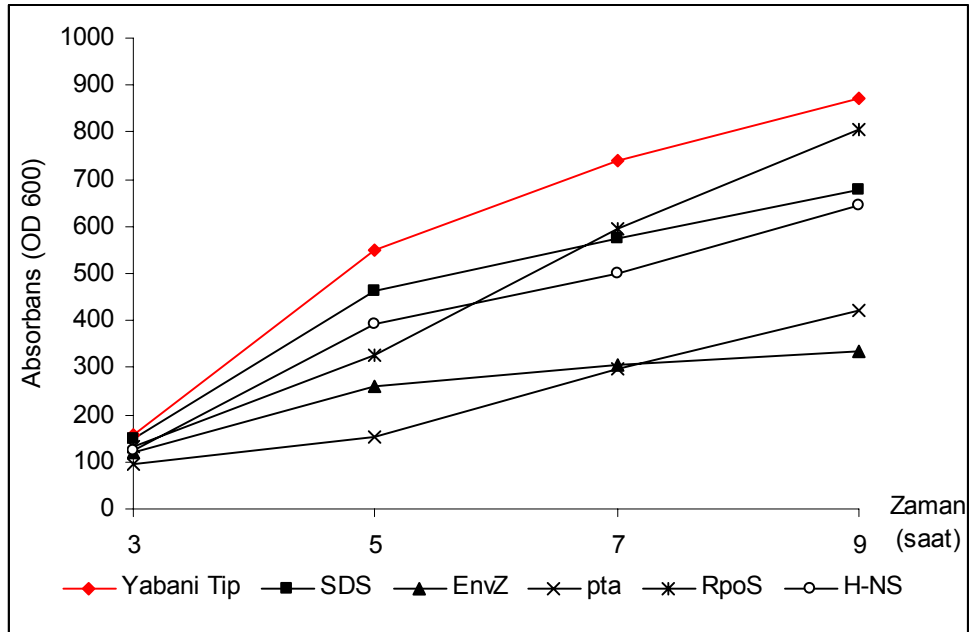
3.2.5 SDS'nin *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi

Besi ortamına SDS ilave edilerek büyütülen *E. coli* ve mutant bakterilerin üreme grafikleri Şekil 3.25 ve 3.26 da incelendiğinde, SDS'nin bakteri üremesini oldukça azalttığı tespit edilmiştir. Özellikle *envZ*, *pta* ve *hns* mutantlarının *rpoS* mutantına göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Yabani tip *E. coli*'nin yoğunluğu 862 iken SDS ilave edildiğinde 786 *envz* mutant 360, *pta* mutant 550, *rpoS* mutant 750, *hns* mutant ise 340 OD600 absorbans değerine ulaşmıştır.

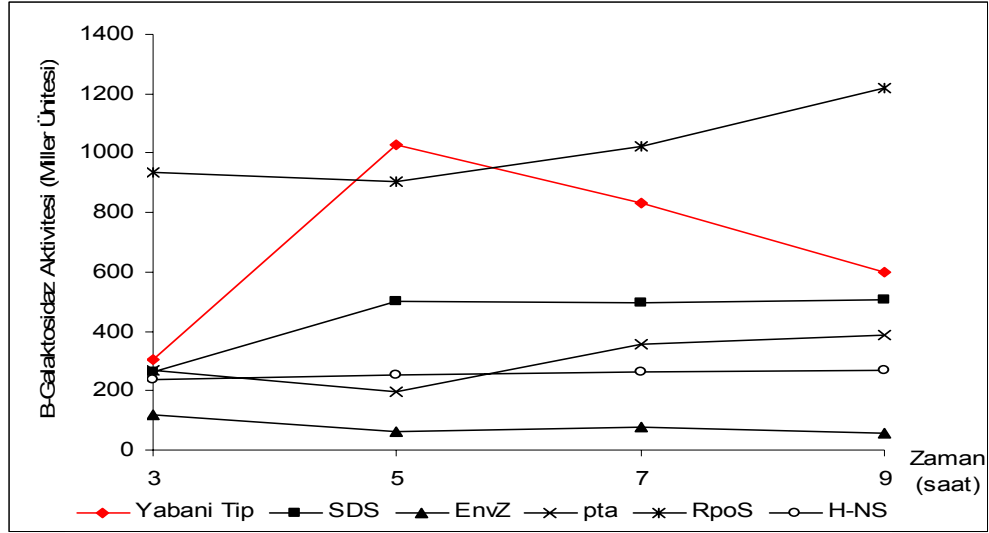
SDS ilave edilmesi ile OmpC ve OmpF sentez düzeyinde meydana gelen değişiklik Şekil 3.27 ve 3.28 de incelendiğinde OmpF sentezinin kontrole göre sentez artış hızının daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *hns* ve *pta*'da sentezde kontrole göre % 50'ye yakın azalmaya sebep olurken, *envZ* mutantta ise SDS ilavesi OmpF sentezinde dikkate değer bir değişim göstermemiştir. *rpoS* mutasyonunda ise SDS ilave edildiğinde yabani tip *E. coli*'de meydana gelen OmpF sentezindeki azalma olmamaktadır. Dolayısı ile SDS ilavesinin *rpoS* mutasyonunda sentez düzeyini etkilemediği söylenebilir (Çizelge 3.13 ve 3.27). OmpC sentezine SDS ilavesinin etkisine Şekil 3.28 ve çizelge 3.14'deki verilere göre, SDS ilavesi yabani tip *E. coli*'de OmpC düzeyini arttırmış ve 9. saate kadar devam etmiştir. *rpos* mutant *E. coli*'de ise oldukça önemli bir artış görülmektedir. 9. saatte SDS ilaveli örneklerde 1005.50 ünite, SDS ilavesi olmayan *rpos* mutantlarda 477.12 Miller ünite sentez görülmektedir. HNS mutant *E. coli*'dede aynı şekilde bir artış olmaktadır. Ancak yabani tiptede aynı düzeyde artış olması bu artışın mutasyondan kaynaklanmadığı SDS'nin etkisi ile gerçekleşen bir artış olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.25 SDS ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.26 SDS ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH225) ve mutantların üreme grafiği



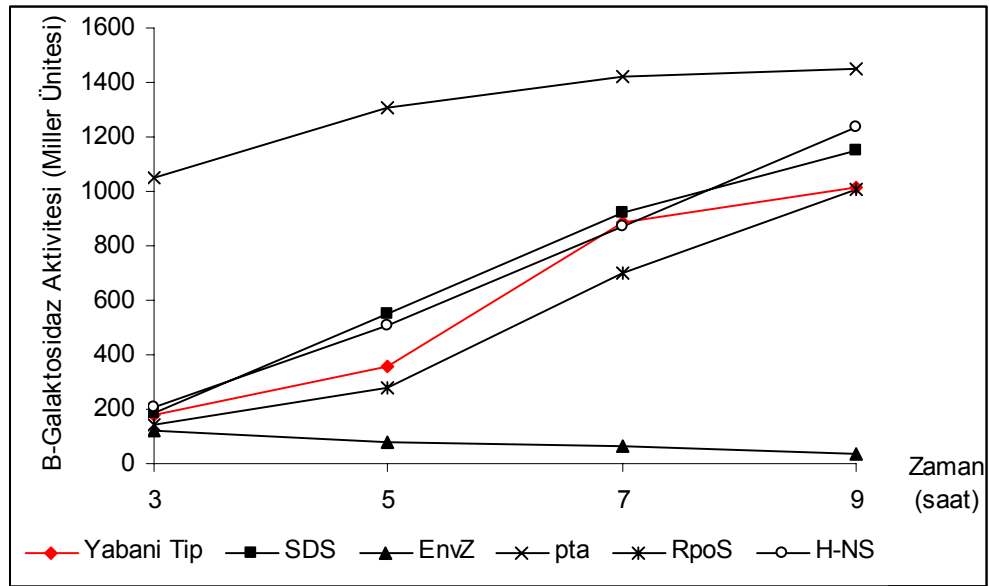
Şekil 3.27 SDS ilavesinin yabani tip *E. coli* ve mutantların OmpF porin protein sentezine etkisi

