

METALLERE VE pH STRESİNE KARŞI *Escherichia coli*'de RpoS'İN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Cihan DARCAN ^{1,2}, Özge KAYGUSUZ ², Ezgi AYDIN ¹

¹ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik
² Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik

ÖZET

Escherichia coli'de alternatif sigma faktörü olarak adlandırılan *rpoS* (σ^{38}) asit şoku, açlık stresi, ozmotik stres, oksidatif stres, DNA hasarı ve durağan faza geçiş dahil olmak üzere farklı streslere karşı hücrel cevapta görevli olan genlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir. Bu çalışmada *Escherichia coli* W3110'da *rpoS* geninin metal ve pH stresi altındaki rolü araştırılmıştır. *E. coli* BW25113 suşunda mutant olan *rpoS* geni, P1kc faji ile yabani tip *E. coli* W3110'a aktarılmıştır. Yabani tip *E. coli* W3110 ve *rpoS* mutant *E. coli* W3110 suşunda yaşam deneyleri pH 5,5, 7,0 ve 8,5 fosfat tamponunda olmak üzere 3 farklı pH'da plak sayım metodu ile yapılmıştır. 6 farklı metal varlığında (Zn, Ni, Co, Cd, Ag ve Cu) metal stresindeki rolü minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve petri damlatma yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışılan tüm pH değerlerinde *rpoS* mutant suşlarda duyarlılık gözlenmiştir. Kadmiyuma karşı *rpoS* mutantının direnç gösterdiği belirlenirken, diğer metallerde herhangi bir rolü olmadığı tespit edilmiştir. *rpoS* geninin rolü, genin tamamlanması yapılarak doğrulanması sağlanmıştır. Bu sonuçlar RpoS alternatif sigma faktörünün kadmiyum metali ile ilişkili genlerin kontrolünde ve pH stresi ile ilişkili genlerde rolü olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, *rpoS*, Metal stresi, Kadmiyum

INVESTIGATION OF THE ROLE OF RpoS IN *Escherichia coli* AGAINST METALS AND pH STRESSES

ABSTRACT

RpoS (σ^{38}), which acts as an alternative sigma factor in *Escherichia coli*, controls the expression of genes responsible for cellular responses to different stresses including acidity, starvation, osmotic, oxidative stress, DNA damage, and stationary phase transition. In this study, the role of the *rpoS* gene in *E. coli* W3110 under metals and pH stresses was investigated. The *rpoS* gene, which is a mutant in the *E. coli* BW25113 strain, was transferred by transduction with the P1kc phage to wild-type *E. coli* W3110. Life experiments in wild-type *E. coli* W3110 and *rpoS* mutant *E. coli* W3110 strains were carried out by plate counting method at 3 different pH, in pH 5,5, 7,0 and 8,5 phosphate buffer. The role of *rpoS* in the presence of 6 different metals (Zn, Ni, Co, Cd, Ag and Cu) was also determined by minimum inhibition concentration (MIC) and drop plate method. Sensitivity in *rpoS* mutant strains was observed at all pH values studied. It was determined that the *rpoS* mutant *E. coli* against cadmium metal showed resistance, but there was no role in other metals. Verification of the role of the *rpoS* gene was achieved by genetic complementation. These results show that the RpoS alternative sigma factor plays a role in the control of genes related to cadmium metal and in the genes associated with pH stress.

Keywords: *Escherichia coli*, *rpoS*, Metal stress, Cadmium

1. GİRİŞ

Bakteriler doğal ortamlarda besin açlığı, sıcaklık, radyasyon, osmolite, hidrojen iyon konsantrasyonu ve metaller gibi etmenlere sıklıkla maruz kalırlar [1-2]. Metal ve pH stresi doğada en sık karşılaşılan streslerden ikisidir. Bu streslere karşı tekli veya operon olarak düzenlenen korunma mekanizmaları olduğu gibi kompleks ağlar şeklinde birçok genin rolü ile de korunma sağlanmaktadır [3].

Metaller organizmalarda canlılığın devam ettirilebilmesi için az miktarlarda ihtiyaç duyulsada yüksek konsantrasyonları hücrede zararlı etkilere yol açmaktadır. Maruz kaldıkları bu strese karşı hücrelerin geliştirdiği çeşitli savunma mekanizmalarının temelinde metalin hücre içine alınmasının engellenmesi, hücre dışına atılmasının artırılması ya da çeşitli yollarla detoksifiye edilmesi bulunmaktadır [4].

Gram negatif bakterilerde metaller dış membrandan ve sitoplazmik membrandan içeriye taşınır. Metallerin dış zar üzerinden taşınması muhtemelen porin proteinleri veya demir siderofor kompleksleri ile gerçekleşmektedir. *E. coli*'nin ana porinleri OmpC, OmpF ve PhoE'dir [5-6]. Gram negatif bakterilerde OmpC, OmpF ve bu porinlerin diğer benzerlerinin, metal katyonlarını periplazmaya taşımada sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada OmpC silinmiş *E. coli* mutant suşunda bakır duyarlılığının ortaya çıktığı belirlenmiştir [7]. Bu durum, bakırın periplazmaya alınmasının kontrolünde OmpC'nin görevli olduğunun bir göstergesidir. Metallerin sitoplazmaya alınmasında görevli olan sistem, periplazmik substrat bağlama özelliğine sahip olan ABC tipi ATPaz taşıyıcılarıdır. Bu ATPaz ailesinin üyeleri, bireysel proteine bağlı alım veya atım sistemleri olarak işlev görmektedirler. Diğer bir tip ATPaz taşıyıcıları da magnezyum (Mg^{+2}), potasyum (K^{+}), çinko (Zn^{+2}) ve bakır (Cu^{+2}) taşıyan P-tipi ATPazlardır [8-9].

Metal toksisitesinden korunmada görevli sistemlerden birisi de efflux (dışa atım) pompalarıdır. Gram negatif bakterilerde, metaller sitoplazmik zardan, ilk önce periplazmaya ve daha sonra dış membrandan hücrenin dışına atılır. *E. coli*'de en iyi bilenen dışa atım sistemi bakırın uzaklaştırılmasında görevli olan CusCFBA efflux sistemidir. Bu sistem bir sensör ve regülatörden oluşmaktadır. Sensör olan CusS periplazmik bölgedeki bakırı algılayarak CusR regülatörünü aktifleştirir. Aktifleşen CusR'de CusCFBA mekanizmasını devreye sokarak hücreden fazla bakırın uzaklaştırılmasını sağlar [10]. Bakterilerde çinko homeostazi, spesifik membran taşıyıcıları ve çinkonun hücre içine taşınmasına eşlik eden proteinler aracılığıyla sağlanır [11]. Çinkonun hücrenin içine taşınmasında, iki ana taşıyıcı rol oynar. Bunlar çinkoya yüksek affiniteye sahip olan ZnuABC ve düşük affiniteye sahip olan ZupT'dir [11]. Çinkonun dışa atımında ise MdtD ve MdtABC sistemi [12], ZitB ve ZntA görev yapmaktadır [11-13]. Manganın hücre içine taşınmasında MntH, SitABC ve YfeABC [14-15] görevli iken dışa atımında MntP proteini görev yapmaktadır [16]. Nikelin hücre içine taşınmasında sitoplazmik membrana bağlı NikD ve NikE ATPazları, NikB ve NikC iç membran bileşenleri ve periplazmik bağlayıcı protein olan NikA görevlidir [17]. Kobaltın hücre içine taşınmasında magnezyum taşıyıcısı CorA, çinko taşıyıcısı ZupT proteini görev almaktadır. Kobaltın dışarı taşınmasında ise tetrasiklin taşıyıcısı olan TetL ve çinko taşınımında görevli olan Czc proteini görev yapmaktadır [18]. Kobalt ve nikel metalinin hücreden dışarı taşınmasında ise RcnA proteininin görevli olabileceği düşünülmektedir [18-20]. Kadmiyumun hücre içine taşınmasında ZinT proteini görev almaktadır. ZinT'nin kadmiyum, çinko ve nikel gibi iki değerlikli metal iyonları için genelleştirilmiş bir taşıyıcı olduğu öne sürülmüştür [21]. ZinT, hücredeki tek kadmiyum bağlayıcı protein gibi görünmektedir ve hücreyi kadmiyum toksisitesinden korumaktadır [22-23]. Kadmiyum stresinden hücreyi koruyan bir diğer mekanizmada çinko ve kobaltın dışa atım mekanizması olan Czc protein ailesidir [18]. Ayrıca zarf stres cevabını düzenleyen CpxRA iki bileşikli sisteminin bakır homeostatik genlerin düzenlenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir [24]. Hücre içerisinde periplazmik bölgede bakır stresini algılamada görevli olan CusSR sistemi gümüş toksisitesinden de korumaktadır [25].

