



OmpC -OmpF PORİN PROTEİNİ EXPRESSION OF *Escherichia coli* IN NUTRIENT BROTH AND THE ROLE OF EnvZ, OmpR, H-NS, AcP AND RpoS ON THIS EXPRESSION

Cihan DARCAN* & Reşit ÖZKANCA**

*Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Kütahya/Türkiye

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Samsun/Türkiye

*Sorumlu Yazar: cihand@dumlupinar.edu.tr

ABSTRACT

Although OmpC and OmpF porin proteins have important role to play in the survival of *Escherichia coli* under different environmental conditions, mechanisms and the influence of different environmental conditions on porin expression is not as well known. In this study, we tried to investigate the role of EnvZ, OmpR, H-NS, AcP and RpoS molecules on control of *E. coli* OmpC and OmpF porin expression to grown in nutrient broth as a rich medium. It were determined that *E. coli* strains carrying mutations in the *envZ*, *ompR*, *rpoS*, *pta* and *hns* genes showed not significant difference according to wild type point of view grown at nutrient broth. During grown in nutrient broth, While wild type *E. coli* OmpC expression was increased, OmpF expression was greatly reduced. It were determined that especially increased OmpF porin expression in *rpoS* mutant *E. coli* and OmpC porin expression in *pta* mutant *E. coli* according to wild type *E. coli*. There was no expression of *ompC* and *ompF* in the *ompR* mutant. The expression of *ompC* and *ompF* in the *hns* mutant was inconsiderably increased compared to the wild type *E. coli*.

Key Words: *Escherichia coli*, Porin, H-NS, RpoS, AcP

NUTRIENT BROT BESİYERİNDE *Escherichia coli*'NİN OmpC-OmpF PORİN PROTEİN SENTEZİ, BU SENTEZDE EnvZ, OmpR, H-NS, AcP ve RpoS'NİN ROLÜ

ÖZET

OmpC ve OmpF porin proteinlerinin farklı çevresel şartlarda *Escherichia coli*'nin yaşamında önemli bir rol oynamasına rağmen sentezi üzerine farklı çevresel şartların etkisi ve mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada zengin besiyeri olarak nutrient brot besiyerinde üretilen *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porin sentez düzeyi ve bu sentezin kontrolünde EnvZ, OmpR, H-NS, AcP ve RpoS'nin rolü araştırılmıştır. *E. coli*'nin *envZ*, *ompR*, *hns*, *pta* ve *rpoS* gen bölgelerinin mutasyona uğratılmasının besiyerinde üreme açısından yabani tipe göre bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Protein sentezinde ise üreme süresince OmpC sentezi artarken, OmpF sentezi oldukça azalmıştır. Yabani tip *E. coli*'ye göre özellikle *rpoS* mutantında OmpF, *pta* mutantında ise OmpC nin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. EnvZ'nin porin sentezi için oldukça önemli olduğu, OmpR'nin olmadığı durumda sentezin gerçekleşmediği belirlenmiştir. *hns* mutasyonunda ise OmpC ve OmpF sentezinin hafifçe arttığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, Porin, H-NS, RpoS, AcP

1-GİRİŞ

Bakteriler, doğal çevrelerde pH, osmolarite, sıcaklık, açlık gibi yaşamlarını sınırlandıran bir çok stres faktörüne maruz kalmaktadırlar (1). Bu şartlar altında yaşam şanslarını arttırabilmek için çeşitli yaşam stratejileri geliştirmektedirler. Membran permeabilitesinin değiştirilmesi bu stratejilerden birisi olup, bu değişimi porin protein düzeyi ile sağlamaktadırlar (2). Porin proteinleri, gram negatif bakterilerin dış membranında 600 kDa dan küçük hidrofilik moleküllerin geçişini kontrol eden, su dolu kanallar olarak tanımlanır. Bu proteinlerden *E. coli*'de bulunan OmpC ve OmpF porin proteinleri yaklaşık olarak 35 ve 36 kDa moleküler ağırlığa sahiptirler (3). Porin proteinlerinin sentezi pH, açlık, osmolarite, çeşitli kimyasal maddeler gibi çevresel şartlar tarafından düzenlenir (4, 5, 6). Normal şartlar altında toplam OmpF ve OmpC porin protein miktarı sabitken, osmolarite,

sıcaklık, pH gibi stres şartları nedeni ile sentez oranları değişmektedir (7). Herhangi bir induksiyon olmaksızın zengin ortamda büyütülen *E. coli*'de *ompA*, *ompC*, ve *ompF* mRNA düzeylerinin, bütün genom sentez analizi ile incelendiğinde, translasyonel kontrolü sağlayan ribozomal protein mesajları ile birlikte sentezi en yüksek olan 100 mRNA arasında olduğu tespit edilmiştir (8).