Çizelge 3.13 SDS'li ve SDS'siz büyüyen yabani tip ve mutant *E. coli*'nin OmpF sentez düzeyi verileri

SDS	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	264,64	120,52	271,00	936,88	236,24
5. saat	499,10	62,78	196,38	904,29	254,42
7. saat	495,61	75,25	355,12	1022,37	261,88
9. saat	504,05	57,59	388,54	1217,09	268,82
Kontrol	OmpF	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	302,79	109,59	282,11	902,50	248,25
5. saat	1029,00	43,43	440,41	928,30	414,10
7. saat	829,88	66,90	541,97	1075,07	426,14
9. saat	600,23	73,73	251,22	978,75	266,19

Çizelge 3.14 SDS'li ve SDS'siz büyüyen yabancı tip ve mutant *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyi verileri

SDS	MH225	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	186,54	123,72	1046,46	146,14	208,80
5. saat	547,98	76,45	1305,72	275,94	508,77
7. saat	921,95	65,26	1418,50	697,48	868,69
9. saat	1152,73	33,81	1450,11	1005,50	1233,21
Kontrol	OmpC	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	175,24	115,98	1251,15	110,31	211,31
5. saat	358,34	41,93	1589,09	148,91	306,27
7. saat	889,11	62,59	1190,38	369,19	654,30
9. saat	1016,02	106,87	1095,01	477,12	1059,66



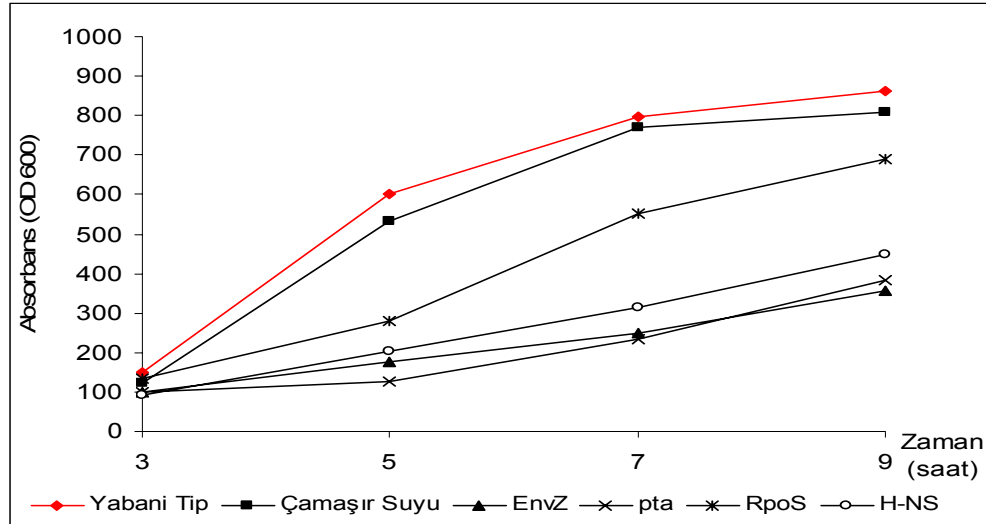
Şekil 3.28 SDS ilavesinin yabancı tip *E. coli* ve mutantların OmpC porin protein sentezine etkisi

3.2.6 Çamaşır suyu'nun *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyine etkisi

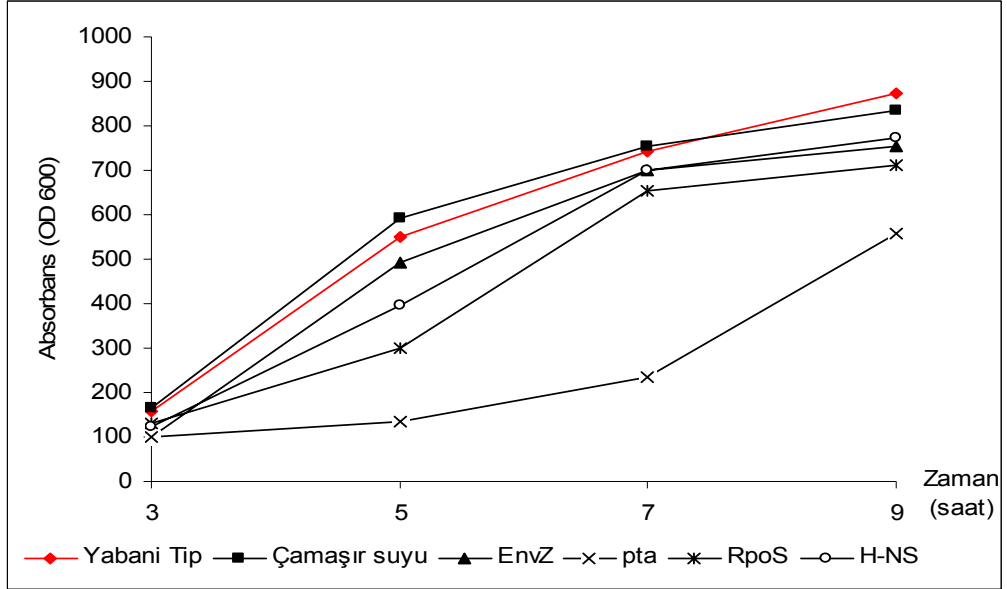
Büyüme ortamına çamaşır suyu ilave edildiğinde yabani tip *E. coli*'nin büyümesinde çok az yavaşlama olduğu görülmektedir. Ancak *envZ*, *pta* ve *hns* mutant *E. coli*'nin ların çamaşır suyu varlığından etkilendiği ve ikiye katlanma zamanının oldukça uzadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.29 ve 3.30).

Yabani tip *E. coli* OmpF sentezinin çamaşır suyu ilave edilmesi ile çok fazla değişmediği görülmektedir (şekil 3.31 ve çizelge 3.15). *hns*, *pta* ve *rpoS* mutant *E. coli*'de OmpF sentezi azalmıştır. Bu mutasyonlarda azalmaya sebep olduğuna göre yaba tip ile karşılaştırıldığında moleküllerin rollerini göstermektedir.

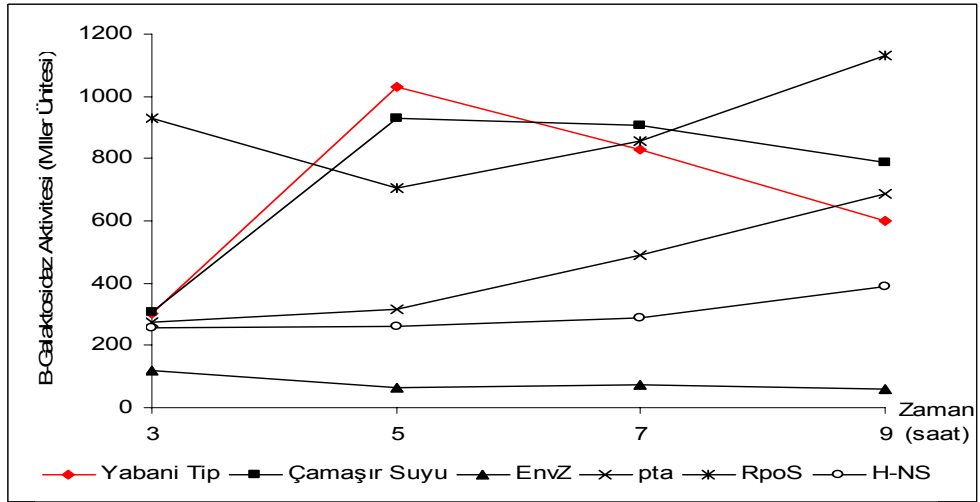
Çamaşır suyu ilave edilmesi sonucunda OmpC sentezinde ise yabani tip *E. coli*'de 5. saatte oldukça artış olduğu görülmektedir. *Hns* ve *pta* mutant *E. colide* Ompc sentezi 5. saatlerde oldukça ciddi azalma gösterirken daha sonraki inkübasyon sürecinde artış göstermiştir. Ancak *rpoS* mutasyonunda OmpC sentezinde yabani tipte olduğu gibi bir artış olduğu görülmektedir. En ilginç ve beklenmedik sonuç *envZ* mutant *E. coli*'de tespit edilmiştir. Diğer kimyasallarda görülmeyen oldukça yüksek bir sentez elde edilmiştir (çizelge 3.16).