Hücreyi metal toksisitesinden koruyan diğer bir mekanizmada metalin detoksifikasyonudur. Örneğin bakır metalinin detoksifikasyonundan çoklu bakır oksidaz enzimi olan CueO sorumludur. CueO toksik Cu(I) formunu daha az toksik Cu(II)'ye dönüştürerek periplazmik proteinlerin korunmasına da yardımcı olur. CueO homeostatik mekanizması CueR tarafından düzenlenmektedir [26-27].

Mikroorganizmaların yaşamını tehdit eden bir diğer faktörde hidrojen iyon konsantrasyonundaki (pH) değişimdir. Bakterilerin hem alkali hem de asidik pH stresinden korunmasında, ilki proton motif güç ve sekonder aktif taşımada kullanılan transportörler, ATPaz'ların çalışma şekli (F1F0 ve V1V0 ATPaz), ikincisi hidrojenaz ve amino asit dekarboksilaz gibi metabolik yollarda görev alan enzimlerin

çalıştırılması veya baskılanması ve üçüncüsü pasif destek olarak adlandırılan hücre yüzeyindeki transport proteinlerinde meydana gelen değişimler olmak üzere 3 temel mekanizmayı içeren hücrenin genetiksel, fizyolojik veya biyokimyasal olarak gösterdiği tepkiler rol oynamaktadır [28]. Bu tepkilerin hepsi pH homeostaz mekanizması olarak adlandırılır. Bu mekanizma ile *E. coli*'de, ortam pH'sı 4,5-7,9 arasında olduğunda, pH'da meydana gelen 1 birimlik fark, sitoplazma pH'sında 0,1 birimden daha az değişikliğe sebep olmaktadır [29-30].

Hücre zarının, proton ve diğer iyonları geçirgenlik özelliği düşüktür. Böylece, çevrede bulunan protonlar basitçe hücre zarı boyunca dolaşamaz ve iç pH'yı düşüremez. Sitoplazma pH'sının değişimini önemli ölçüde engelleyen ikinci faktör, hücrenin yüksek tamponlanma kapasitesidir. Bu olay sitoplazmanın protein içeriği ile sitoplazmik glutamat ve poliamin birikiminden kaynaklanmaktadır [29]. Sitoplazmanın düşük proton geçirgenliği ve hücre zarında meydana gelen proton pompası, asit direnç mekanizmasında rol oynamaktadır [31-34]. pH stresine karşı hücrenin korunmasında direkt olarak rol oynayan asit direnç mekanizmasında görev alan 5 asit direnç sistemi bulunmaktadır. Bunlar AR1, AR2, AR3, AR4 ve AR5'dir. AR1 mekanizması en az anlaşılan mekanizmadır. AR2 glutamat dekarboksilaz sistemidir ve GadA, GadB, GadC, GadE proteinlerini içerir. AR3 arjinin dekarboksilaz sistemidir ve AdiA, AdiC proteinlerini içerir. AR4 lizin dekarboksilaz sistemidir ve CadA, CadB, CadC, LysP proteinlerini içerir ve AR5 ornitin dekarboksilaz sistemidir ve SpeF, PotE proteinlerini içerir [35].

Bakteriyal hücrelerde asit tolerans yanıtı için hücrenin logaritmik fazında veya durgunluk fazında olmasına göre değişen pH bağımlı iki farklı sistem bulunmaktadır. Bunlardan biri logaritmik faz asit tolerans yanıtı, diğeri durgunluk fazı asit tolerans yanıtıdır. *S. typhimurium*'da asit stres yanıtı *rpoS* geni tarafından kodlanan alternatif sigma faktör (σ^s) ile regüle edilmektedir [36-41]. Alternatif sigma faktörü ve stres cevap regülatörü olarak RpoS, ozmotik şok [42], oksidatif stres, UV'ye maruz kalma ve durağan faz gibi birçok stres koşulunda geniş bir gen kümesinin ekspresyonunu kontrol ederek hücre adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır [42-43]. RpoS tarafından düzenlenen birçok gen oksidatif stresten korunmada sorumludur ve *rpoS* mutantları eksojen H₂O₂'e karşı daha duyarlıdır [44]. RpoS, DNA hasarına yanıt [45], adaptif mutagenез [46] ve biyofilm oluşumu [47] için de önemlidir. *E. coli*'de durağan fazda strese yanıt olarak yaklaşık 400 gen RpoS tarafından pozitif düzenlenir [48-49-50]. Ayrıca RpoS, filagellum biyosentezi dahil durağan fazda TCA döngüsü metabolizması için gerekli olan birçok genin ekspresyonunu negatif yönde düzenler [48]. Bu olumsuz düzenleme yani RNA öz polimerazın sınırlandırılması RpoS ve diğer sigma faktörleri arasındaki rekabete bağlıdır [51-52].

Bu çalışmada çeşitli metallerin varlığında ve farklı pH değerlerinde yaşam için RpoS'nin önemi araştırılmıştır. RpoS'nin farklı metallerle ilişkisinin olması beklenmektedir. Ayrıca fosfat tamponunda açlık ortamında var olan pH stresinden korunmada RpoS'nin rolü ortaya konulmuş olacaktır. Bu çalışmadan elde edilecek veriler daha sonra yapılacak metal ve pH'a karşı korunma mekanizmaları çalışmalarının ön sonuçlarını oluşturacaktır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Bakteri Suşları

Çalışmada kullanılan *E. coli* mutant suşları (JW5437 ve b2741) Japon Ulusal Genetik Merkezinde (Keio collection-Japan National Genetic Center) temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan suşlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Yurt dışından temin edilen suşlar polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulanmış ve tüm suşlar %40 gliserol (Merck) içeren Luria-Bertani (LB-Merck) broth besiyerinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

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

Suş numarası	Genotip	Kaynak
W3110	Yabancı tip	Lab stok
JW5437	BW25113 <i>rpoS::km^r</i>	Keio koleksiyon
b2741	<i>rpoS</i>	Mobil plasmid (Keio koleksiyon)
CD01	W3110 <i>rpoS::km^r</i>	W3110 × P1(JW5437)
CD02	W3110 <i>pnt3::rpoS</i>	Bu çalışmada elde edilmiştir.

2.2. *Escherichia coli* W3110 Mutantlarının Eldesi

Keio koleksiyondan elde edilen Tablo 1’de verilen *E. coli* BW25113 suşundan hedef gen bölgesi yabancı tip *E. coli* W3110’a Sato vd. [53] nin kullandığı P1kc fajı ile transdüksiyon metodu kullanılarak aktarılmış ve çalışmada kullanılan *E. coli* W3110 *rpoS::km* mutantı elde edilmiştir. Klasik transdüksiyon metodu uygulanarak elde edilen süpernatant (P1kc) +4 °C’de saklanmıştır [53]. P1kc fajını elde ettikten sonra 5 ml LB içerisine yabancı tip *E. coli* W3110 suşundan tek koloni ekim yapılmıştır. O.D₆₀₀ değeri 0,3’e gelene kadar 37 °C’de 160 rpm’de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1 ml hücre ependorfa alınıp 2 kez yıkama tamponu (final konsantrasyonu %2 glukoz çözeltisi (Merck) ve 2 mM CaCl₂ (Sigma) içeren LB ile yıkanmış ve son olarak 1 ml yıkama tamponu eklenerek yeniden süspansiyon edilmiştir. Yabancı tip *E. coli* W3110 içerisine izole edilen P1kc fajından 5 µl eklenerek oda sıcaklığında 45 dk bekletilmiştir. Daha sonra 12000 rpm’de 5 dk 4 °C’de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 0,1 ml yıkama tamponu eklenmiş ve kanamisin (Km-Sigma) içeren Davis minimal agar (DM-Sigma) üzerine hücreler aktarılmıştır. 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün üreyen bakteriler DM agardan Km’li LB agara aktararak 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Km’li LB agarda üreyen bakteriler tekrar final konsantrasyonu 25 µg/ml Km, 25 µg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galactopyranoside (Xgal-Sigma) ve 5mM İzopropil β-D-1-tiogalaktopiranosid (IPTG-Sigma) içeren LB agara ekilmiş ve 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından üreyen kolonilerden mavi renk verenler seçilmiş ve Tablo 3’de verilen primerler ile PZR doğrulaması yapılmıştır.