OmpC and OmpF porin protein sentezini düzenleme mekanizması oldukça kompleksdir. Bir çok faktör porin sentezinin transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde kontrolüne katılmaktadır. OmpC ve OmpF porin sentezinin düzenlenmesinde en iyi bilinen sistem EnvZ/OmpR iki bileşikli fosforlama sistemidir (9). Yüksek düzeyde OmpR-P, OmpC sentezini uyarır ve OmpF sentezini baskılar. Ancak düşük düzeyde OmpR-P, OmpF sentezini indüklemektedir. Bir hücrede OmpR-P miktarı düşük ozmolarite ile azalırken, yüksek ozmolarite ile artış göstermektedir. Bu artışta en önemli faktör olarak EnvZ osmosensörü tespit edilmiştir. Ancak OmpC ve OmpF porin sentezinin düzenlenmesi tamamen EnvZ bağımlı değildir (10, 11). Bir çok faktör bu senteze çeşitli kademelerde katılmaktadır. Ancak bu faktörlerin hangi stres koşullarında nasıl etki gösterdikleri tam olarak bilinmemektedir. Çeşitli alternatif histidin kinaz donörleri (12), asetil fosfat (AcP), fosforamidat ve karbamil fosfat OmpR'yi fosforlayabilmektedir (13, 14). Ayrıca alternatif sigma faktörü (RpoS) (4), integration konak faktör (IHF) (15), histon benzeri DNA bağlanma proteini (H-NS) (16) ve AcP (14) gibi bir çok global regülatörün, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde porin sentezini düzenlediği bilinmektedir. OmpC ve OmpF sentezini kontrol eden EnvZ/OmpR iki-bileşikli regülatör sistem ile ilişkili olarak çalışan bu moleküllerin yanında hala tespit edilememiş olan bir çok molekülün olduğu tahmin edilmektedir. OmpC ve OmpF porin protein sentezine karşı moleküllere son olarak RybB, MicC, MicA, RseX ve IpeX gibi küçük RNA molekülleri katılmıştır (17, 18, 19, 20, 21). Dolayısı ile bu faktörlerin farklı çevresel stres şartlarında OmpC ve OmpF porin sentezini nasıl kontrol ettiklerine dair moleküler mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Hangi stres faktöründe hangi molekül tam olarak rol almakta henüz tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada, *E. coli*'nin zengin besiyerinde OmpC and OmpF porin sentezi ve bu sentez üzerine EnvZ, OmpR, RpoS, H-NS ve AcP'nin etkisi araştırılmıştır. Bu moleküllerin zengin besiyerinde üretilen *E. coli*'nin OmpC ve OmpF sentez mekanizması üzerindeki etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2- MATERYAL VE METOD

2.1- Kullanılan Bakteriyal Strainler

Bu çalışmada kullanılan *Escherichia coli* yabancı tip ve mutant strainler Sydney Üniversitesi (Avustralya) Moleküler ve Mikrobiyal Bilimler Okulu laboratuvarı öğretim üyesi Thomas Ferenci'den (22) temin edilmiştir ve özellikleri Çizelge 2.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *E. coli* strainleri ve özellikleri

Bakteri	Genotip	Kaynak
MH225	MC4100 U(<i>ompC-lacZ</i> ⁺)10-25 (yabancı tip)	(22)
MH513	MC4100 <i>araD</i> +U(<i>ompF-lacZ</i> ⁺)16-13 (yabancı tip)	(22)
BW3343	MH513 <i>envZ60::Tn10</i>	(22)
BW3345	MH225 <i>envZ60::Tn10</i>	(22)
BW3303	MH513 <i>ompR::Tn10</i>	(22)
BW3304	MH225 <i>ompR::Tn10</i>	(22)
BW3301	MH513 <i>rpoS::Tn10</i>	(22)
BW3302	MH225 <i>rpoS::Tn10</i>	(22)
BW3305	MH513 <i>hns::neo</i>	(22)
BW3306	MH225 <i>hns::neo</i>	(22)
BW3601	MH513 <i>pta::kan</i>	(22)
BW3602	MH225 <i>pta::kan</i>	(22)

2.2 Protein sentezinin ölçülmesi

Bakteri kültürleri 5 ml'lik nutrient brot içeren deney tüplerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilerek üretilmiştir. Daha sonra bu tüplerden 100 µl bakteri örneği 50 ml nutrient brot içeren 100 ml'lik erlenlere aktarılarak 37 °C'de 72 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince üreme grafiği için örnek alınarak spektrofotometrede OD₆₀₀ de absorbansı ölçülmüştür. Ayrıca absorbansa ve saate göre yapılan örnek alımları ile lacZ aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için Miller (1992)'ın yöntemi kullanılmıştır (23). Buna göre 100 µl örnek alınmış ve üzerine 900 µl Z tamponu {60 mM Na₂HPO₄ (Merck), 40 mM NaH₂PO₄·2H₂O (Merck), 10 mM KCl (Merck), 1 mM MgSO₄·7H₂O (Merck), 50 mM β-Mercaptoetanol (Sigma)} ilave edilmiştir. Daha sonra pastör pipeti ile bir damla toluen (Merck) damlatılmış ve kısa bir süre karıştırıldıktan sonra tüplerin ağzı açık olarak 37 °C'de 45 dk inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler inkübasyondan sonra su banyosunda 28 °C de 5 dk bırakılmış ve ONPG (Sigma) stok solüsyonundan 200 µl ilave edilerek 10 dk bekletilmiştir. 10 dk sonra örnekler 1 M Na₂CO₃ (Sigma) den 0.5 ml ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Örneklerin 420 nm ve 550 nm de spektrofotometrede ölçümleri yapılmış ve değerler aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (23). Veriler 4 tekrar sonucunda elde edilen ortalamaları yansıtmaktadır.

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

3- SONUÇ VE TARTIŞMA

3.1 Yabani tip *E. coli* ve mutantların besiyerinde üreme grafikleri

Zengin besiyerinde üreme sırasında porin protein sentezi ve mekanizmasının nasıl olduğunun, inkübasyon süresinin uzatılarak bakterinin açlık şartlarına girmesi durumunda porin sentezinin nasıl değiştiğini ve değişimi kontrol eden faktörleri tespit etmek amacı ile nutrient brot besiyerinde deneyler yapılmıştır. *envZ*, *ompR*, *rpoS*, *hns* ve *pta* gen bölgeleri antibiyotik kaset veya transpozon ile mutasyona uğratılmış ve aynı zamanda OmpC ve OmpF gen bölgelerine fonksiyonel *lacZ* geni ilave edilerek hazırlanmış *E. coli* strainleri kullanılmıştır. AcP'in etkisine bakmak için bu molekülün sentezini sağlayan *pta* (Asetil-CoA'dan AcP üretimini sağlayan fosfotransasetilaz enzimi) gen bölgesi mutasyona uğratılmıştır. Böylece ortama asetat ilave edilmedikçe AcP sentezi bloke edilmiştir. Dolayısı ile β-galaktosidaz aktivitesi OmpC ve OmpF porin protein sentez miktarının ölçümü için kullanılmıştır. Bu deneylerde yabani tip *E. coli* ve mutantlar 72 saat süre ile 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince 3'er saatlik zaman aralıkları ile örnekler alınmıştır. Ayrıca bakteri yoğunluğuna göre de belirli yoğunluklarda örnekler alınarak porin protein sentez düzeyindeki değişimler takip edildi ve üreme grafikleri çıkarıldı.