Şekil 3.29 Çamaşır suyu ilavesinde yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların üreme grafiği



Şekil 3.30 Çamaşır suyu ilavesinde yabancı tip *E. coli* (MH225) ve mutantların üreme grafiği



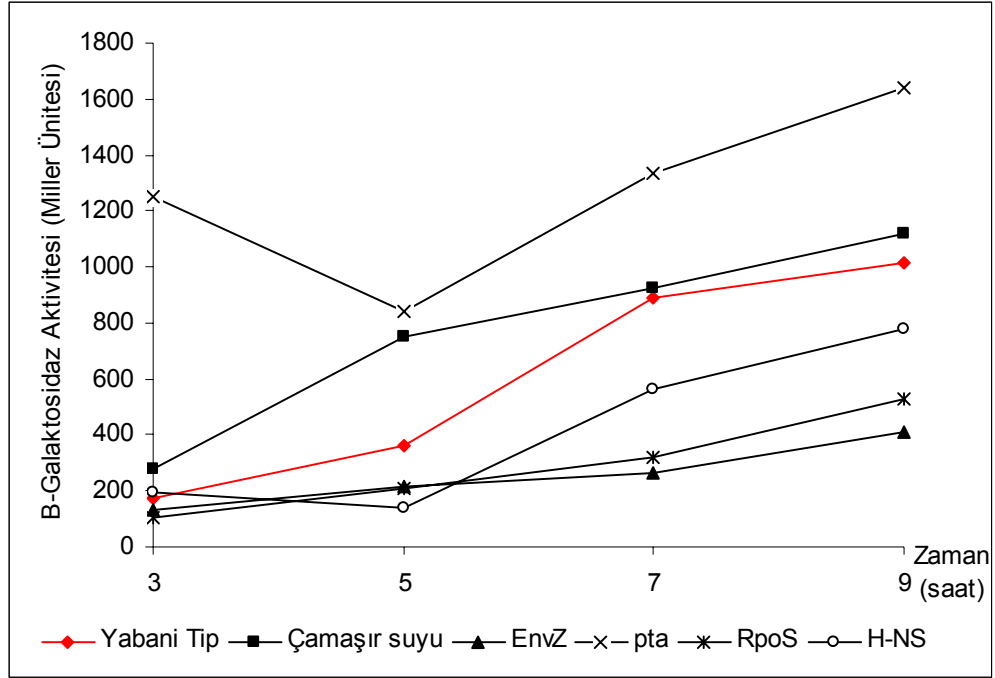
Şekil 3.31 Çamaşır suyu ilavesinin yabancı tip *E. coli* ve mutantların OmpF porin protein sentezine etkisi

Çizelge 3.15 Çamaşır suyu ilavesinin yabani tip ve mutant *E. coli*'nin OmpF sentez düzeyi

Çamaşır Suyu	MH513	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	305,54	120,52	276,81	929,28	256,46
5. saat	928,96	62,78	316,12	706,57	263,28
7. saat	908,96	75,25	487,93	858,20	289,62
9. saat	785,79	57,59	685,23	1130,96	388,49
Kontrol	OmpF	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	302,79	109,59	282,11	902,50	248,25
5. saat	1029,00	43,43	440,41	928,30	414,10
7. saat	829,88	66,90	541,97	1075,07	426,14
9. saat	600,23	73,73	251,22	978,75	266,19

Çizelge 3.16 Çamaşır suyu ilave edilmiş ve edilmemiş büyütülen yabani tip ve mutant *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyi verileri

Çamaşır suyu	MH225	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	277,19	131,86	1250,74	103,39	192,37
5. saat	752,72	218,69	839,80	210,01	136,26
7. saat	925,79	263,00	1334,79	317,44	563,41
9. saat	1117,04	408,74	1641,89	530,47	777,10
Kontrol	OmpC	EnvZ	pta	RpoS	H-NS
3. saat	175,24	115,98	1251,15	110,31	211,31
5. saat	358,34	41,93	1589,09	148,91	306,27
7. saat	889,11	62,59	1190,38	369,19	654,30
9. saat	1016,02	106,87	1095,01	477,12	1059,66



Şekil 3.32 Çamaşır suyu ilavesinin yabani tip *E. coli* ve mutantların OmpC porin protein sentezine etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

E. coli gibi gram negatif enterik bakteriler farklı çevrelerde, oldukça farklı stres şartları ile baş etmek zorudadırlar. Bu şartlar arasında pH, osmolarite, sıcaklık, çeşitli toksik kimyasal maddeler, antibiyotikler, oksidatif stres sayılabilir. Oldukça farklı stres şartları arasında organizmaların yaşamı uygun gen setlerinin gerekli miktarlarda doğru sentezi ile mümkündür. Bir çok çevresel stres cevap genleri çoklu regülatör mekanizmalar ile oldukça karmaşık korunma işlemleri içerir. Bu networkler ile hücre kendini stres faktörlerinden korumaya çalışmaktadır. Bu çoklu regülatör mekanizmalar arasındaki ilişkilerin anlaşılması bakterilerin doğal hayata adaptasyon yeteneklerinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Buda hem çevre sağlığı hemde insan sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Dış membran gram negatif bakterilerde doğal hayata adaptasyon ve madde transferi için oldukça önemli bir bariyerdir. Burada yer alan OmpC ve OmpF porin proteinleri başta olmak üzere bir çok spesifik ve spesifik olmayan porinler stres koşullarına adaptasyon ve besin alımında oldukça önemlidir. OmpC ve OmpF porin proteinlerinin bir çok stres koşulunda sentezlerinin değiştiği ortaya konmuştur. Ancak bu proteinlerin farklı stres şartlarında sentezlerini kontrol eden faktörler ve çalışma mekanizmaları tam olarak açığa çıkarılabilmemiş değildir. pH, osmolarite, sıcaklık, oksidatif stres, açlık, toksik bileşikler ve antibiyotikler OmpC ve OmpF sentez düzeyini değiştirdiği tespit edilen faktörlerdir [74]. Bu çalışmada dezenfektan özellikli kimyasal maddeler arasında geçen formaldehit, etanol, çamaşır suyu, klor, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve H₂O₂ çalışma konusu olarak belirlenmiştir. Nutrient brot zengin besiyeri olarak bilinen bir besi ortamıdır. *E. coli*, inkübasyon süresi ilerledikçe besin miktarının azalması ve bakteri yoğunluğunun artışı ile yaklaşık 10-12. saatler arasında durgunluk fazına girer.

Yapılan çalışmada üreme grafiklerine bakıldığı zaman nutrient brot besiyerinde yabani tip *E. coli*'nin gelişim hızının 9 saatlik periyotta mutantlara göre oldukça yüksek olduğu ve *rpoS* mutasyonunun yaklaşık yabani tip ile aynı olduğu tespit edilmiştir. *Hns* ve *pta* mutasyonuna uğratılmış *E. coli*'nin ise yabani tipten daha yavaş büyüme gösterdiği görülmektedir. Bu farklılık yalnız 5. ve 7 saatlerde görülmekte olup, 9. saatte yabani tip ile aynı miktarda büyüme oranına ulaşmaktadırlar. Porin proteinleri eksik *E. coli* mutant suşlarının besince yüksek besiyerlerinde büyüme oranlarının yabani tip *E. coli* gibi normal, fakat besin konsantrasyonu düşük olduğu zaman ise büyüme oranlarının düşük olduğu ortaya konmuştur [136]. Ancak *envz*, *pta* ve *hns*

mutasyonlarında büyüme oranı azalmıştır. Mutasyona uğratılan bu bölgeler *E. coli*'nin başka önemli metabolik yollarını da kontrol etmektedir [45,75,122,123]. Dolayısı ile mutasyona uğratılmaları sonucunda ikiye katlanma zamanlarında azalma olması doğaldır. Ancak çok önemli bir azalma değildir.