2.3. Transformasyon

Final konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde kanamisin antibiyotiği içeren 2 ml LB içerisine *E. coli* W3110 *rpoS::km* mutantından ekim yapılmış ve 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılarak transformasyon için ön kültür hazırlanmıştır. Ertesi gün steril 9,9 ml Hanahan’s brot (SOB medium) üzerine steril 2 M Mg⁺² dan 100 µl, final konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde kanamisin antibiyotiği ve hazırlanan ön kültürden 50 µl eklenerek O.D₆₀₀ değeri 0,3’e gelene kadar 37 °C’de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra aseptik koşullarda hücreler steril 10 adet santrifüj tüpüne aktararak 5 dk buzda soğutulmuş ve 12000 rpm’ de 5 dk 4 °C’ de santrifüj edilmiştir. 2 santrifüj tüpüne 1 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ eklenerek 10 ayrı santrifüj tüpündeki peletler 2 ayrı santrifüj tüpüne toplanmıştır. Peletler yeniden süspansiyon edilerek 10 dk buzda bekletilmiş ve tekrar 12000 rpm’de 5 dk 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak tüp başına 0,1 M soğuk CaCl₂ 200 µl eklenerek yeniden süspansiyon edilmiş ve 30 dk buzda bekletilmiştir.

1,5 ml 2 adet steril santrifüj tüpünde bulunan 200 µl kompetent hücre üzerine, 2 farklı konsantrasyonda, invivogen kiti kullanılarak izole edilen plazmidten, 10-100 ng olacak şekilde ilave edilmiş ve 45 dk buzda bekletilmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonları cam tüpe aktararak 2 dk 42 °C’de ve ardından da 2 dk buzda bekletilmiştir. Hücre süspansiyonu üzerine 0,8 ml SOC medium (20 mM magnezyum (Merck) ve %3 glikoz (Merck) ile zenginleştirilmiş SOB medium) eklenerek 37 °C’de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında transfer hücrelerinin 0,5 ml’si 1,5 ml’ lik ependorflara alınarak 5000 rpm 1 dk 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra pelet üzerine 100 µl SOC medium eklenerek yeniden süspansiyon edilmiştir. Final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin

antibiyoği içeren LB agar üzerine yayılarak 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen koloniler Tablo 2’deki reaksiyon karışımı ile Tablo 3’de ki primerler kullanılarak koloni PZR yapılarak doğrulanmıştır.

Tablo 2. Koloni PZR reaksiyon karışımı

10x ThermaPol Reaksiyon Buffer(Biolab)	1,0 µl
10 mM dNTP Mix (NEB)	0,2 µl
10 µM ileri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
10 µM geri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
2 mM Mg ⁺ 2 içeren MgCl ₂ (Biolab)	0,6 µl
0,25 U Taq DNA Polimeraz (Biolab)	0,05 µl
dH ₂ O	6,15 µl
Bakteri Süspansiyonu	1 µl

Tablo 3. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Evrensel K1 geri primeri	5’ CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3’
W3310:: <i>rpoS</i> ileri primeri	5’ GATGAGAACGGAGTTGAGGT 3’
W3310:: <i>rpoS</i> geri primeri	5’ TGGCCTTTCTGACAGATGCT 3’
pnt3:: <i>rpoS</i> ileri primeri (SP6)	5’ ATTTAGGTGACACTATAG 3’
pnt3:: <i>rpoS</i> geri primeri (21M13)	5’ CAGGAAACAGCTATGACC 3’

2.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Metallerin MİK değerlerinin belirlenmesi için tek bir bakteri kolonisi 5 ml Nutrient Broth (NB)(Sigma) besiyerinde 37 °C’de 18 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bakterilerin absorbansı OD₆₀₀ 0,1’e ayarlanmıştır. Daha sonra 60 ml NB besiyerine 400 µl 0,1 absorbansa ayarlanan bakteri kültüründen eklenmiş ve bu kültüründen 96 kuyucuklu mikro plakaya ilk kuyucuk 180 µl diğer kuyucuklar 100 µl olacak şekilde kültür eklenmiştir. 180 µl’lik kuyucuğa çalışmada yer alan metallerin 0,2 M stok solüsyonlarından 20 µl eklenerek seri sulandırma yapılmıştır. Plakalar 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek MİK değerleri belirlenmiştir [54]. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

2.5. Petri Damlatma Deneyleri

Bakteriler 15 ml NB’da 37 °C’de 160 rpm çalkalama hızında 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra OD₆₀₀ de 1,0 absorbansa ayarlanıp 1 ml bakteri kültürü santrifüj edilip 2 kez ringer (Merck) solüsyonu ile yıkanmıştır. Elde edilen bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak 900 µl Ringer zeltisi bulunan tüplere eklenerek seri sulandırmalar yapılmıştır. Daha sonra metalsiz kontrol ortamı ve MİK değerlerine göre belirlenen metal içeren Nutrient Agar besiyerine 10³ ile 10⁷ kob/ml arasındaki bakteri kltrlerinden 10 µl damlatılmış ve 37 °C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında petride meydana gelen bakteri kolonileri gözlemlenmiş ve fotoğraflanmıştır [55]. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

2.6. Büyüme Deneyleri

E. coli W3110 ve mutantlar, MİK değerine göre belirlenen metal konsantrasyonlarında NB besiyerinde 37 °C’de 160 rpm çalkalamalı inkübatörde 8 saat süreyle inkübe edilmiş ve her 2 saatte bir örnek alınarak OD₆₀₀ de absorbansları llmştir. alışmalar en az 3’er tekrarlı yapılarak büyüme grafikleri elde edilmiştir.

2.7. Yaşam Deneyleri

20 ml’lik Nutrient brot besiyerinde, 37 °C’de bir gece inkübe edilden bakterilerin spektrofotometrede yoğunluğu 1,0’ a ayarlanarak 1 ml alınmış ve 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 2 kez Ringer

çözeltisi ile yıkandıktan sonra, 1 ml Ringer'de süspansed edilmiştir. Buradan 100'er µl bakteri alınıp pH 5,5, pH 7,0 ve pH 8,5 tamponlarını içeren 50 ml'lik erlenlere ilave edilerek 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında bakteri sayımları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar log değerlere dönüştürülüp, 2 log azalmanın hangi saatte olduğunu gösteren t_{99} değeri hesaplanmıştır.

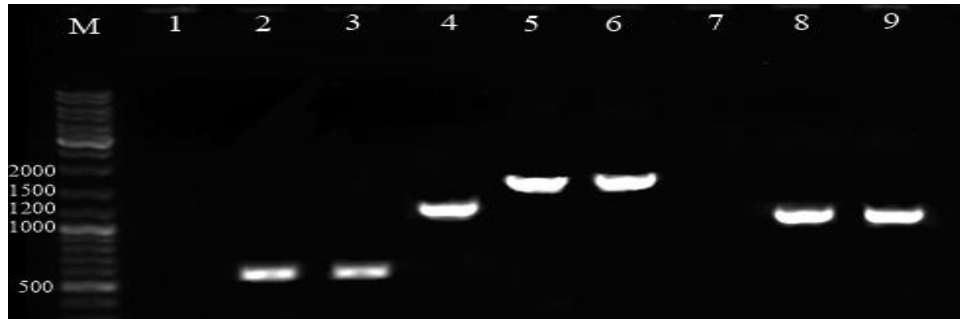
2.8. Komplementasyon Testleri

Çalıştığımız genin rolünü doğrulamak amacı ile komplementasyon testleri yapılmıştır. Bunun için *rpoS* geninin rol oynadığı belirlenen çalışmalarda *E. coli* W3110 *pnt3::rpoS* ile de çalışmalar tekrarlanmıştır. Böylece ana kromozomda mutant olan gen bölgesi plazmit üzerinde eksprese ettirilerek tamamlanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Mutantların Eldesi

Çalışmada kullanılacak olan mutantlar elde edildikten sonra doğrulama için uygulanan PZR sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. 1, 2, ve 3 numaralı hatlar f-km primeri ile yapılmış olup 1 numaralı hatta yabancı tip *E. coli* W3110, 2 numaralı hatta 566 bç büyüklüğünde pozitif kontrol *E. coli* BW25113 *rpoS::km* mutanı ve 3 numaralı hatta *E. coli* W3110 *rpoS::km* mutanı PZR sonuçları görülmektedir. 3, 4 ve 5 numaralı PZR ürünleri f-r primeri ile yapılmış olup 4 numaralı hatta 1100 bç büyüklüğünde yabancı tip *E. coli* W3110, 5 numaralı hatta 1482 bç büyüklüğünde pozitif kontrol *E. coli* BW25113 *rpoS::km* mutanı ve 6 numaralı hatta 1482 bç büyüklüğünde *E. coli* W3110 *rpoS::km* mutanı PZR sonucu görülmektedir. 7, 8 ve 9 numaralı hatlarda SP6-21M13 primeri ile yapılan PZR sonuçları yer almaktadır. 7 numaralı hatta yabancı tip *E. coli* W3110, 8 numaralı hatta 1256 bç büyüklüğünde pozitif kontrol *rpoS* genini içeren plazmid ve 9 numaralı hatta 1256 bç büyüklüğünde *pnt3::rpoS* mutanı PZR sonucu yer almaktadır.