Şekil 1 ve 2'deki üreme grafiklerinde mutantlar arasında belirgin bir farkın olmadığı görülmektedir. Dolayısı ile mutasyonların *E. coli*'nin üremesinde bir farklılık meydana getirmediği görülmektedir. Porin proteinleri eksik *E. coli* mutant strainlerinin besince yüksek besiyerlerinde büyüme oranlarının yabani tip *E. coli* gibi normal, fakat besin konsantrasyonu düşük olduğu zaman ise büyüme oranlarının düşük olduğu ortaya konmuştur (24).

3.2 Nutrient Brot besiyerinde OmpC ve OmpF porin sentezi ve bu sentezde EnvZ, RpoS, H-NS, AcP'in rolü

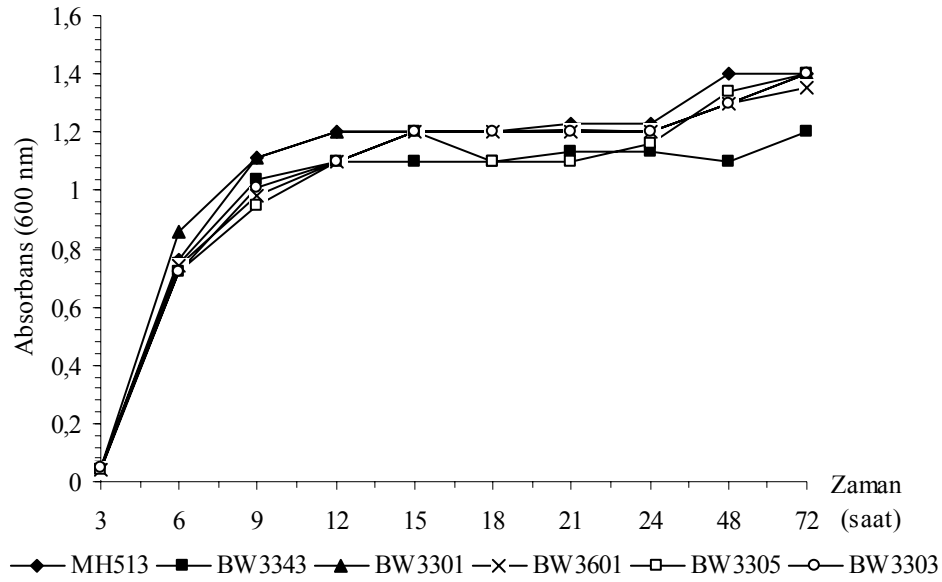
İnkübasyon periyodunun 18. saatinde alınan örnekler incelendiğinde Şekil 3 de görüldüğü gibi yabani tip *E. coli*'ye göre mutantlarda farklı düzeylerde porin sentezinin olduğu ortaya konmuştur. 18. saatte yabani tip *E. coli*'de OmpF porin proteini 175 ünite iken, OmpC porin proteini 681 ünite sentezlenmiştir. *envZ* mutant *E. coli*'de ise OmpC porin proteini 150, OmpF porin proteini ise 117 ünite sentezlendiği tespit edilmiştir. Sensör mutasyonunun 18. saatte OmpC sentezi için çok önemli olduğu görülmektedir. Bu sonuca göre *envZ* mutant *E. coli*'de yüksek OmpR-P sağlanamadığı için OmpC oldukça düşük sentezlendiği görülmektedir. *rpoS* mutant *E. coli*'de OmpF porin proteini 1138 ünite, OmpC porin proteini ise 280 ünite sentezlenmiş, *pta* mutantında ise OmpF porin proteini 256 ünite, OmpC porin proteini ise 1654 ünite sentezlendiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre *rpoS* mutasyonu nedeni ile yabani tip *E. coli*'ye göre OmpF porin protein sentezinin 6.5 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Dolayısı ile RpoS sigma faktörünün OmpF sentezi üzerine oldukça baskılayıcı etkisinin olduğunu ifade edebiliriz. Aynı şekilde *pta* mutasyonunda OmpC sentezinde yabani tip *E. coli*'ye göre 2.42 kat

daha fazla sentezlenmesi AcP eksikliğinin OmpC sentezi üzerine pozitif etkisini göstermekte, yabani tipte AcP'nin OmpC sentezini baskıladığını ifade etmektedir. Yabani tip *E. coli*'de *rpoS* mutant *E. coli*'ye göre OmpC sentezinin 2.4 kat, *pta* mutasyonunun da ise OmpF sentezi yabani tipe göre 1,4 kat daha fazla sentezlendiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre RpoS'nin OmpC porin proteininin sentezi üzerine pozitif etkisi, AcP'nin ise OmpF porin proteininin sentezi üzerine negatif etkisi olduğu söylenebilir. *hns* mutant *E. coli*'nin OmpF porin proteini 238 ünite, OmpC porin proteini ise 814 ünite sentezlendiği tespit edilmiştir. Buna göre her iki porinin sentezinin H-NS olmadığı zaman yabani tip *E. coli*'ye göre arttığı görülmektedir. Bu sonuca göre H-NS'nin yabani tip *E. coli*'de her iki porinin sentezi üzerine baskılayıcı bir etkisinin olduğunu ifade edebiliriz. *ompR* mutant *E. coli*'de ise iki porininde sentezlenmediği görülmüştür. OmpR, bu porinlerin sentezinde merkezi rol alan regülatör protein olduğu görülmektedir. Her iki porinin sentezinde EnvZ sensörünün önemli rolü olduğu *envZ* mutant *E. coli* ile elde edilen sonuçlardan görülmektedir. Slauch ve ark. (1988) da çalışmalarında OmpC ve OmpF porin protein sentezinde EnvZ sensörünün çok önemli olduğunu ifade etmişlerdir (25, 26). *rpoS* mutant *E. coli* (BW3301)'de OmpF sentezi, *pta* mutant *E. coli* (BW3602)'de ise OmpC sentezi oldukça yüksek çıkmıştır. Bu durumu daha detaylı analiz edebilmek için nutrient brota ekim yapıldıktan sonra üreme süresince hem absorbansa hem de saate göre ölçümler yapılmıştır.