Büyüme ortamına kimyasal maddelerin ilavesi büyüme oranlarını azaltmıştır. Özellikle SDS ve Etanol ikiye katlanma zamanını oldukça düşürmüştür. Mutantlarda bu etki daha fazla görülmektedir. Zararlı toksik kimyasal maddelerle karşılaşan mikroorganizmalar metabolik hızlarını azaltır, adaptasyon süreci geçirir ve bu nedenle üreme hızları yavaşlamaktadır [12,45,14]

Darcan ve ark. (2001) deniz suyunda etanol ile muamele edilen *E. coli* ve *S. typhimurium*'un OmpC ve OmpF porin proteinlerinin ve dış membran proteinlerinin büyük çoğunluğunun sentezinde dikkate değer artış olduğunu göstermişlerdir [39]. Ancak *E. coli* zengin besiyeri ortamlarında üretildiğinde ortama ilave edilen etanol ile OmpF sentezinin azaldığı gösterilmiştir [137]. Yapılan bu çalışmada da nutrient brotta üretilen *E. coli*'nin etanol ilave edilmesi ile OmpF sentezinin azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda Etanol ilavesinin MicF RNA miktarında 17 katlık bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir [137]. MicF RNA ompF mRNA'sına bağlanarak onun okunmasını (translasyonu) olmasını engelleyen dolayısı ile OmpF sentez düzeyini azaltan bir görevi vardır [104,37,97,96,77]. Bu sonuçlara göre OmpF sentezinin etanol nedeni ile azalmasında MicF RNA nin rolü olduğu görülmektedir. Çalışmamızda OmpF sentezinde görülen azalmada RpoS, H-NS, EnvZ ve Acp'nin rolü olup olmadığına bakılmıştır. EnvZ ve H-NS mutasyonunun herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Pta ve rpoS mutant *E. coli*'de etanol ilavesi ile OmpF sentezinin azaldığı belirlenmiştir. Her iki mutasyondada azalmanın mekanizması hakkında henüz bir bilgi tespit edilememiştir. Etanol ilavesinin OmpC sentezi üzerine etkisine bakıldığı zaman yabancı tip *E. coli*'de herhangi bir değişime sebep olmamıştır. Dolayısı ile etanol ilave edilmesi ompC sentezi düzeyini değiştirmemiştir. Mutantlarla yapılan çalışmalar sonucundada etanol ilavesinin önemli bir değişime sebep olmadığı görülmektedir. Ancak çalışmamızda ilginç bir sonuç olarak hns mutant *E. coli*'nin OmpC sentezinde azalma olduğu tespit edildi. Hns mutasyonu normal şartlarda OmpC sentezinin artışına neden olduğu belirlenmiştir [132]. H-NS indirekt tarzda hem OmpF ve OmpC sentezini düzenlemektedir. Ancak çalışmamızda yabancı tip *E. coli*'de bir değişime sebep olmayan etanol hns mutant *E. coli*'de azalmaya sebep olmuştur. Bu azalmayı nasıl sağladığı henüz bilinmemektedir.

Darcan ve ark. deniz suyuna etanol ilave ettiklerinde *E. coli* ve *Salmonella typhimurium*'un porin sentezinde artış olduğunu göstermişlerdir. Ancak nutrient brot besiyerinde yapılan çalışmada ise OmpF sentezinde azalma olduğu görülmektedir. Zengin besiyeri ve minimal medium gibi besi ortamları ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan doğal ortam olarak göl, nehir, toprak ve deniz suyu gibi ortamlarda elde edilen sonuçlar farklı olabilmektedir [32]. Dolayısı ile etanol ilave edildiğinde doğal ortamlarda OmpF sentezi artarken zengin besi ortamlarında azalmaktadır.

Darcan (1999), deniz suyunda yaptığı çalışmasında, formaldehit ve SDS gibi dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *E. coli* ve *S. typhimurium*'un dış membranındaki proteinlerin, OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentez düzeyini azalttığını göstermiştir [42]. Özkanca (1993)'da göl suyunda yaptığı bir çalışmada SDS gibi deterjanlara maruz kalmış *E. coli*'de OmpC ve OmpF porin proteinlerinin neredeyse yok denecek kadar azaldığını belirtmiştir [24]. Kimyasal kirletici maddelerden olan monoklorofenol, pentaklorofenol ve kadmiyum klorid kimyasallarının da etkisi ile OmpF sentezinin azaldığı gösterilmiştir [43]. Mar regülunun (kimyasal maddelere direnç regülunu) porin proteinlerinin sentezini, özellikle OmpF porinini kontrol ettiği ortaya konmuştur [44]. Mar regülununun kimyasal maddelerin hücre dışına atılması ve hücrenin korunmasında önemli rolü vardır [45]. Çalışmamızda Formaldehit ilavesinin zengin besiyerinde üretilen *E. coli*'nin OmpF sentezini 5. saatte azalttığı tespit edilmiştir. Ancak 7. saatten sonra yabani tip *E. coli*'de elde edilen ompF sentezinden daha fazla Ompf sentezi elde edilmiştir. Bu sentezde *envZ* nin bir rolü olmadığı tespit edilmiştir. 3. saatte Formaldehit ilave edilmiş besiyerinde üretilen *E. coli* mutantlarında da 5. saatte alınan örneklerde OmpF sentezinde azalma olduğu, inkübasyon sürecinin devamında artış olduğu tespit edilmiştir. İlginç bir sonuç olarak *rpoS* mutant *E. coli*'de formaldehit ilavesinden sonra OmpF sentezinde oldukça önemli bir azalma görülmüştür. Ancak 7. saatte alınan örneklerde tekrar 3. saatteki değerine dönmüştür. Ompf sentezinin toksik kimyasal maddelerin varlığında özellikle MicF, MicF nin sentezinin düzenlenmesinde rol alan MarA, SoxS, tolC, Lrp gibi bir çok faktör tespit edilmiştir [119, 137, 99, 71, 120]. Bu azalmanın altında yatan sebebinde muhtemelen bu faktörler olduğu vurgulanabilir. Formaldehit ilave edilen *E. coli*'nin OmpC sentez düzeyine bakıldığı zaman ciddi anlamda bir değişim olmadığı görülmüştür. *Envz* ve *rpoS* mutant *E. coli*'nin OmpC sentezine herhangi bir etkisi olmamıştır. H-NS mutant ve pta mutant *E. coli*'nin OmpC sentezi ise 5. saatte azalmış ancak ilerleyen saatlerde sentez tekrar yükselmiştir. Formaldehit ve SDS ilave edilmesi sonucunda Ompf sentezinin azalması OmpC sentezinin ise değişmemesi beklenen bir sonuçtur. Çünkü hızlı büyüme sonucunda bakteriler besin

ihtiyaçlarını çabuk karşılayabilmek için büyük por çapına sahip olan OmpF porin proteininin tercih ederken küçük por çaplı OmpC yi çok düşük düzeyde sentezlemektedirler (Şekil 3.3 ve 3.4) ve kimyasal maddeler ilave edildiğinde maddelerin içeri alınımını azaltmak için büyük por çaplı OmpF porin sentez düzeyini azaltmaları gerektir. OmpC sentezi zaten az olduğu için burada sentezde değişim olmaması beklenir. Dolayısı ile OmpF sentezini azaltmak için hangi faktörlerin devreye girdiğini tespit etmek için mutantlarla yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan RpoS ve EnvZ'nin bir rolünün olmadığı görülmüştür. Bouche ve ark. (1998) çalışmalarında AcP ın RpoS düzeyini negatif olarak etkilediğini tespit etmişlerdir [107]. Bu bilginin ışığında elde ettiğimiz sonucun nedeni olarak AcP'ın ortamda olmaması nedeni ile RpoS'nin miktarındaki artışın yabancı tip *E. coli*'ye göre OmpF sentezinin azalmasına neden olduğunu söyleyebiliriz. RpoS global stres faktörü olarak toksik maddelerin varlığında gereklidir. Ancak *rpoS* mutant *E. coli*'de meydana gelen azalmanın nasıl olduğunu ifade etmek şu anki bilgiler ile mümkün görünmemektedir.