Şekil 1. M: Marker (Thermo-Sm0331), 1: Yabancı tip W3110 negatif kontrol (f-km), 2: keio koleksiyon pozitif kontrol (f-km), 3: *rpoS::km* (f-km). 4: *E. coli* W3110 negatif kontrol (f-r), 5: *E. coli* BW25113 *rpoS::km* (f-r), 6: *E. coli* W3110 *rpoS::km* (f-r). 7: *E. coli* W3110 negatif kontrol (sp6-21M13), 8: *E. coli* BW25113 *pnt3::rpoS* (sp6-21M13), 9: *E. coli* W3110 *pnt3::rpoS* (sp6-21M13).

3.2. Minimal İnhibiyon Konsantrasyonu (MİK) Değerleri

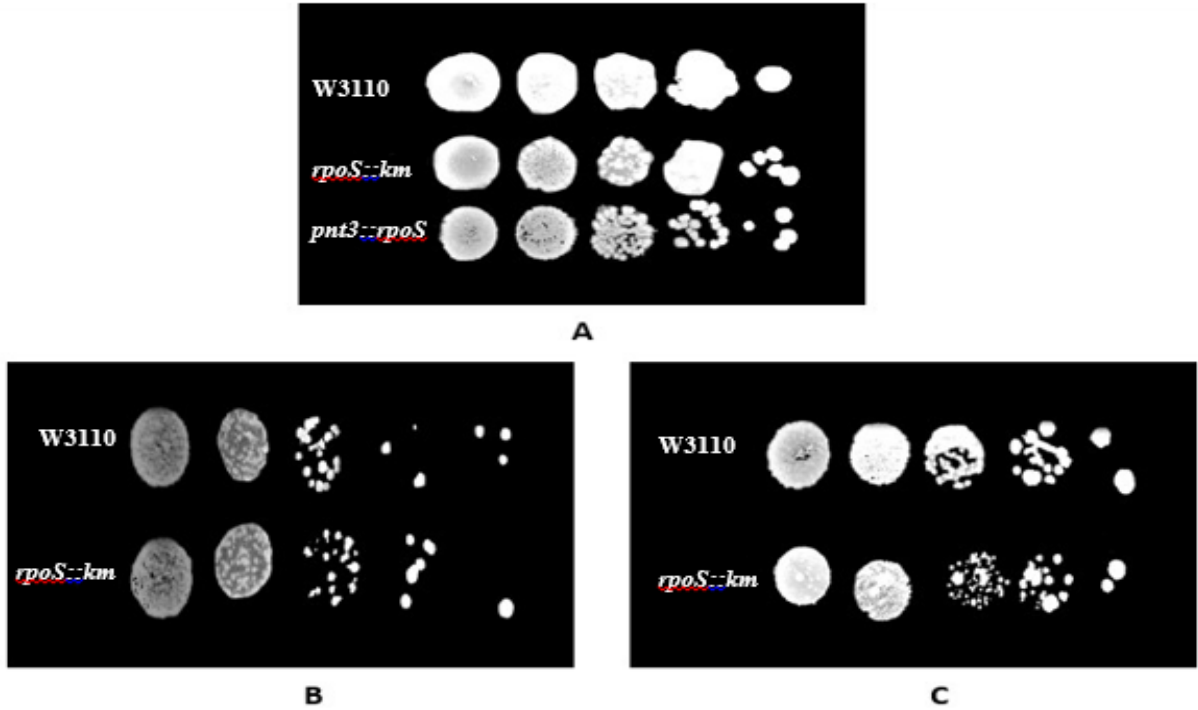
Metallerin minimal inhibisyon konsantrasyonu değerleri belirlenmiş ve Tablo 4'de verilmiştir. Elde edilen MİK sonuçlarına göre *rpoS* mutasyonunun MİK değerlerinin çalışılan 6 metal de yabancı tip *E. coli*'den farklı olmadığı görülmektedir.

Tablo 4. *E. coli* W3110 suşunda metallerin minimal inhibisyon konsantrasyonu değeri

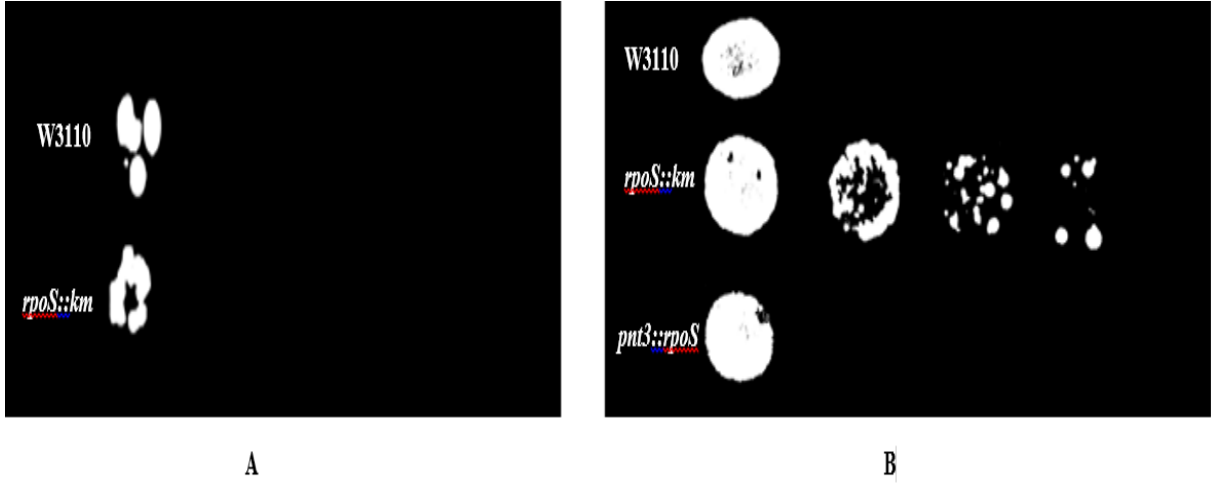
Metaller	Yabani tip <i>E. coli</i> MİK(µg/ml)	<i>E. coli rpoS::km</i> MİK(µg/ml)	<i>E. coli pnt3::rpoS</i> MİK(µg/ml)
AgNO ₃	2,48	2,48	2,48
CdNO ₃	135	135	135
CoCl ₂	223	223	223
CuSO ₄	625	625	625
NiSO ₄	493	493	493
ZnSO ₄	135	135	135