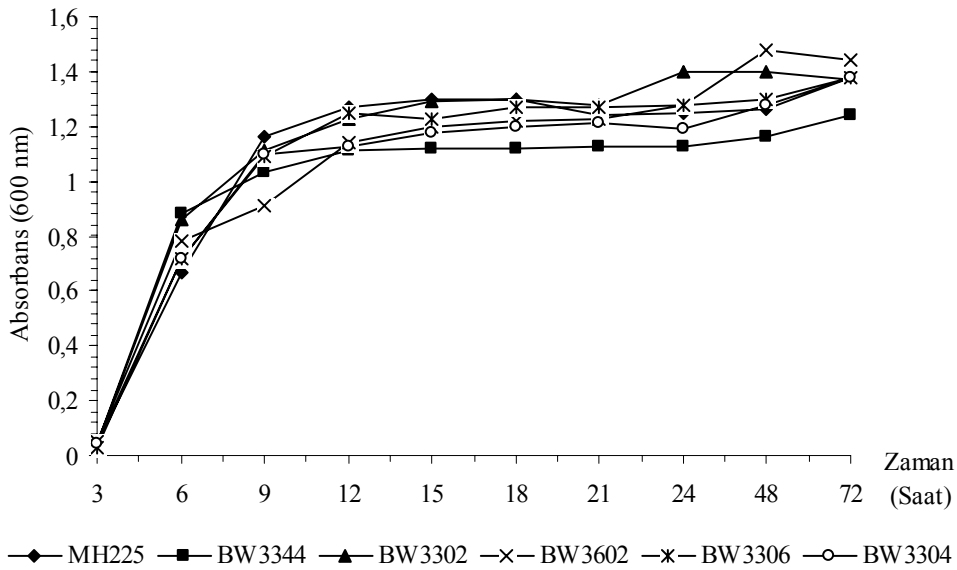
Nutrient brotta üretilen *E. coli*, optimum şartlar sağlandığı için hızlı büyüme durumunda, 0. saatten itibaren OmpF porin proteinini oldukça yüksek oranda sentezlediği tespit edilmiştir. (Şekil 4). Ekim yapıldığı andan 0.15 absorbans bakteri yoğunluğuna ulaşılan kadar OmpF sentezinin yabani tipte oldukça yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. 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 bilinmektedir (27). Yabani tip *E. coli*'de 0.15 absorbansdan 0.65 absorbans bakteri yoğunluğuna ulaşıldığı ana kadar mutantlara göre daha yüksek OmpF sentezi gerçekleştiği ve bu bakteri yoğunluğundan sonra OmpF sentezinin kademeli olarak azaldığı tespit edilmiştir.

OmpF sentezinde 0.15 absorbansdan 1.25 absorbans (15. saat) bakteri yoğunluğuna ulaşılan kadar sentez yaklaşık 5 kat azalmıştır. Bu yoğunluğun görüldüğü yaklaşık 15. saatten itibaren 72. saate kadar aynı seviyede sentez olduğu Şekil 6 da görülmektedir. Yabani tip *E. coli*'de inkübasyon süresince bakteri yoğunluğu arttıkça OmpC sentezinin arttığı görülmektedir. *envZ* mutant *E. coli* den elde edilen sonuçlar yabani tip *E. coli*'deki OmpF sentezinin sensörden kaynaklandığını göstermektedir. Çünkü *envZ* mutant *E. coli*'de OmpF sentezi en düşük senteze sahip olan ve yabani tipteki sentez artışı ve azalmasını göstermeyen bir sonuç ortaya koymuştur. OmpC sentezinde de EnvZ'nin çok önemli rolü olduğu görülmektedir. Literatürdeki bulgulardan her iki porinin sentezinde EnvZ'nin önemli rolü olduğu bilinmektedir (10, 25, 26). Ancak EnvZ olmadan da OmpC ve OmpF sentezi olduğu bilinmekle birlikte (11, 12, 14, 28), EnvZ olmadan farklı çevresel stres şartlarında sentezde hangi molekülün rol aldığı ve nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir.