SDS ilave edildiğinde de OmpF sentezinin oldukça azaldığı, OmpC sentezinin ise etkilenmediği tespit edilmiştir. Mutantlar arasında *envZ* ve *rpoS* mutant *E. coli*'de OmpF sentezi SDS nedeni ile değişmemiştir. *pta* ve *hns* mutantlarda ise yabancı tip *E. coli*'de olduğu gibi sentezde azalma belirlenmiştir. Ompc sentezi açısından ise sadece *rpoS* mutant *E. coli*'de OmpC sentezinin arttığı tespit edilmiştir.

H₂O₂ ilave edilerek meydana getirilen oksidatif stres sonucunda OmpF sentezinin 5. saatte yabancı tip ile aynı sonucu verirken 7. ve 9. saatlerde ise yabancı tip *E. coli*'den daha fazla sentez belirlenmiştir. *EnvZ*, *pta* ve *rpoS* mutant *E. coli*'nin OmpF sentezinin etkilenmediği tespit edilmiştir. H-NS yokluğunda ise OmpF nin azaldığı görülmektedir. H₂O₂ ilavesi OmpC sentezinde az da olsa azalmaya sebep olmuştur. Bu azalmada *envZ* nin bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Li ve Demple (1994) yaptıkları çalışmada oksidatif strese uğramış *E. coli*'nin MicF RNA miktarının 10 kat arttığını tespit etmişlerdir [53]. Bu sonuca göre MicF de ki artış OmpF sentezinin azalması demektir. H₂O₂ ilave edilen örneklerde literatürlerden farklı olarak elde edilen sonuçlar ile ilgili olarak neden böyle bir değer elde edildiğini henüz bilmiyoruz. İleri düzeyde farklı açılardan ve tekniklerle yapılacak çalışmalar sonucunda aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz.

Çamaşır suyu ve klor ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar literatüre ilk kazandırılan sonuçlardır. Bu kimyasal maddeler ile yapılmış OmpC ve OmpF sentezi ile ilgili bir yayına rastlanmamıştır. Klor ilavesi ile hem OmpC hemde OmpF sentezi kontrol örneklerine göre hafifçe azalmıştır. Her iki porin içinde *envZ* mutantlarda sentezde bir değişim olmamıştır. *Pta* mutant *E.*

colide OmpC ve *rpos* mutant *E. coli*'de ise OmpF etkilenmemiştir. Pta mutantlarda OmpF azalmış, *hns* mutantlarda ise sentezde artış belirlenmiştir. Darcan (1999) deniz suyu ile yapmış olduğu çalışmalarda klor ilave edilen örneklerde protein sentezinin oldukça azaldığını tespit etmiştir [42]. Sentezde görülen bu azalmayı sağlayan faktörün bu çalışmada test edilen *rpoS*, *hns*, *envZ* ve Acp olmadığı söylenebilir. Ayrıca literatürde çamaşır suyu veya içeriği olan hipoklorit ile klorun porin sentezi üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Her iki porinin sentezinde *EnvZ* sensörünün önemli rolü olduğu *envZ* mutant *E. coli* ile elde edilen sonuçlardan görülmektedir. *ompR* mutant *E. coli*'de ise daha önce belirtildiği gibi porin protein sentezinin olmadığı görülmüştür. Literatürde verilen bilgiler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [69, 28]. Ancak *envZ* mutant *E. coli*'de ortaya konan OmpC ve OmpF sentez düzeyi OmpR'yi düzenleyen başka faktörlerin varlığını göstermektedir. Daha önceki sonuçlarda olduğu gibi *pta* mutant *E. coli*'de OmpC, *rpoS* mutant *E. coli*'de OmpF'nin oldukça yüksek sentezlendiği ortaya konmuştur [32]. *rpoS* mutant *E. coli*'de OmpC porin protein sentezinin ise yabani tip OmpC porin sentezine göre %60 daha az sentezlendiği, *pta* mutant *E. coli*'de ise OmpF sentezinin yabani tip ile aynı oranda sentezlendiği görülmüştür. *hns* mutant *E. coli*'de ise yabani tip *E. coli*'deki senteze göre OmpC sentezinin %17 ve OmpF sentezinin ise %40 daha fazla olduğu görülmüştür.

Bakteriler, besinlerin bol ve çevresel şartların tamamen optimum olduğu durumlarda, besinlerin daha hızlı kullanılabilmesi için OmpF gibi büyük por çapına sahip porin proteinlerinin sentezini arttırdığı ortaya konmuştur [7]. Literatürdeki bulgulardan her iki porinin sentezinde *EnvZ*'nin önemli rolü olduğu bilinmektedir [71, 69, 28].

Literatürde HNS'nin *micF* ve *ompC* genleri arasına bağlanarak sentezlerini baskılayıcı özellik gösterdiği ortaya konmuştur [101]. Bu nedenle mutasyon nedeni ile HNS'nin olmamasının OmpC sentezini arttırdığı belirtilebilir. H-NS'nin zengin besiyerine aktarılmış olan logaritmik fazdaki bakterilerde yüksek oranda sentezlendiği bilinmektedir [138]. Dolayısı ile *hns* mutant *E. coli*'de *micF* RNA'nın zengin besiyerinde oldukça yüksek oranda sentezlenmesi [38] nedeni ile OmpF sentezinin yabani tipe göre sentezinin azalmasının gerekçesi olarak gösterilebilir. Ayrıca *hns* mutant *E. coli*'de osmolaritesiz şartlarda eksponential olarak büyümesi sırasında yabani tip *E. coli*'ye göre 10 kat daha yüksek RpoS miktarı tespit edilmiştir [139]. HNS nin hem RpoS mRNA translasyonunu hem de RpoS stabilitesini etkileyerek düzenleme yaptığı ve RpoS degradasyonunu sağlayan faktörleri etkilediği bilinmektedir. Liu ve Ferenci (2001) çalışmalarında *hns* mutantlarında RpoS'nin OmpF sentezini direkt olarak azaltmadığını, açıklanamamış bir yol ile OmpF sentezini

azalttığını ifade etmiştir [25]. Bu nedenle yabani tip *E. coli*'ye göre *hns* mutant *E. coli*'de sentezin azalmasına indirekt olarak RpoS veya *micF* RNA'nın sebep olduğunu söyleyebiliriz.

Yabani tipe göre 0.65 absorbanstan sonra OmpF sentezinin azalmasını durgunluk fazına doğru RpoS miktarının artması ve dolayısı ile yabani tipte bunun neden olduğu negatif etkinin *rpoS* mutant *E. coli*'de görülmemesinden kaynaklandığı ifade edilebilir. Bu bulguyu destekleyecek bilgiler ile uyumlu olduğu görülmüştür [74]. RpoS şu ana kadar sentez mekanizmaları ve çevresel şartlardaki düzenlenmesi tam olarak bilinmeyen, hala bir çok soru işaretlerine sahip kompleks bir mekanizmadır [110].

RpoS mutant *E. coli*'de yabani tipe göre oldukça düşük OmpC sentezi olduğu ve bu sentez düzeyinin inkübasyon periyodunca değişmediği görülmüştür. RpoS'nin OmpC promotörü üzerine bir etkisinin olmadığı belirtilmesine rağmen böyle bir düzenlemenin olabileceği, porin sentezini etkileyen diğer faktörlerle olan ilişkileri veya henüz tespit edilememiş başka mekanizmaların bu sentezde rol alabileceğini ifade edebiliriz [25]. AcP'nin yada *pta* enziminin bilinmeyen faktörler ile ilişkileri olabileceği tahmin edilmektedir. OmpC sentezinin ortaya çıkması için OmpR'nin fosforlanmasını sağlayacak başka faktörlerin olduğunu ya da Liu ve Ferenci (2001)'nin ifade ettiği gibi AcP eksikliğinin bilinmeyen bir mekanizma ile EnvZ kinaz aktivitesini artırarak OmpR-P miktarını yükseltebileceği, dolayısı ile OmpC sentezini sağlayabileceğini ifade edebiliriz [25]. Ancak henüz bu sonucu tam olarak açıklayabilecek bulgular bulunmamaktadır.