3.3. Petri Damlatma Deneyleri

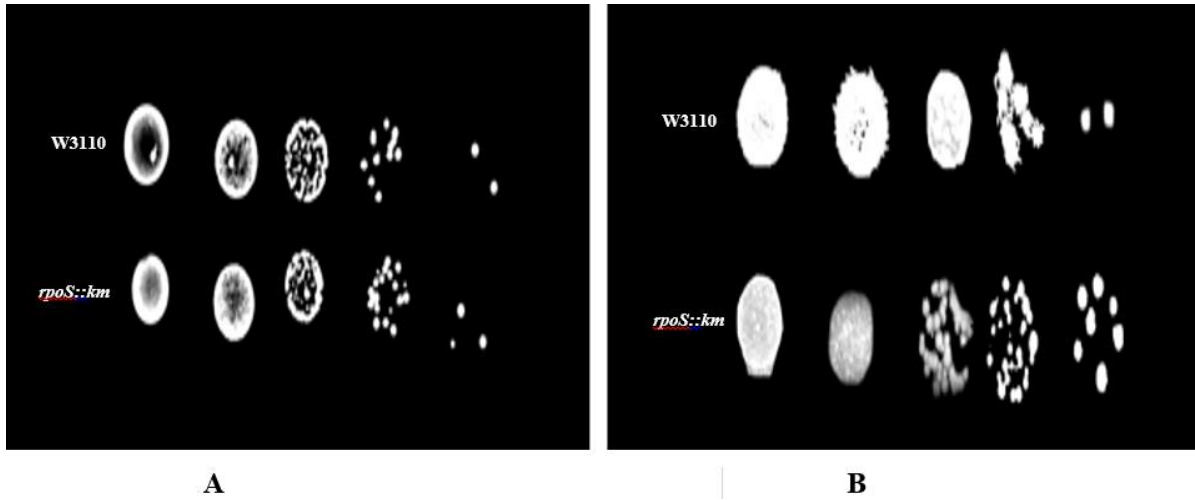
Şekil 2, 3 ve 4’de verilen bulgulara göre petri damlatma deneylerinde *rpoS* mutant suşunun metal ile ilişkisi belirlenmiştir. Çinko (Zn), kobalt (Co), gümüş (Ag), bakır (Cu) ve nikel (Ni) metali varlığında herhangi bir rolü olmadığı belirlenen RpoS’nin kadmiyum (Cd) metalinde bir rolü olduğu görülmektedir. *rpoS* geni mutant hale geldiğinde hücrenin direnç geliştirdiği görülmektedir. Plazmit ile eklenen genin indüklenmesi ile mutant genin tamamlanması sonucunda yabani tip ile aynı sonucun elde edilmesi genin rolünün doğrulanmasını sağlamaktadır. Bu açıdan Şekil 3b’de görüldüğü gibi plazmit eklenen örneklerde kadmiyum metaline karşı direncin kaybolduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2. *E. coli* W3110, *E. coli* W3110 *rpoS::km* ve *E. coli* W3110 *pnt3::rpoS*’nin petri damlatma deneyi sonuçları. **A:** Metalsiz Nutrient Agar, **B:** 0,3 mM Zn, **C:** 0,4 mM Co



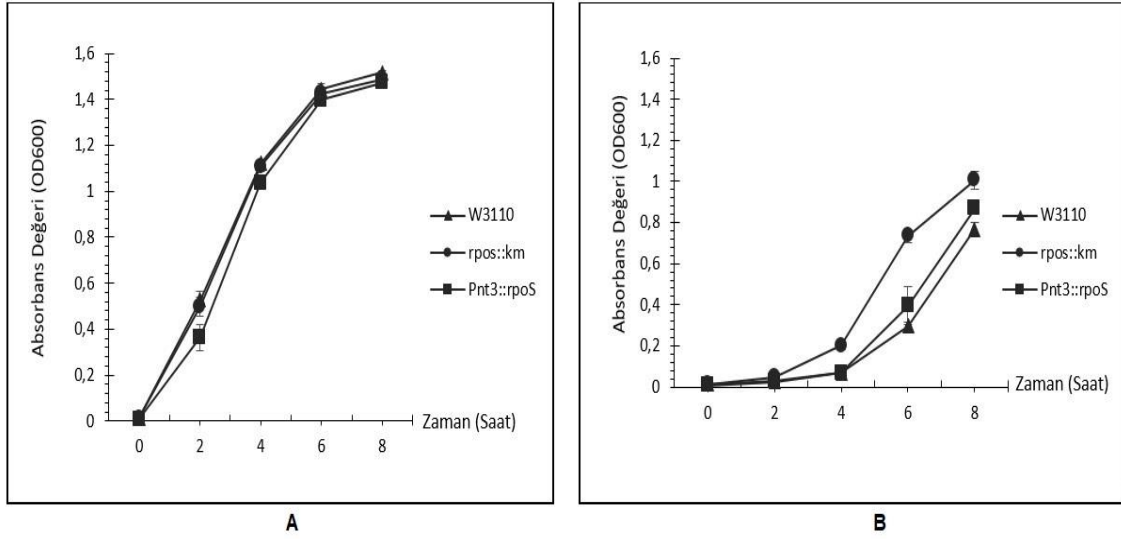
Şekil 3. *E. coli* W3110, *E. coli* W3110 *rpoS::km* ve *E. coli* W3110 *pnt3::rpoS*'nin petri damlatma deneyi sonuçları. A: 0,08 mM Ag, B: 0,08 mM Cd.



Şekil 4. *E. coli* W3110 ve *E. coli* W3110 *rpoS::km*'nin petri damlatma deneyi sonuçları. A: 0,8 mM Ni, B: 0,7 mM Cu.

3.4. Kadmiyum İçeren Besiyerinde Büyüme Grafikleri

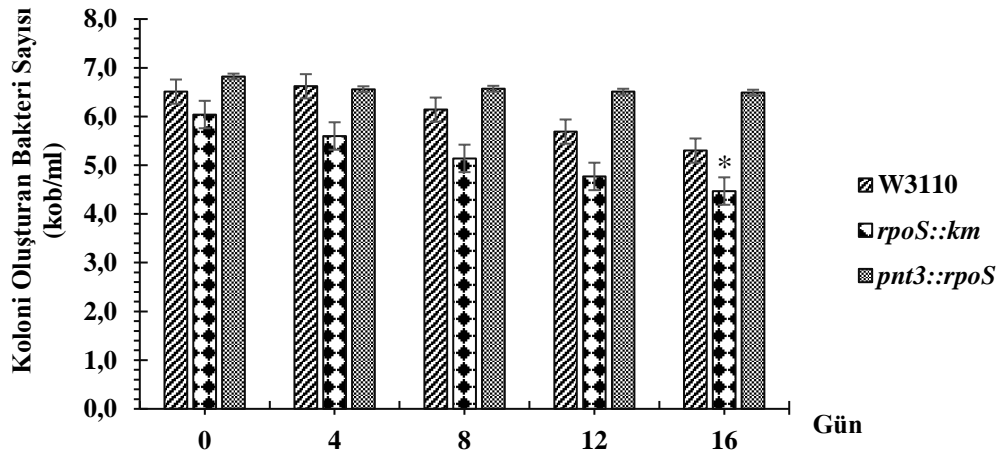
E. coli W3110 ve mutant suşun kadmiyum metali içeren besiyerinde büyümesi incelendiğinde Şekil 5A'da görüldüğü gibi kadmiyum olmayan ortamda herhangi bir farklılık görülmezken, kadmiyum ilave edilmiş besiyerinde yabancı tip *E. coli*'nin daha yavaş büyüdüğü görülmektedir. *rpoS* geni mutant hale geldiğinde hücrenin dirençli olduğu ancak plazmit ile *rpoS* geni verildiğinde ise yabancı tip benzeri büyüme gösterdiği görülmektedir.



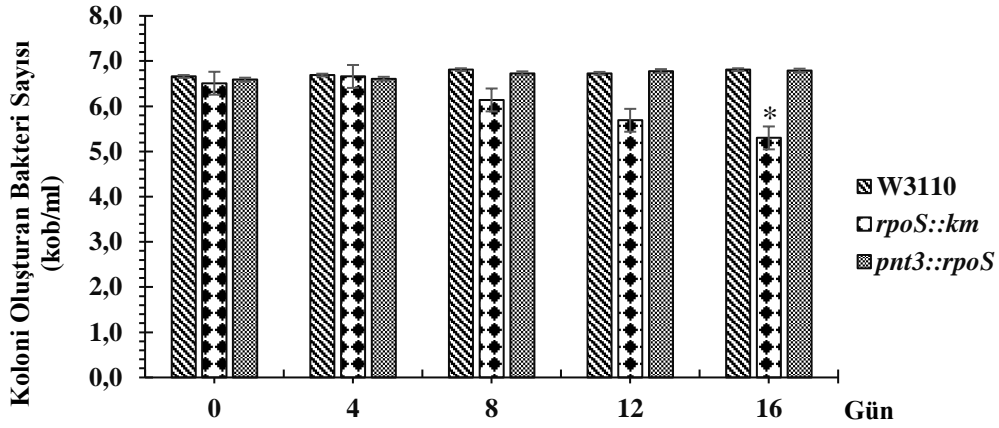
Şekil 5: *E. coli* W3110, *rpoS::km* ve *pnt3::rpoS*'nin büyüme deneyi sonuçları. A. Metalsiz besi ortamında büyüme. B. Kadmiyum metal varlığında büyüme. (*) ($p < 0.05$)