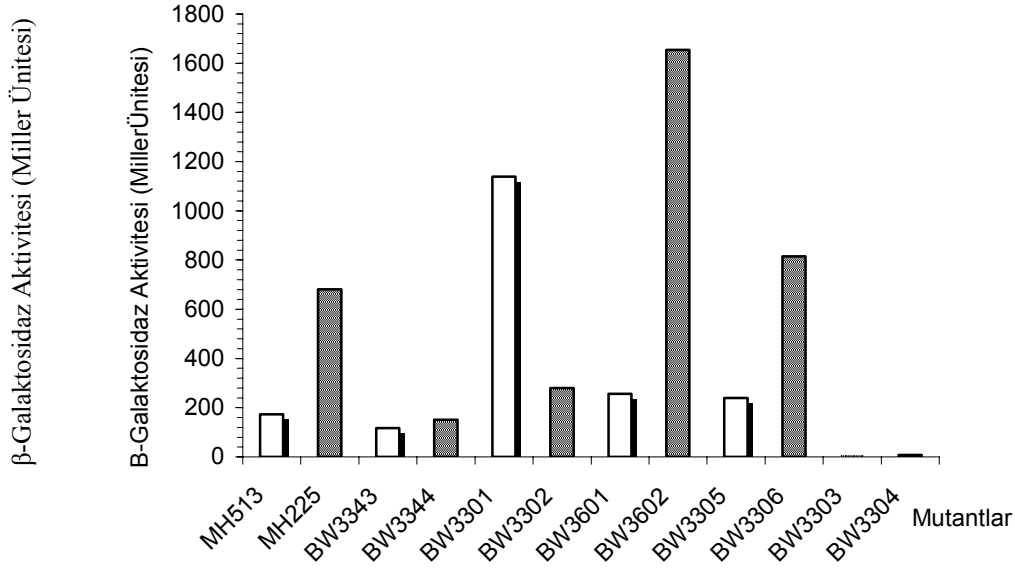
hns mutant *E. coli*'de 0.95 absorbans bakteri yoğunluğuna ulaşılan kadar yabani tip *E. coli*'den daha az OmpF sentezi olduğu görüldü. OmpC'nin ise 0.65 absorbanstan sonra sentezinin bu mutasyonda arttığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarla H-NS'nin *micF* ve *ompC* genleri arasına bağlanarak OmpF sentezini baskılayıcı özellik gösterdiği ortaya konmuştur (16). Bu nedenle mutasyon nedeni ile H-NS'nin olmamasının OmpC sentezini arttırdığı belirtilebilir. H-NS'nin zengin besiyerine aktarılmış olan logaritmik fazdaki bakterilerde yüksek oranda sentezlendiği bilinmektedir (29). Dolayısı ile *hns* mutant *E. coli*'de *micF* RNA'nın zengin besiyerinde oldukça yüksek oranda sentezlenmesi (30) nedeni ile OmpF sentezinin yabani tipe göre azaldığı düşünülmektedir. Ayrıca *hns* mutant *E. coli*'de osmolaritesiz şartlarda büyüme sırasında yabani tip *E. coli*'ye göre 10 kat daha yüksek RpoS miktarı tespit edilmiştir (31). H-NS nin hem RpoS mRNA translasyonunu hem de RpoS stabilitesini etkileyerek düzenleme yaptığı ve RpoS degradasyonunu sağlayan faktörleri etkilediği bilinmektedir (32). Liu ve Ferenci (2001) açlık stresi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında *hns* mutantlarında RpoS'nin OmpF sentezini direkt olarak azaltmadığını, açıklanamamış bir yol ile OmpF sentezini azalttığını ifade etmişlerdir (22). Bu nedenle yabani tip *E. coli*'ye göre *hns* mutant *E. coli*'de sentezin azalmasına indirekt olarak RpoS veya MicF RNA'nın sebep olduğu söylenebilir. 0.95 absorbanstan sonraki periyotta ve 72. saate kadar yabani tip ile aynı düzeyde sentez gerçekleşmiştir.



Şekil 1. Yabani tip *E. coli* (MH513) ve mutantların üreme grafiği, MH513 (yabani tip) BW3343 (*envZ*), BW3301 (*rpoS*), BW3601 (*pta*), BW3305 (*hns*), BW3303 (*ompR*)



Şekil 2. Yabani tip *E. coli* (MH225) ve mutantlarda üreme grafiği MH225 (yabani tip), BW3344 (*envZ*), BW3302 (*rpoS*), BW3602 (*pta*) BW3306 (*hns*), BW3304 (*ompR*)

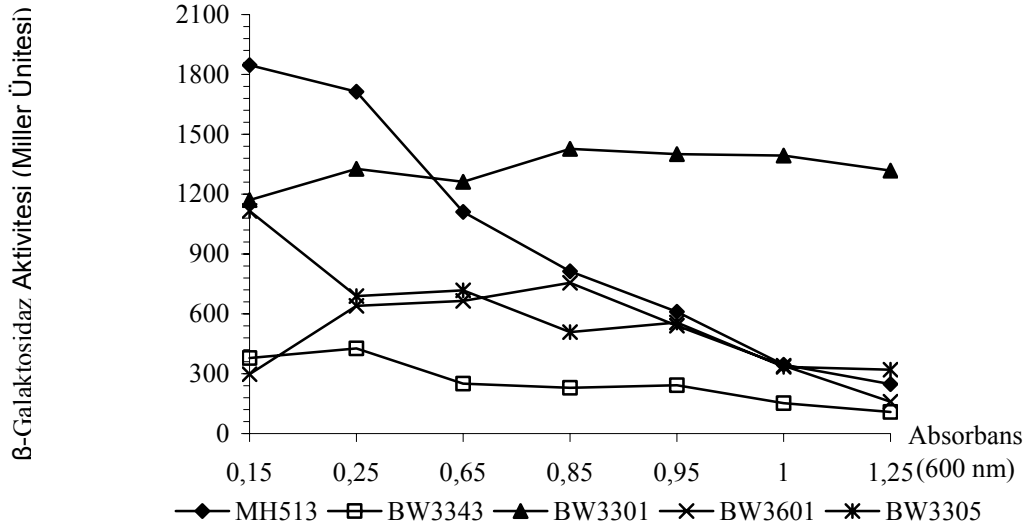


Şekil 3. Nutrient brotta yabani tip ve mutantların 18. saatteki OmpC ve OmpF porin protein sentez düzeyi. MH513 ve MH225 (yabani tip *ompF* ve *ompC*) BW3343 (*envZ ompF-lacZ*), BW3344 (*envZ ompC-lacZ*), BW3301 (*rpoS⁻ ompF-lacZ*), BW3302 (*rpoS⁻ ompC-lacZ*), BW3601 (*pta⁻ ompF-lacZ*), BW3602 (*pta⁻ ompC-lacZ*), BW3305 (*hns⁻ ompF-lacZ*), BW3306 (*hns⁻ ompC-lacZ*), BW3303 (*ompR⁻ ompF-lacZ*), BW3304 (*ompR⁻ ompC-lacZ*).