Sonuç olarak *E. coli* doğal çevresel ortamlarda karşılaştıkları çeşitli stres faktörlerinden kurtulabilmek ve o ortamlarda yaşamlarını devam ettirebilmek için çeşitli stratejiler geliştirmektedirler. Kimyasal maddelerin hücre içine alımını azaltmak için membran permeabilitesini değiştirmek bu stratejilerden birisi olup OmpC ve OmpF porin proteinleri bu permeabiliteyi değiştirmenin en temel yoludur. Kimyasal maddelerin içeri girişini azaltmak için genelde daha büyük por çapına sahip olan OmpF sentezini azaltmakta, OmpC sentezini ise arttırmaktadır. OmpC ve OmpF porin protein sentez mekanizmalarının ortaya çıkarılması oldukça zordur. Şekil 1.1 de görüldüğü gibi bir çok faktör sentez mekanizmasına karışmaktadır. Bilinen faktörlerin yanında bilinmeyen faktörlerin varlığı da söz konusu olup, moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması için kullanılan mutasyonlar başka mekanizmaları da etkileyeceği için istenilen net sonuçların alınmasını engellemekte ve elde edilen son uçların açıklanması oldukça zor olmaktadır. Bu çalışmada da elde edilen sonuçların açıklanmasında hem kompleks mekanizmadan hem de yeni bulunan verilerin bulunması nedeni zorluk çekilmiştir. Çalışmanın ilerki aşamaları

başka faktörler kullanılarak çalışılmalıdır. Kimyasal maddelere karşı direnç mekanizmalarının ortaya çıkarılması bakteriyal enfeksiyonlarla mücadele etmek için oldukça önemlidir.