3.5. Farklı pH'larda *rpoS* nin Rolünün Belirlenmesi

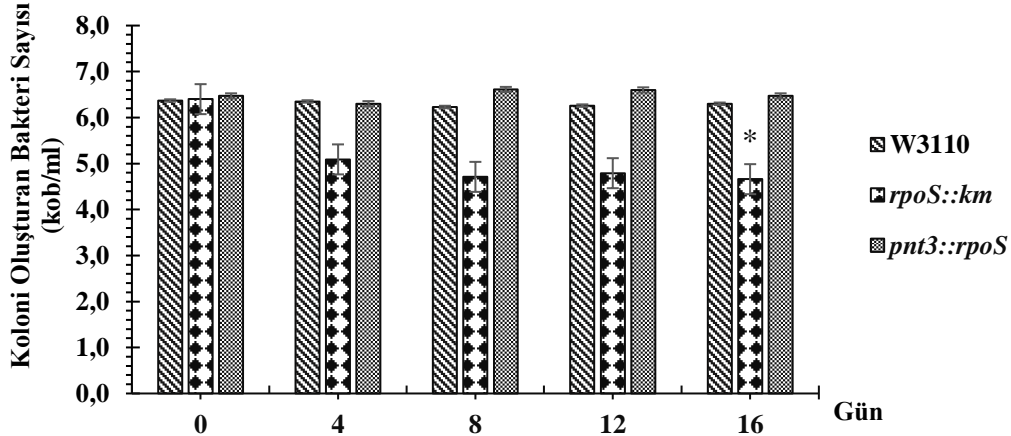
Farklı pH değerlerinde *rpoS* geninin bir rolünün olup olmadığı pH 8,5, pH 7,0 ve pH 5,5 olmak üzere 3 farklı pH'da çalışılarak belirlenmiştir. Çalışılan 3 farklı pH değerinde de yabancı tip *E. coli* W3110'a göre *rpoS::km* mutant susunun duyarlılık gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 6, 7, 8). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde pH 8,5 ve pH 5,5'te *rpoS::km* mutant susunun daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Sonuçlar *E. coli* W3110 *pnt3::rpoS* ile yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır. Asidik pH'da yabancı tip *E. coli* 2 log azalmayı pH 5,5'de 857 saatte, pH 8,5'de 50 saatte gösterirken, *rpoS* mutant *E. coli*'de 2 log azalmayı pH 5,5'de 34 saatte, pH 8,5'de 38 saatte göstermiştir. pH 7'de yabancı tip herhangi bir azalma göstermezken *rpoS* mutantta azalma görülmüş ve 2 log azalmanın 50 saatte olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6. *E. coli* W3110 ve *E. coli* W3110 *rpoS::km* mutantının pH 8,5'de yaşama. (*) ($p < 0.05$)



Şekil 7. *E. coli* W3110 ve *E. coli* W3110 *rpoS::km*^r mutantının pH 7,0'da yaşamaı. (*) (p<0.05)



Şekil 8. *E. coli* W3110 ve *E. coli* W3110 *rpoS::km*^r mutantının pH 5,5'de yaşamaı. (*) (p<0.05)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikroorganizmalar farklı ekolojik ortamlarda yaşamlarını devam ettirebilmek için ortamın değişen etmenlerinden kendilerini korumak zorundadırlar. Bazı bakteriler bu zor ve değişken çevresel koşullardan korunmak için biyofilm, spor gibi mekanizmalara sahiptirler [56-57]. Spor veya biyofilm gibi çevresel koşullara karşı dirençli yapılar oluşturamayan mikroorganizmalar, buldukları doğal ortamlarda açlık, pH, sıcaklık, ozmolarite ve toksik kimyasal maddeler gibi birçok stres faktörü ile aynı anda başa çıkmak zorundadırlar. Bu nedenle yaşam için oldukça kompleks regülatör ağlar oluşması ve bir çok mekanizmanın bir denge içinde çalışması gerektiği düşünülmektedir [3]. Bu sebeple de kompleks regülatör ağlarda görev alan genlerin ve fonksiyonlarının belirlenmesi hem bakteriyal yaşam hemde onlarla mücadele açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada 6 metalin MİK sonuçlarına göre *rpoS* mutasyonunun yabani tipe göre bir farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. MİK değerlerine göre bir fark görülmediği belirlenmişken, katı besiyerinde yapılan damlatma deneylerinde kadmiyum için farklı bir sonuç elde edilmiştir. Sıvı besiyerlerinde yapılan MİK deney sonuçları ile katı besiyerlerinde elde edilen sonuçlar arasında çalışmamızda olduğu gibi farklılıklar olabilmektedir. Literatürde de birçok çalışmada benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir [58]. Ayrıca damlatma deneylerinde çinko, bakır, kobalt, nikel ve gümüş metallerine karşı direnç veya duyarlılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre bu metallere karşı hücrenin korunması

veya hücrede meydana gelecek duyarlılıkta *rpoS*'nin herhangi bir rolü yoktur. Literatürde *rpoS*'nin *E. coli*'de metallerle ilişkisini gösteren bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır [23-59-60-61]. Çalışmamız sonucunda, zengin besi ortamında büyüme sırasında çinko, bakır, kobalt, nikel ve gümüş metalleri ile ilişkisinin olmadığı tespit edilmiş olmaktadır. Dong ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada *rpoS* mutant *E. coli*'nin logaritmik büyüme safhasında 268 genin ekspresyonunu azalttığı 24 genin ekspresyonunu arttırdığını ifade etmiştir. Bu genler arasında demir ile ilgili genlerin RpoS tarafından pozitif etkilendiği ve *rpoS* mutant hücrelerin yabani tipe göre 2 kat daha fazla intrasellüler Fe içeriğinin olduğunu tespit etmişlerdir. Demir büyüme sırasında birçok enzim için redoks elektron taşıyıcı olarak görev aldığından birçok metabolik yolda önemlidir [62]. Maconber ve ark. (2007) çalışmalarında *rpoS* elimine edildiğinde bakır varlığında oluşan oksidatif stresten etkilenmediğini tespit etmiştir [63]. Dolayısı ile çalışmamızla uyumlu olarak RpoS'nin bakır bağımlı büyüme inhibisyonunda herhangi bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Lyme hastalığı etkeni bir bakteri olan *Borrelia burgdorferi* ile yapılan bir çalışmada çinko metalinin RpoS miktarını arttırdığı ve dolayısı ile virulansı etkilediği belirlenmiştir [64].

Çalışmamızda kadmiyum metali ile elde edilen sonuçlarda bu metale karşı *rpoS* mutantında önemli bir direnç geliştiği görülmektedir. Kadmiyum hücre içine ZinT proteini ile taşınmaktadır. ZinT'nin kadmiyum, çinko ve nikel gibi iki değerlikli metal iyonlarını bağladığı ve genelleştirilmiş bir taşıyıcı olduğu öne sürülmüştür [21]. Hücredeki tek kadmiyum bağlayıcı proteinin ZinT olduğu ve hücreyi kadmiyum toksisitesinden koruyabildiği düşünülmektedir [22-23]. Ayrıca çinko ve kobaltın dışa atım mekanizması olan Czc protein ailesinde kadmiyum stresinden hücreyi koruyan diğer bir mekanizmadır [18]. Bu bilgilere göre *rpoS* geni mutant olduğunda hücrenin direnci artmış olduğuna göre ya dışarıdan alımı sağlayan transport proteinlerinin sentezini pozitif etkilediği veya dışarı atımı hızlandıran bir mekanizmayı regüle ettiği ifade edilebilir. Buna göre RpoS, kadmiyum alımında rolü olan ZinT taşıyıcısını veya CzcCBA operonunu pozitif regüle edebilir. Ayrıca dışarı atımını sağlayan ZntA, ZitB veya CzcCBA proteinlerinin baskılanmasında rol oynadığı belirtilebilir. Tüm bu mekanizmalar düşünüldüğünde *rpoS* geninin mutant oluşu ile metalin hücre içine alımında görevli olan genlerin bloke edildiği veya hücreden metalin dışarı atıldığı sistemlerin aktif bir şekilde çalıştığı düşünülmektedir.