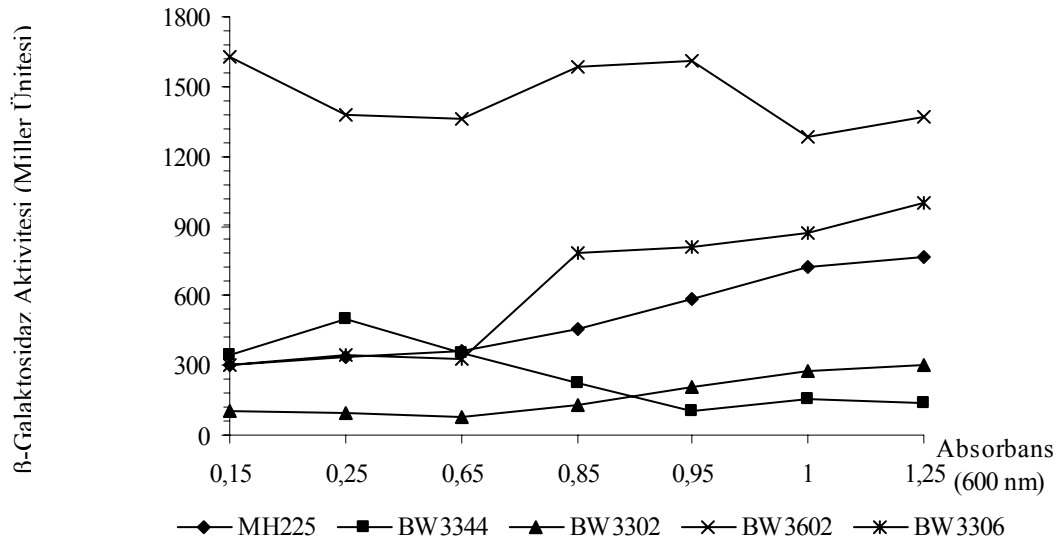
rpoS mutant *E. coli*'de ilginç sonuçlar elde edilmiştir. 0.65 absorbanza kadar yabani tipten daha düşük OmpF sentezi elde edilmiş, 0.65 absorbanstan 1.25 absorbanza ve 72. saate kadar ise yabani tipten daha yüksek oranda sentez olduğu görülmüştür (Şekil 4 ve 6). Yabani tipe göre 0.65 absorbanstan sonra 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. Pratt ve ark. (1996), çalışmalarında RpoS miktarının *E. coli*'de durgunluk fazına doğru arttığını gösterdikleri bulguya göre bu sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür (4). Ancak 0.65 absorbanstan önceki yabani tipe göre daha az sentezin olmasını açıklamak şu anki bilgilerimiz ışığında kolay olmamaktadır. RpoS'nin zengin besiyerinde mutant olmasının OmpF sentezi üzerinde pozitif etkisi olduğu görülmektedir. RpoS kontrol mekanizmaları şu ana kadar çevresel şartlardaki düzenlenmesi tam olarak bilinmeyen hala bir çok soru işaretlerine sahip kompleks bir mekanizmadır (33). *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 (4) böyle bir düzenlemenin olabileceği, porin sentezini etkileyen diğer faktörlerle olan ilişkileri veya henüz tespit edilememiş başka mekanizmaların bu sentezde rol alabileceğini ifade edebiliriz. Sonuçta bu çalışma ile RpoS nin zengin besiyerinde *E. coli*'nin OmpC promotörü ile ilişkisi olduğu ortaya konmuştur. Darcan ayrıca deniz suyunda *E. coli*'nin yaşamında da OmpC porin protein sentezi için RpoS nin çok önemli olduğunu ifade etmiştir (34).

pta mutant *E. coli*'de yabani tipe göre 0.95 absorbanza kadar bakteri yoğunluğuna kadar OmpF sentezinin oldukça düşük olduğu görülmekte, ancak 0.95 absorbanstan sonra yabani tip ile aynı oranda sentez gerçekleştiği ortaya konmuştur. Bouche ve ark. (1998) çalışmalarında AcP in RpoS düzeyini negatif olarak etkilediğini tespit etmişlerdir (35). Bu bilginin ışığında elde ettiğimiz sonucun nedeni olarak AcP'in ortamda olmaması nedeni ile RpoS'nin miktarındaki artışın yabani tip *E. coli*'ye göre OmpF sentezinin azalmasına neden olduğunu söylenebilir. 0.95 absorbanstan sonra ise yabani tip ile benzer düzeyde sentez gerçekleştiği görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen en ilginç sonuçlardan birisi de Darcan (2005) nin yapmış olduğu minimal medium ve deniz suyu çalışmalarında da ortaya koyduğu *pta* mutant *E. coli*'deki yabani tip *E. coli*'ye göre oldukça yüksek OmpC sentezinin görülmesidir (34). Bu sonuç beklenmeyen bir sonuçtur. Çünkü literatürdeki bulgulara göre AcP, OmpR regülatörünün fosforlanması sağlayarak OmpC sentezinin artışında önemli bir role sahiptir (14). AcP eksikliğinde doğal olarak OmpC sentezinin azalması beklenirken, OmpC sentezinin oldukça yüksek