Bu çalışmada kullanılan H-NS, RpoS, ve Acp molekülleri ayrı ayrı OmpC ve OmpF porin protein sentezini kontrol ettikleri gibi birbirlerini etkileyerekte bu sentezi kontrol etmektedirler. Dolayısı ile bu çalışmanın daha anlamlı ve mekanizmayı ortaya koyucu sonuçların elde edilebilmesi için ikili mutantlar (*rpos-hns*, *rpoS-pta*, *hns-pta* gibi) ile çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P and Swain, R., H., A., 1975. "Medical Microbioloji: The practise of Medical Microbiyology. Vol 2. 12th. ed. Churchill, Livingstone.
- [2] Cruickshank, R. Duguid, J. P. and Swain, R. H. A., 1973. "Medical Microbiology. Vol 1 Microbial Infections". 12th. ed. Churchill, Livingstone, Edinburgh, UK.
- [3] Macone, A. B., Pier, G. B., Pennington, J. E., Matthews, W. J. And Goldman, D. A., 1881. Mucoid *Escherichia coli* in cystic fibrosis. New England J. Med., 304, 1445-1449.
- [4] Winfield, M. D. and Groisman, E. A. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and *E. coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69 (7), 3687-3694.
- [5] Koebnik, R., Locher, K. P. and Van Gelder, P., 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol. Microbiol. 37(2), 239-253.
- [6] Chevalier, J., Pages J.M., Eyraud, A., and Mallea, M., 2000. Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 274, 496-499.
- [7] Nikaido, H. and Vaara, M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiological Rev. 49 (1), 1-32.
- [8] Schulz, G. E., 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1565, 308-317.
- [9] Nakae, T., 1976. Identification of outer membrane protein of *Escherichia coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 877-884
- [10] Cowan S. W., Schirman T., Rummel G., Steiert M., Ghash R., et al., 1992. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. Nature, 358, 727-733.
- [11] Garavito, R. M. and Rosenbusch J. P., 1980. Three dimensionel crystals of an integral membrane proteins an initial X ray analysis. J. Cell Biol. 86, 327-329.
- [12] Achouak, W., Heulin, T. and Pages, J. M., 2001. Multiple facets of bacterial porins. FEMS Microbiolgy Letters, 199, 1-7.
- [13] Lugtenberg, B. and Van Alpen, L., 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 737, 51-115.
- [14] Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayımları seri 46, Ankara, 548 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [15] Koebnik, R., 1999. Structural and functional roles of surface exposed loops of the barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181, 3688-3694.
- [16] Schirmer, T., 1998. General and specific porins from bacterial outer membrane. J. Struct. Biol. 121, 101-109.
- [17] Bernstein, H. D., 2000. The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. Curr. Opinion Microbiol. 3, 203-209.
- [18] Bauer K., Struyve M., Bosch J., Benz, R. and Tomassen J., 1989. One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264, 16393-16398.
- [19] Bainbridge G, Mobasheri H, Armstrong G A, Lea E.J.A. and Lakey J H. 1998a. Voltage-gating of *Escherichia coli* porin: a cystine-scanning mutagenesis study of Loop 3. J. Mol. Biol. 275, 171-176.
- [20] Bainbridge, G., Gökce, I. and Lakey, J. H., 1998b. Voltage gating is a fundamental feature of porin and toxin B barrel membrane channels. FEBS Lett. 431, 305-308.
- [21] Delcour, A. H., 1997. Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. FEMS Microbiology Letters, 151, 115-123.
- [22] Meyer, J. E. W. and Schulz G. E., 1997. Energy profile of malto oligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from statistical analysis of saccharide protein interactions. Protein Science, 6, 1084-1091.
- [23] Liu, X. and Ferenci, T., 1998. Regulation of porin mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180 (15), 3917-3922.
- [24] Özkanca, R., 1993. Survival and physiological status of *Escherichia coli* in lake water under different nutrient conditions, Ph D., Department of Biological Sciences, University of Warwick, England, p. 297.
- [25] Liu, X. and Ferenci, T., 2001. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation. Microbiology, 147, 2981-2989.
- [26] Ferenci, T., 1999. Regulation by nutrient limitation. Current Opinion in Microbiol., 2, 208-213.
- [27] Özkanca, R. and Flint, K. P., 2002. The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. Lett. Appl. Microbiol. 35, 533-537.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [28] Slauch, J. M., Garrett, S., Jackson, D. E. and Silhavy T. J., 1988. EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 170 (1), 439-441.
- [29] Sleator, R. D. and Hill, C., 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiol. Rev. 26, 49-71.
- [30] Heyde, M. and Portalier, R., 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12 by pH. Mol. Gen. Genet. 208, 511-517.
- [31] Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa T., et al., 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. Appl. Environ. Microbiol. 66 (3), 943-947.
- [32] Darcan, 2005. Karadeniz Suyunda pH, Osmolarite Ve Açlık Stresinin *Escherichia coli*'nin Dış Membran Porin Protein Sentez Düzeyine Etkisinin Araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Doktora Tezi. Samsun, 185 s.
- [33] Thomas A. D. and Booth I. R., 1992. The regulation of the porin gene *ompC* by acid pH. J. Gen. Microbiol. 138, 1829-1835.
- [34] Heyde, M., Laloil, P. and Portalier R., 2000. Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182 (1), 198-202.
- [35] Kim, S. K., Wilmes-Riesenberg, M. R. and Wanner, B. J., 1996. Involvement of the sensör kinase EnvZ in the in vivo activation of the response regulator PhoB by acetyl phosphate. Mol. Microbiol. 22, 405-413.
- [36] Lugtenberg, B., Peters, R., Bernheimer, H. and Berendsen, W., 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 147 (3), 251-262.
- [37] Andersen, J., Forst, S. A., Zhao, K., Inouye, M. and Delihas, N., 1989. The function of micF RNA: micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264, 17961-17970.
- [38] Delihas, N. and Forst, S., 2001. MicF: An antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. J. Mol. Biol. 313, 1-12.
- [39] Darcan, C., Özkanca, R., Şahin, N., Işık, K., ve Kariptaş, E., 2001. Dezenfektan özellikteki bazı kimyasal maddelerin deniz suyundaki *Escherichia coli* ML30 ve *Salmonella typhimurium* LT2'nin dış membran protein sentezine etkisi. Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25 (2), 57-66.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [40] Rosner, J.L., Chai, T.J., and Foulds J., 1991. Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173 (18), 5631-5638.
- [41] Ramani, N. and Boakye, K., 2001. Salicylate inhibits the translation and transcription of *ompF* in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 47, 1053-1057.
- [42] Darcan, C., 1999. Deniz suyunda dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *Escherichia coli* ML30 ve *Salmonella typhimurium* LT2 bakterilerinin protein sentezine olan etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 71 s.
- [43] Faber, F., Egli, T. and Harder, W., 1993. Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiol. Letters*, 111, 189-196.
- [44] Cohen, S. P., McMurry, L. M. and Levy, S. B., 1988. *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170 (12),5416-5422
- [45] Alekshun, M. N. and Levy, S. B., 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends in Microbiol.* 7 (10), 410-413.
- [46] Matsubara, M., Kitaoka, S., Takeda, S. and Mizuno, T., 2000. Tuning of the porin expressions by His-to-Asp cross phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*. *Genes to Cell*, 5, 555-569.
- [47] Sanchez, D. A., Hernandez, A. S., Martinez, M. L., Benedi, V. J. and Alberti, S., 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*. Its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 181, 2726-2732.
- [48] Low, A. S., MacKenzie F. M., Gould, I. M. and Booth, I. R., 2001. Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long term antibiotic therapy. *Mol. Microbiol.* 42 (3), 619-630.
- [49] Nitzan, Y., Deutsch, B. and Peshatnikov, I., 2002. Diffusion of β -Lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Curr. Microbiol.* 45, 446-455.
- [50] Alles, H. S., Alberti, S., Alvarez, D., Sanchez, D. A., Martinez M. L., et al., 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, 145, 673-679.
- [51] Hancock, R. E., 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiol.* 5, 37-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [52] De, E., Basle, A., Jaquinod, M., Saint, N., Mallea, M., et al., 2001. A new mechanism of antibiotics resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. *Molecular Microbiol.* 41 (1), 189-198.
- [53] Li, X. Z., Nikaido, H. and Williams K. E., 1997. Silver resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag^+ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* 179 (19), 6127-6132.
- [54] Sallmann, F. R., Descamps, B. S., Pattus, F., Salmon, V., Branza, N., et al., 1999. Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. *J. Bacteriol.* 274, 16107-16114.
- [55] Fourel, D., Mizushima, S., Bernadac, A. And Pages, J. M., 1993. Specific regions of *Escherichia coli* OmpF protein involved in antigenic and colicin receptor sites and in stable trimerization. *J. Bacteriol.* 175, 2754-2757.
- [56] Achouak, W., Pages, J. M., De Mot, R., Molle, G. and Heulin T., 1998. A major outer membrane protein of *Rahnella aquatilis* functions as a porin and root adhesin. *J. Bacteriol.* 180, 900-913.
- [57] De Mot, R. and Van Der Leyden, J., 1991. Purification of a root adhesive outer membrane protein of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81, 323-328.
- [58] Bernardini, M. L., Sana, M. G., Fontaine, A. and Sansonetti, P., 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 61, 3625-3635.
- [59] Dorman, C. J., Chatfield, S., Higgins, C. F., Hayward, C. and Dougan, G., 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 57, 2126-2140.
- [60] Provenzano, D. and Klose K. E., 2000. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 10220-10224.
- [61] Muller, A., Günther, D., Düx, F., Naumann, M., Meyer, T. F., et al., 1999. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J.* 18, 339-352.
- [62] Meghji, S., Henderson, B., Nair, S. P. and Tufano, M. A., 1997. Bacterial porins stimulate bone resorption. *Infection and Immunity*, 65 (4), 1313-1316.
- [63] Lingren, S. W., Stojiljkovic, I. And Heffron, F., 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 4197-4201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [64] Grant, W. D. and Long, P. E., 1981. Environmental Microbiology. Thomson Litho Ltd. Glasgow/Scotland, p 215.
- [65] Perraud, A. L., Weiss, V. and Gross, R., 1999. Signalling pathways in two component phosphorelay systems. Trends in Microbiol. 7 (3), 115-120.
- [66] Hoch, J. A., 2000. Two component and phosphorelay signal transduction. Current Opinion in Microbiol. 3, 165-170.
- [67] Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K. and 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.
- [68] Martinez Flores, I., Cano, R., Bustamante, V. H., Calva, E., and Puente, J. L., 1999. The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181 (2), 556-562.
- [69] Russo, F. D. and Silhavy T. J., 1991. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. J. Mol. Biol. 222, 567-580.
- [70] Lan, C. Y. and Igo, M. M., 1998. Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. J. Bacteriol. 180 (1), 171-174.
- [71] Forst, S., Delgado, J., Ramakrishnan, G. and Inouye, M., 1988. Regulation of *ompC* and *ompF* expression in *Escherichia coli* in the absence *envZ*. J. Bacteriol. 170 (11), 5080-5085.
- [72] Matsubara, M. and Mizuno, T., 1999. EnvZ independent phosphotransfer signaling pathway of the OmpR mediated osmoregulatory expression of OmpC and OmpF in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 408-414.