Alternatif sigma faktörleri *E. coli*'de 7 adet bulunmakta olup RNA polimerazın promotör bölgeye bağlanmasını sağlayan ve bağlanma sonrasında polimerazdan ayrılan faktörlerdir [65-66]. Bunlar arasında RpoS çoğunlukla genel stres direncinde rol oynayan ve hücrenin durağan faza girdikten sonraki metabolizmasını kontrol eden bir protein olarak bilinmektedir. Bir diğer genel stres sigma faktörü RpoE dir. Hatta RpoE'nin RpoS'den daha fazla önemli olduğu iddia edilmektedir [67]. *rpoE* mutant suşlarda zengin besiyerinde yapılan büyüme deneylerinde çinko, kadmiyum ve bakır metale karşı hassasiyet gözlenmiştir. *rpoE* mutantlarında kadmiyum varlığında *ompC*, *ompA*, *katG* gibi genlerin ekspresyonunun azaldığını, 5 genin ekspresyonunun ise arttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde yapılan MİK deneylerinde bu metallerle karşı yabani tipe oranla bir azalış söz konusudur. Yani alternatif sigma faktör *rpoE* yokluğunda bakteri bu metallerle karşı hassasiyet kazanmıştır [7].

RpoS durgunluk fazında oldukça yüksek oranda sentezlenen ve dolayısı ile hücrenin durgunluk fazındaki metabolizmasını regüle eden bir gendir [49-68]. Ancak Dong ve ark. (2008) eksponensial fazda *rpoS*'nin stabil olmadığını [62-69] çok düşük düzeyde sentezlenmesine rağmen eksponensial fazda da birçok genin sentezini regüle ettiğini ortaya koymuşlardır. *rpoS* nin eksponensial fazda ozmotik şok [70], asit stresi ve toksinlere karşı [62-71] koruyucu rolü olduğu bilinmektedir. pH stresinden korunmada birçok direnç mekanizması bulunmaktadır. Glutamat dekarboksilaz sistemi proteinleri GadA, GadB, GadC, GadE, arjinin dekarboksilaz sistemi proteinleri AdiA, AdiC, lizin dekarboksilaz sistemi proteinleri CadA, CadB, CadC, LysP ve ornitin dekarboksilaz sistemi SpeF, PotE proteinleri ile mikroorganizmalar pH stresine karşı korunmaktadırlar [35]. Bu proteinler direkt pH stresine karşı hücrenin korunmasında rol oynamaktadır. Ayrıca indirekt olarak pH stresine karşı hücrenin korunmasında, metabolizmanın düzenlenmesinde görev alan birçok mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan bazıları dış membranda bulunan OmpC ve OmpF porin protein sentezinin değiştirilmesidir

[72-73]. Asidik pH'da *ompC* sentezi artar, *ompF* sentezi azaltılırken, alkali pH'da *ompC* sentezi azaltılıp, *ompF* sentezi arttırılmaktadır [74]. Alkali koşullar altında yüksek pH da hücrelerin aşırı sodyumdan korunmasında ve iç pH'nın dengelenmesinde sodyum hidrojen (Na^+/H^+) antiporterlarının görev aldıkları saptanmıştır. Bu antiporterlar hücre enerji endüstrisinde ve hücre içi pH homeostazında öncelikli rol oynarlar. *E. coli*'de Na^+ , H^+ veya Lityum (Li^+) iyon değişiminde NhaA ve NhaB olmak üzere iki antiporter görevlidir [75]. Bunun yanı sıra TorS/TorR iki bileşikli sistemi de alkali strese hücre savunmasında görevlidir [74].

Bu çalışmada *E. coli*'de *rpoS* geni mutant olan hücrelerde farklı pH aralıklarında hücresel yanıt araştırılmıştır. Çalışılan 3 pH değerinde de *rpoS*'nin *E. coli*'nin yaşamında önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Asit direnç sistemlerinden glukoz bağımlı oksidatif yol *S. flexneri*, *Salmonella* ve *E. coli* gibi bakterilerde aerobik gelişme koşulları altında meydana gelmekte ve *rpoS* tarafından düzenlenmektedir. Bu sistem, pH 3,0'ın üzerindeki asitten hücreleri korumaktadır. Bir diğer sistem ise glutamat bağımlı asit direnç sistemidir ve pH 3,0'ın altındaki asidik streslerden hücreyi korumaktadır [76-77].

Heyde ve Portalier (1990), *E. coli* O157:H7'nin ortam pH'sı 6,9'dan 4,3'e düştüğünde en az 16 protein tanımlamışlardır. Bunlardan 7 tanesi asit şok proteini olarak belirlenmiş ve bu proteinler *rpoS* tarafından düzenlenmektedir [78]. *rpoS* geni sadece asidik ortamda hücreleri korumakla kalmayıp alkali ortamlarda da hücreyi zarar görmekten korumaktadır [76]. *E. coli*'de Na^+ , H^+ veya Li^+ iyon değişiminde görevli olduğu bilinen NhaA ve NhaB nin düzenlenmesinde de *rpoS* görev almaktadır. NhaA alkali pH'da büyümede, Li^+ toksisinde ve yüksek tuzluluk adaptasyonunda gereklidir ve NhaA *rpoS* regülünü tarafından düzenlenmektedir [75]. *rpoS* ile asidik ve alkali ortamlarda elde edilen tüm bu sonuçlar zengin besiyerlerinde, tuz solüsyonlarında, gerçek doğal ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar ise literatürde verilen sonuçları destekler niteliktedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde *rpoS* mutant *E. coli*, yabani tip *E. coli* W3110'a göre ortam pH'sından daha fazla etkilenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, sonraki çalışmalarda *rpoS* mutant *E. coli*'de kadmiyum metale karşı meydana gelen direncin moleküler mekanizmasını anlamak için *rpoS*'nin ZinT, ZitB, ZntA ve CzcCBA genlerinin ekspresyonu ile ilişkisinin araştırılmasına ve diğer bir stres faktörü olan pH stresinde ATR ve AR (dekarboksilaz enzimlerinin sentezindeki rolü) mekanizmalarındaki rolünün araştırılmasına yol gösterici olmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Arda M. Bakterilerde Varyasyonlar. Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Prof. Dr. Mustafa Arda., Medisan Yayın Serisi 2000; 1-15.
- [2] Liu X, Wu Y, Chen Y, Xu F, Halliday N, Gao K, Chan K, Camara M. RpoS differentially affects the general stress response and biofilm formation in the endophytic *Serratia plymuthica* G3. Res Microbiol 2016; 167: 168-177.
- [3] Nagar SD, Aggarwal B, Joon S, Bhatnagar R, Bhatnagar S.A. Network Biology Approach to Decipher Stress Response in Bacteria Using *Escherichia coli* As a Model. OMICS 2016; 20: 5.
- [4] Ma Z, Jacobsen F.E, Giedroc D.P. Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis. Chem Rev 2009; 109(10): 4644–4681.
- [5] Stenberg F, Chovanec P, Maslen SL, Robinson CV, Ilag LL, von Heijne G, Daley DO. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. J Biol Chem 2005; 280: 34409– 34419.

- [6] Alcaraz A, Nestorovich EM, Aguilera-Arzo M, Aguilera VM, Bezrukov SM. Salting out the ionic selectivity of a wide channel: the asymmetry of OmpF. *Biophys J* 2004; 87: 943–957.
- [7] Egler M, Grosse C, Grass G, Nies D.H. Role of the Extracytoplasmic Function Protein Family Sigma Factor RpoE in Metal Resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005; 187: 2297–2307.
- [8] Eitinger T, Suhr J, Moore L, Smith JAC. Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *Biometals* 2005; 18: 399–405.
- [9] Rodionov DA, Hebbeln P, Gelfand MS, Eitinger T., Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J Bacteriol* 2006; 188: 317–327.
- [10] Franke S, Grass G, Rensing C, Nies D.H. Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003; 3804–3812.
- [11] Hantke K. Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr. Opin. Microbiol* 2005; 8: 196–202.
- [12] Wang D, Fierke C.A. The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *Escherichia coli*. *Metallomics* 2013; 5(4): 372-83.
- [13] Wang D, Hosteen O, Fierke C.A. ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *J Inorg Biochem* 2012; 111: 173–181.
- [14] Forbes JR, Gros P. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* 2003; 102: 1884–1892.
- [15] Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME. SitABCD is the alkaline Mn(2⁺) transporter of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 2002; 184: 3159-3166.
- [16] Waters LS, Sandoval M, Storz G. The *Escherichia coli* MntR mini regulon includes genes encoding a small protein and an efflux pump required for manganese homeostasis. *J Bacteriol* 2011; 193: 5887–5897.
- [17] De Pina K, Navarro C, McWalter L, Boxer DH, Price NC, Kelly SM, Mandrand-Berthelot MA, Wu LF. Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein Nika of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 1995; 227: 857–865.
- [18] Austin CB, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiol* 2006; 14: 4.
- [19] Rodrigue A, Effantin G, Mandrand-Berthelot MA. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005; 187: 2912–2916.
- [20] Iwig JS, Rowe JL, Chivers PT. Nickel homeostasis in *Escherichia coli* – the *rcnR*–*rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function. *Mol Microbiol* 2006; 62: 252–262.
- [21] David G, Blondeau K, Schiltz M, Penel S, Bentley AL. YodA from *Escherichia coli* Is a Metal-binding, Lipocalin-like Protein. *J Biol Chem* 2003; 278 (44): 43728–43735.
- [22] Stojnev T, Harichová J, Ferienc P, Nyström T. Function of a novel cadmium-induced YodA protein in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 2007; 55(2): 99-104.