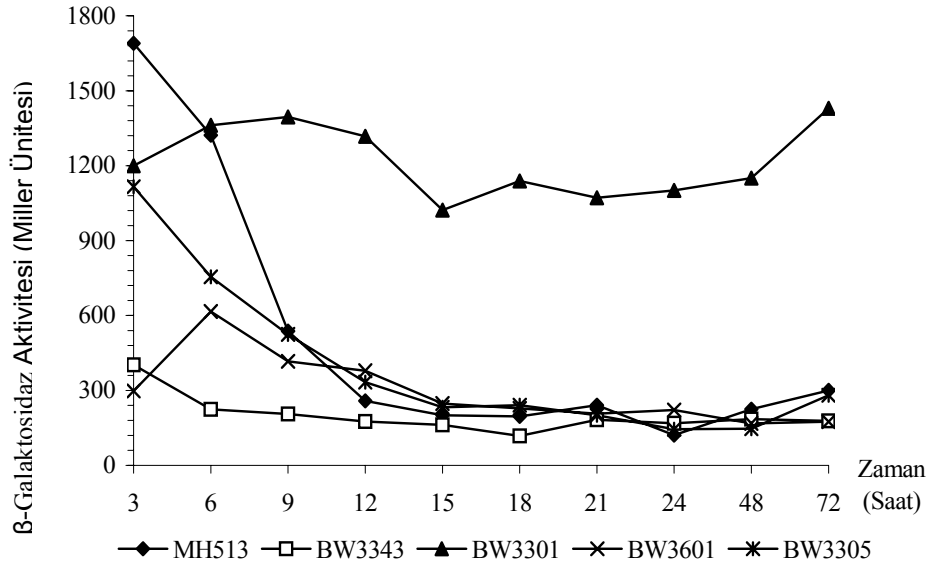
miktarda artış göstermesi beklenmeyen bir sonuçtur. Buna göre AcP'nin yada *pta* enziminin bilinmeyen faktörler ile ilişkileri olabileceği tahmin edilmektedir. OmpC sentezinin ortaya çıkması için OmpR'nin



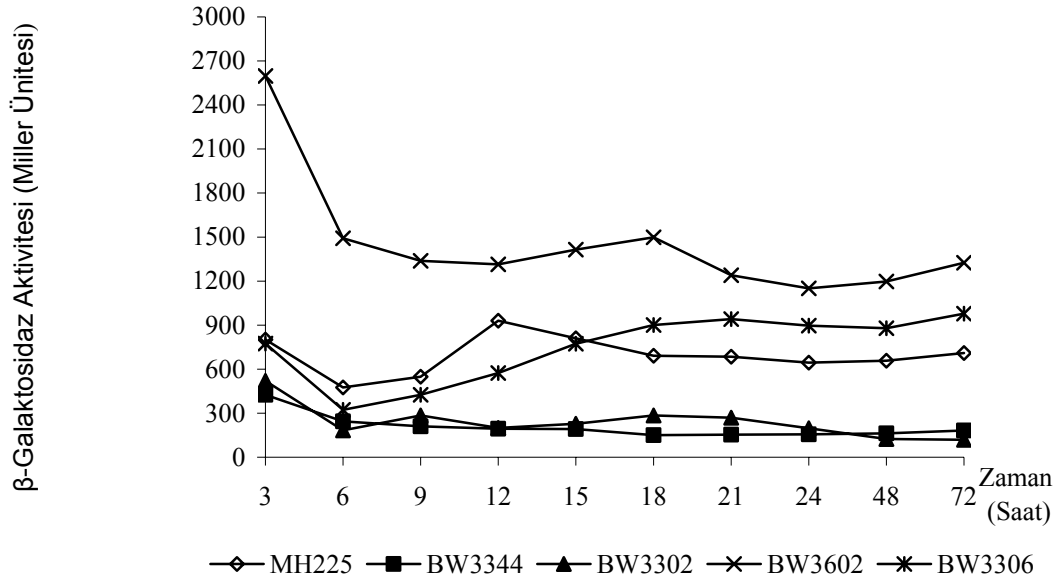
Şekil 4. Yabani tip *E. coli* ve mutantlarda absorbansa göre OmpF porin protein sentez düzeyi. MH513 (yabani tip), BW3343 (*envZ*), BW3301 (*rpoS*), BW3601 (*pta*), BW3305 (*hns*).



Şekil 5. Yabani tip *E. coli* ve mutantlarda absorbansa göre OmpC porin protein sentez düzeyi. MH225 (yabani tip), BW3344 (*envZ*), BW3302 (*rpoS*), BW3602 (*pta*), BW3306 (*hns*).



Şekil 6. Yabani tip *E. coli* ve mutantların 72 saatlik inkübasyon süresince OmpF porin protein sentez düzeyi. MH513 (yabani tip), BW3343 (*envZ*), BW3301 (*rpoS*), BW3601 (*pta*), BW3305 (*hns*).



Şekil 7. Yabani tip *E. coli* ve mutantların 72 saatlik inkübasyon süresince OmpC porin protein sentez düzeyi. MH225 (yabani tip), BW3344 (*envZ*), BW3302 (*rpoS*), BW3602 (*pta*) BW3306 (*hns*).

fosforlanmasını sağlayacak başka faktörlerin olduğunu ya da AcP eksikliğinin bilinmeyen bir mekanizma ile EnvZ kinaz aktivitesini artırarak OmpR-P miktarını yükseltebileceği, dolayısı ile OmpC sentezini sağlayabileceğini ifade edebiliriz. Ancak henüz bu sonucu tam olarak açıklayabilecek bulgular bulunmamaktadır.

72 saat inkübasyona tabii tutulan yabani tip ve mutantlarda porin sentezinde Şekil 6 ve 7 de görüldüğü gibi durgunluk ve ölüm fazına geçtikten sonra OmpF sentezinde sadece RpoS mutantının, OmpC sentezinde ise *pta* ve *hns* mutantlarında yabani tip *E. coli*'den daha yüksek olduğu görülürken, *envZ* ve *rpoS* mutantlarında ise daha az olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile zengin besiyerinde üreyen *E. coli*'nin porin protein sentezinde meydana gelen değişimler ve bu değişimlerde EnvZ, RpoS, H-NS ve AcP'nin rolü araştırılmış olup, porin proteinlerinden OmpC ve OmpF'nin sentez mekanizmasının çözümüne katkıda bulunulmaya çalışılmıştır. RpoS'nin OmpF üzerine ve AcP'nin ise OmpC üzerine henüz bilinmeyen mekanizmalar ile oldukça yüksek oranda baskılayıcı özelliklerinin olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca literatürde RpoS'nin OmpC promotörüne etkisinin olmadığı yönündeki bulguların aksine çalışmamızda mutasyonun negatif etkilediği yani sigma alt faktörünün pozitif düzenleyici bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Teşekkür