- [73] McCleary, W. R., Stock, J. B. and Ninfa, A. J., 1993. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? J. Bacteriol. 175 (10), 2793-2798.
- [74] Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. and Silhavy, T. J., 1996. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 20, 911-917.
- [75] Atlung, T. and Ingmer, H., 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. Mol. Microbiol. 24 (1), 7-17.
- [76] Goosen, N. and Van de Putte, P., 1995. The regulation of transcription initiation by integration host factor. Mol. Microbiol. 16, 1-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [77] Ramani, N., Hedeshian, M. and Freundlich, M., 1994. *micF* antisense RNA has a major role in osmoregulation of OmpF in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176 (16), 5005-5010.
- [78] Goundreau, P. N. and Stock, A. M., 1998. Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. Current Opinion in Microbiol. 1, 160-169.
- [79] Dutta, R., Qin, L. and Inouye, M., 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. Molecular Microbiol., 34 (4), 633-640.
- [80] Russo, F. D., Slauch, J. M. and 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.
- [81] Bergstrom, L. C., Qin, L., Harlocker, S. L., Egger, L. A., and Inouye, M., 1998. Hierarchical and co-operative binding of OmpR to a fusion construct containing the *ompC* and *ompF* upstream regulatory sequences of *Escherichia coli*. Genes to Cells, 3, 777-788.
- [82] Ikenaka, K., Ramakrishnan, G., Inouye, M., Tsung, K. and Inouye M., 1986. Regulation of the *ompC* gene of *Escherichia coli*: involvement of tree tandem promoters. J. Biol. Chem. 261, 9316-9320.
- [83] Jo, Y. L., Nara, F., Ichihara, S., Mizuno, T. and Mizushima, S., 1986. Purification and characterization of the OmpR protein, a positive regulator involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 261, 15252-15256.
- [84] Forst, S., Comeau, D., Norioka, S. and Inouye, M., 1987. Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262, 16433-16438.
- [85] Mizuno, T., Wurtzel, E. T. and Inouye, M., 1982. Osmoregulation of gene expression. II. DNA sequence of the *envZ* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. J. Biol. Chem. 257, 13692-13698.
- [86] Wurtzel, E. T., Chou, M. Y. and Inouye, M., 1982. Osmoregulation of gene expression. I. DNA sequence of the *ompR* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. J. Biol. Chem. 257, 13682-13691.
- [87] Tokishita, S., Yamato, H., Taiba, H. And Mizuno, T., 1990. Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 108, 488-493.
- [88] Igo, M. M. and Silhavy, T. J., 1988. EnvZ, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K12, is phosphorylated in vitro. J. Bacteriol. 170, 5971-5973.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [89] Leonardo, M. R. and Forst, S., 1996. Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 22, 405-413.
- [90] Jung, K., Hamann, K. and Revermann, A., 2001. K⁺ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 276 (44), 40896-40902,
- [91] Shin, S. and Park, C., 1995. Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J. Bacteriol.* 177 (16), 4696-4702.
- [92] Stock, J. B., Ninfa, A. J. and Stock, A. M., 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53, 450-490.
- [93] Lee, A. K., Detweiler, C. S. and Falkow, S., 2000. OmpR regulates the two component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* 182 (3), 771-781.
- [94] Higashitani, A., Nishimura, Y., Hara, H., Aiba, H., Mizuno, T. et al., 1993. Osmoregulation of the fatty acid receptor gene *fadL* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 240, 339-347.
- [95] Pruss, B. M., 1998. Acetyl phosphate and the phosphorylation of OmpR are involved in the regulation of the cell division rate in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 170, 141-146.
- [96] Coyer, J., Andersen, J., Forst, S. A., Inouye, M. and Delihis, N., 1990. *micF* RNA in *ompB* mutants of *Escherichia coli*: Different pathways regulate *micF* RNA levels in response to osmolarity and temperature change. *J. Bacteriol.* 172 (8), 4143-4150.
- [97] Chou, J. H., Greenberg, J. T. and Demple B., 1993. Post transcriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* 175, 1026-1031.
- [98] Manchado, M., Michan, C. and Pueyo, C., 2000. Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo. *J. Bacteriol.* 182, 6842-6844.
- [99] Ferrario, M., Ernsting, B. R., Borst, D. W., Wiese, D. E., Blumanthal, R. M., et al., 1995. The leucine responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and regulates translation of OmpF. *J. Bacteriol.* 177, 103-113.
- [100] Oh, J. T., Cajal, Y., Skowronska, E. M., Belkin, S., Chen, J., et al., 2000. Cationic peptide antimicrobials induce selective transcription of *micF* and *osmY* in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1463, 43-54.
- [101] Suzuki, T., Ueguchi, C. and Mizuno, T., 1996. H-NS regulates OmpF expression through *micF* antisense RNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 3650-3653.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [102] Deighan, P., Free, A. and Dorman, C. J., 2000. A role for the *Escherichia coli* HNS like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of micF RNA stability. *Mol. Microbiol.* 38 (1), 126-139.
- [103] Painbeni, E., Caroff, M. and Yaniv, R., 1997. Alterations of the outer membrane composition in *Escherichia coli* lacking the histone-like protein HU. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6712-6717.
- [104] Aiba, H., Matsuyama, S. I., Mizuno, T. and Mizushima, S., 1987. Function of *micF* as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the *ompF* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169 (7), 3007-3012.
- [105] Matsuyama, S. C. and Mizushima, S., 1985. Construction and characterization of a deletion mutant lacking *micF*, a proposed regulatory gene for OmpF synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 162 (3), 1196-1202.
- [106] McCleary, W. R. and Stock, J. B., 1994. Acetyl phosphate and the activation of two component response regulators. *J. Biol. Chem.* 269 (50), 31567-31572.
- [107] Bouche, S., Klauck, E., Fischer, D., Lucassen, M., Jung, K. and Hengge Aronis, R., 1998. Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator controlled process. *Mol. Microbiol.* 27, 787-795.
- [108] Iuchi, S. and Lin, E. C. C., 1992. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 5617-5623.
- [109] Wolfe, A. J., Chang D. E., Walker, J. D., Partridge, J. E., Vidaurri, M. D., et al., 2003. Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol. Microbiol.* 48 (4), 977-988.
- [110] Repoila, F., Majdalani, N. and Gottesman, S., 2003. Small non coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.* 48 (4), 855-861.
- [111] Notley, M. L. and Ferenci, T., 1996. Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: What level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* 178 (5), 1465-1468.
- [112] Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., John, K. S. and Gottesman, S., 2001. Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA, *Mol. Microbiol.* 39, 1382-1394.
- [113] Zhang, A. X., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., et al., 1998. The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J.* 17, 6061-6068.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [114] Lease, R. A., Cusick, M. and Belfort, M., 1998. Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 12456-12461.
- [115] Dorman, C. J., Jay, C. D. and Free, A., 1999. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. Trend in Microbiol. 7(3), 124-128.
- [116] Williams, R. M. and Rimsky, S., 1997. Molecular aspects of the *Escherichia coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. FEMS Microbiol. Lett. 156, 175-185.
- [117] Trachman, J. D. and Maas, W. K., 1998. Temperature regulation of heat labile enterotoxin (LT) synthesis in *Escherichia coli* is mediated by an interaction of H-NS protein with the LTA-subunit DNA. J. Bacteriol. 180, 3715-3718.
- [118] Ramani, N., Huang, L. and Freundlich, M., 1992. In vitro interactions of integration host factor with the *ompF* promoter regulatory region of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 231 (2), 248-255.
- [119] Ariza, R. R., Li, Z., Ringstad, N. and Demple, B., 1995. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. J. Bacteriol. 177, 1655-1661.
- [120] Jair, K. W., Martin, R. G., Rosner, J. L., Fujita, N., Ishihama, A., et al., 1995. Purification of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. J. Bacteriol. 177, 7100-7104.
- [121] Bensaïd, A., Almeida, A., Drlica, K. and Rouviere-Yaniv, J., 1996. Cross-talk between topoisomerase I and HU in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 256 (2), 292-300.
- [122] Boubrik, F. and Rouviere-Yaniv, J., 1995. Increased sensitivity to γ irradiation in bacteria lacking protein HU. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 92, 3958-3962.
- [123] Dixon, N. E. and Kornberg, A., 1984. Protein HU in the enzymatic replication of the chromosomal origin of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 (2), 424-428.
- [124] Huang, L., Tsui, P. and Freundlich, M., 1990. Integration host factor is a negative effector of in vivo and in vitro expression of *ompC* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172 (9), 5293-5298.
- [125] Huang, L., Schiebel, J. L. and Igo, M. M., 1994. A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli ompF* gene. J. Bacteriol. 176, 1309-1315.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [126] Asako, H., Kobayashi, K. and Aono, R., 1999. Organic solvent tolerance of *Escherichia coli* is independent of OmpF levels in the membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1), 294-296.
- [127] Alekshun, M. N. and Levy, S. B., 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41, 2067-2075.
- [128] Death, A. and Ferenci T., 1994. Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.* 176, 5101-5107.
- [129] Huang, L., Tsui, P. and Freundlich, M., 1992. Positive and negative control of *ompB* transcription in *Escherichia coli* by cyclic AMP and the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* 174, 664-670.
- [130] Hsieh, L. S., Burger, R. M. and Drlica, K., 1991. Bacterial DNA supercoiling and (ATP)/(ADP) changes associated with a transition to anaerobic growth. *J. Mol. Biol.* 219, 443-450.
- [131] Dorman, C. J., Barr, G. C., Nibhriam, N. Higgins, C. F., 1988. DNA supercoiling and anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bacteriol.* 170, 2816-2826.
- [132] Graeme-Cook, K. A., May, G., Bremer, E. and Higgins, C. F., 1989. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* 3, 1287-1294.
- [133] Metin, M. ve F. Öztürk. 1995. Süt İşletmelerinde Sanitasyon. Ege Üniv. Meslek Yüksek Okulu Yayınları No: 17, İzmir, s.79-110.
- [134] Gökalp, H. Y., Kaya, M., Zorba, O. 2004. *Engineering of meat products processing* (5th ed.). (in Turkish). Atatürk Univ. Publ. No: 786, Faculty of Agriculture, No: 320. Erzurum, Turkey.
- [135] Miller, H. J., 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, p 456
- [136] Bavoil, P., Nikaido, H. and Von Meyenburg, K., 1977. Pleiotropic transport mutants of *Escherichia coli* lack porin, a major outer membrane protein. *Mol. Gen. Genet.* 158, 23-33.
- [137] Delihias, N., 1995. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNA *Mol. Microbiol.* 15:411-414
- [138] Free, A. and Dorman, C. J., 1995. Coupling of *Escherichia coli* HNS Messenger RNA levels to DNA-synthesis by autoregulation implications for growth phase control. *Mol. Microbiol.* 18 (1): 101-113.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [139] Barth, M., Marchall, C., Muffler, A., Fischer, D. and Hengge-Aronis, R., 1995. Role for the histone like protein H-NS in growth phase dependent and osmotic regulation of sigma S and many σ^S -dependent genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177, 3455-3464.