- [23] Rensing C, Bharati M. Zinc, Cadmium, and Lead Resistance and Homeostasis. *Microbiology Monographs* 2007; (6): 321-341.
- [24] Yamamoto K., Ishihama A. Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Biosci Biotech Bioch* 2006; 70 (7): 1688-1695.
- [25] Outten FW, Huffman DL, Hale JA, O'Halloran TV. The Independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2001; 276 (33): 30670–30677.
- [26] Nies DH. Bacterial transition metal homeostasis. *Microbiology Monographs* 2007; (6): 117-142.
- [27] Kim EH, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C. Switch or Funnel: How RND-Type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol* 2011; 2381–2387.
- [28] Krulwich TA, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(5): 330–343.
- [29] Hill C, O'Driscoll B, Booth I. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *Int J Food Microbiol* 1995; 28; 245-254.
- [30] Tosun H. Bazı Patojen bakterilerin aside tolerans kazanmasının tanımlanması ve gıda sanayindeki önemi. Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı 2003.
- [31] Foster JW, Hall HK. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1991; 5129-5153.
- [32] Leyer GJ, Wang L, Johnson EA. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microb* 1995; 3752-3755.
- [33] Gahan CGM, O'Driscoll B, Hill C. Acid Adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl Environ Microb* 1996; 3128-3132.
- [34] Choi SH, Baumler DJ, Kapsar CW. Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microb* 2000; 66 (9): 3911-3916.
- [35] Peng S, Tasara T, Hummerjohann J, Stephan O. An Overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production, *J Food Protect* 2011; 74 (5): 849–864.
- [36] Arnold KW, Kaspar CW. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microb* 1995; 61; 2037-2039.
- [37] Berry ED, Barkocy-Gallagher GA, Siragusa GR. Stationary-phase acid resistance and injury of recent bovine *Escherichia coli* O157 and non-O157 Biotype 1 *Escherichia coli* isolates. *J Food Protect* 2004; 67(3); 583- 590.
- [38] Rees CED, Dodd CER, Gibson PT, Booth IR, Stewart GSAB. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *Int. J Food Microbiol* 1995; 28; 263-275.
- [39] Gahan CGM, Hill C. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 1999; 50; 93-100.

- [40] Berry ED, Cutter CN. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Appl Environ Microb* 2000; 66(4): 1493-1498.
- [41] Yuk HG, Schneider KR. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology* 2006; 23: 694-700.
- [42] Cheung KJ, Badarinarayana V, Selinger DW, Janse D, Church GM. A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*. *Genome Res* 2003; 13: 206–215.
- [43] Sammartano LJ, Tuveson RW, Davenport R., Control of sensitivity to inactivation by H₂O₂ and broad-spectrum near-UV radiation by the *Escherichia coli* katF (rpoS) locus. *J Bacteriol* 1986; 168: 13–21.
- [44] Chiang SM, Schellhorn HE. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 2012; 525: 161–169.
- [45] Khil PP, Camerini-Otero RD. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2002; 44: 89–105.
- [46] Lombardo MJ, Aponyi I, Rosenberg SM, General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Genetics* 2004; 166: 669–680.
- [47] Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 2003; 48: 253–267.
- [48] Patten CL, Kirchhof MG, Schertzberg MR, Morton RA, Schellhorn HE. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics* 2004; 272:580–591.
- [49] Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R., Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 2005; 187:1591–1603.
- [50] Lacour S, Landini P. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J Bacteriol* 2004; 186: 7186–7195.
- [51] Farewell A, Kvint K, Nystrom T. Negative regulation by rpoS a case of sigma factor competition. *Mol Microbiol* 1998; 29: 1039-1051.
- [52] Nystrom T. Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition. *Mol Microbiol* 2004; 54: 855–862.
- [53] 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 Microb* 2000; 66 (3): 943-947.
- [54] Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 2008;3(2):163-75.

- [55] Hoben HJ, Somasegaran P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44: 1246-1247.
- [56] Prabhakaran P, Ashraf MA, Aqma WS. Microbial Stress Response to Heavy Metal in the Environment. *RSC Adv* 2016; 6: 109862-109877.
- [57] Collet A, Cosette P, Beloin C, Ghigo JM, Rihouey C, Lerouge P, Junter GA, Jouenne T. Impact of *rpoS* Deletion on the Proteome of *Escherichia coli* Grown Planktonically and as Biofilm. *J Proteome Res* 2008; 7: 4659–4669.
- [58] Cao Q, Feng F, Wang H, Xu X, Chen H, Cai X, Wang X. Haemophilus parasuis CpxRA two-component system confers bacterial tolerance to environmental stresses and macrolide resistance. *Microbiol Res* 2018;177-185.
- [59] Chandrangu P, Rensing C, Helmann JD. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15(6): 338-350.
- [60] Magnani D, Solioz M, How Bacteria Handle Copper. *Microbiology Monographs* 2007;6:259-285.
- [61] Hausinger RP, Zamble DB. Microbial Physiology of Nickel and Cobalt. *Microbiology Monographs* 2007; (6): 287-320.
- [62] Dong T, Kirchhof GM, Schellhorn HE. RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12. *Mol Genet Genomics* 2008; 279: 267–277.
- [63] Macomber L, Rensing C, Imlay JA. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007; 189: 1616–1626.
- [64] Troxell B, Ye M, Yang Y, Carrasco SE, Lou Y, Yanga XF. Manganese and Zinc Regulate Virulence Determinants in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*. 2013; 81 (8): 2743-2752.
- [65] Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia Coli* RNA Polymerase. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 499–518.
- [66] Borukhov S, Nudlery E. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 93–100.
- [67] Yoon SH, Han MJ, Lee SY, Jeong KJ, Yoo JS. Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnol Bioeng* 2003; 81: 753–767.
- [68] Foster PL. Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutat Res* 2005; 569: 3-11.
- [69] Lange R, Aronis RH. The cellular concentration of the σ subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Gene Dev* 1994; 8: 1600-1612.
- [70] Aronis RH. Back to Log Phase: Sigma S as a Global Regulator in the Osmotic Control of Gene Expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1996; 21(5): 887-893.
- [71] Ferguson GP, Creighton RI, Nikolaev Y, Booth IR. Importance of RpoS and Dps in Survival of Exposure of Both Exponential- and Stationary-Phase *Escherichia coli* Cells to the Electrophile N-Ethylmaleimide. *J Bacteriol* 1998; 1030–1036.

- [72] Darcan C, Özkanca R, İdil Ö. The role of RpoS, H-NS and AcP on the pH-dependent OmpC and OmpF porin expressions of *Escherichia coli* at different Ph. Afr. J Biotechnol 2009; 8:(9) 1845-1854.
- [73] Darcan C. An investigation on the effect of pH, starvation and osmotic stress on outer membrane porin protein synthesis level of *Escherichia coli* in the black sea water. Institute of Science, Ondokuz Mayıs University 2005.
- [74] Padan E, Tzuberly T, Herz K, Kozachkov L, Rimon L, Galili A. NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na⁺/H⁺ antiporter. Review: Biochim et Biophys Acta 2004; 1658: 2 –13.
- [75] Saito H, Kobayashi H. Bacterial responses to alkaline stress. Sci Prog 2003; 86: 271-282.
- [76] Small P, Blankenhorn D, Welty D, Zinser E, Slonczewski JL. Acid and Base Resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of rpoS and Growth pH. J Bacteriol 1994; 1729-1737.
- [77] Bhagwat AA, Tan J, Sharma M, Kothary M, Low S, Tall BD, Bhagwat M. Functional Heterogeneity of RpoS in Stress Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. Appl Environ Microb 2006; 4978–4986.
- [78] Heyde M, Portalier R. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 1990; 57 (1-2): 19-26.