Çalışmada kullanılan *E. coli* yabani tip ve mutantları gönderen Sydney Üniversitesi Moleküler ve Mikrobiyal Bilimler Okulu Öğretim Üyesi Dr. Thomas Ferenci'ye teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- [1] Grant, W. D. and Long, P. E., "Environmental Microbiology" Thomson Litho Ltd., Glasgow/Scotland, p 215, (1981).
- [2] Overbeeke, N. and Lugtenberg, B., "Expression of outer membrane protein e of *Escherichia coli* K12 by phosphate limitation", *FEBS Letters*, 112; 229-232, (1980).
- [3] Achouak, W., Heulin, T. and Pages, J. M., "Multiple facets of bacterial porins" *FEMS Microbiology Letters*, 199; 1-7, (2001).
- [4] Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. and Silhavy, T. J., "From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*" *Mol. Microbiol.*, 20; 911-917, (1996).
- [5] Darcan, C., "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., (1999).
- [6] Darcan, C., Özkanca, R., Şahin, N., Işık, K., ve Kariptaş, E., "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, (2001).
- [7] Özkanca, R. and Flint, K. P., "The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water". *Lett. Appl. Microbiol.*, 35; 533-537, (2002).
- [8] Massé, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. "Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.*, 187; 6962-6971, (2005).
- [9] Hoch, J. A., "Two component and phosphorelay signal transduction", *Current Opinion in Microbiol.*, 3; 165-170, (2000).
- [10] Forst, S., Delgado, J., Ramakrishnan, G. and Inouye, M., "Regulation of *ompC* and *ompF* expression in *Escherichia coli* in the absence *envZ*", *J. Bacteriol.*, 170 (11); 5080-5085, (1988).
- [11] Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa T., et al., "Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH", *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (3); 943-947, (2000).
- [12] Matsubara, M. and Mizuno, T., "EnvZ independent phosphotransfer signaling pathway of the OmpR mediated osmoregulatory expression of OmpC and OmpF in *Escherichia coli*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63; 408-414, (1999).
- [13] McCleary, W. R., Stock, J. B. and Ninfa, A. J., "Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, 175 (10); 2793-2798, (1993).
- [14] Heyde, M., Laloil, P. and Portalier R., "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, (2000).
- [15] Goosen, N. and Van de Putte, P., "The regulation of transcription initiation by integration host factor", *Mol. Microbiol.*, 16; 1-7, (1995).

- [16] Suzuki, T., Ueguchi, C. and Mizuno, T., "H-NS regulates OmpF expression through micF antisense RNA in *Escherichia coli*", J. Bacteriol., 178; 3650-3653, (1996).
- [17] Vogel, J., Bartels, V., Tang, T.H., Churakov, G., Slagter-Jager, J.G., Huttenhoffer, A., and Wagner, E.G., "RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional outputs in bacteria", Nucleic Acids Res. 31; 6435-6443, (2003).
- [18] Chen, S., Zhang, A., Blyn, L.B., and Storz, G., "MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*", J. Bacteriol., 186; 6689-6697, (2004).
- [19] Rasmussen, A.A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., Franch, T., Petersen, C., and Valentin-Hansen, P., "Regulation of *ompA* mRNA stability: The role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control", Mol. Microbiol., 58; 1421-1429, (2005).
- [20] Douchin, V., Bohn, C., and Bouloc, P., "Down-regulation of porins by a small RNA bypasses the essentiality of the RIP protease RseP in *Escherichia. coli*", J. Biol. Chem., 281; 12253-12259, (2006).
- [21] Castillo-Keller, M., Vuong, P., and Misra, R., "Novel mechanism of *Escherichia coli* porin regulation", J. Bacteriol., 188; 576-586, (2006).
- [22] Liu, X. and Ferenci, T., "An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation" Microbiology, 147; 2981-2989, (2001).
- [23] Miller, H. J., "A Short Course in Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, p 456, (1992).
- [24] Bavoil, P., Nikaido, H. and Von Meyenburg, K., "Pleiotropic transport mutants of *Escherichia coli* lack porin, a major outer membrane protein", Mol. Gen. Genet., 158; 23-33, (1977).
- [25] Slauch, J. M., Garrett, S., Jackson, D. E. and Silhavy T. J., "EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in *Escherichia coli* K-12", J. Bacteriol., 170 (1); 439-441, (1988).
- [26] Russo, F. D. and Silhavy T. J., "EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes", J. Mol. Biol., 222; 567-580. (1991).
- [27] Nikaido, H. and Vaara, M., "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability", Microbiological Rev., 49 (1); 1-32, (1985).
- [28] Lan, C. Y. and Igo, M. M., "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, (1998).
- [29] Free, A. and Dorman, C. J., "Coupling of *Escherichia coli* H-NS Messenger RNA levels to DNA-synthesis by autoregulation implications for growth phase control". Mol. Microbiol., 18 (1); 101-113, (1995).
- [30] Delihias, N. and Forst, S., "MicF: An antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors", J. Mol. Biol., 313; 1-12, (2001).
- [31] Barth, M., Marchall, C., Muffler, A., Fischer, D. and Hengge-Aronis, R., "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, (1995).
- [32] Yamashino, T., C. Ueguchi, and T. Mizuno., "Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, σ_S , in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS". EMBO J., 14; 594-602, (1995).
- [33] Repoila, F., Majdalani, N. and Gottesman, S., "Small non coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli* the RpoS paradigm", Mol. Microbiol., 48 (4); 855-861, (2003).
- [34] Darcan, C., "Karadeniz suyunda pH, Osmolarite ve Açlık stresinin *Escherichia coli*'nin dış membran porin protein sentez düzeyine etkisinin araştırılması", Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 185 p., (2005).
- [35] Bouche, S., Klauck, E., Fischer, D., Lucassen, M., Jung, K. and Hengge Aronis, R., "Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator controlled process", Mol. Microbiol., 27; 787-795, (1998).