

Bazı Kimyasalların Etkisi Altında *Escherichia coli*'nin OmpF - OmpC Porin Protein Sentezi ve Bu Sentezde EnvZ, RpoS, H-NS, AcP'in Rolünün Belirlenmesi

Cihan DARCAN^{1,2*}, Hülya YILMAZ²

¹ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilecik, Türkiye,

² Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, Türkiye

Geliş / Received: 10/01/2018, Kabul / Accepted: 05/07/2018

Öz

Escherichia coli'nin dış membranında bulunan OmpC ve OmpF porin proteinleri, stres koşullarına karşı korunmasında önemli yer tutar. Bu çalışmada dezenfektan özellikli çeşitli kimyasal maddelerin *E. coli*'nin OmpC ve OmpF porin protein sentezini nasıl etkilediği araştırılmıştır. *E. coli*'de, formaldehit, klor, etanol, çamaşır suyu, H₂O₂ ve Sodyum Dodesil Sülfatın (SDS) belirlenen konsantrasyonları besiyerine eklenerek, *ompC* ve *ompF* genleri yerine raportör gen olarak eklenen β-galaktosidaz'ın aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak çalışılan kimyasal maddelerin *E. coli*'nin büyümesini oldukça yavaşlattığı, ancak yinede üremenin gerçekleştiği belirlenmiştir. *E. coli*'de OmpF sentezinin formaldehit, etanol ve SDS ilave edildikten 2 saat sonra oldukça azaldığı, çamaşır suyu ve klor ilavesinde biraz azaldığı ve H₂O₂ ilave edildiği zaman ise değişmediği tespit edilmiştir. OmpC sentezinde ise klor, formaldehit, H₂O₂ ilave edildiğinde %50 oranında azaldığı belirlenirken, çamaşır suyunda yaklaşık 2 kat ve SDS ilave edilen örneklerde ise 1.5 katlık bir artış belirlenmiştir. Ayrıca hem OmpC hem de OmpF porin proteininin sentezinde RpoS, Pta, EnvZ ve H-NS proteinlerinin rollerinin olduğu belirlenmiştir. Ancak moleküler mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Dezenfektan kimyasallar, *Escherichia coli*, Porin

The Role of EnvZ, RpoS, H-NS, AcP and Synthesis of OmpC-OmpF Porin Proteins of *Escherichia coli* Under Effect of Some Chemicals

Abstract

OmpC and OmpF porin proteins, located on the outer membrane of *Escherichia coli*, play an important role in protection against stress conditions. In this study, it was investigated how various chemical substances as a disinfectant affect *E. coli* OmpC and OmpF porin protein synthesis. The activity of β-galactosidase, added as a reporter gene in place of *ompC* and *ompF* genes, was measured spectrophotometrically by adding formaldehyde, chlorine, ethanol, bleach, H₂O₂ and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), used as disinfectants in *E. coli*. The results were compared with control groups. As a result, it was determined that the studied chemical substances slowed down the growth of *E. coli* at the added concentrations, but continued to multiply. It was determined that the OmpF synthesis in *E. coli* decreased considerably after 2 hours from the addition of formaldehyde, ethanol and SDS, decreased slightly during the addition of bleach and chlorine, and did not change when H₂O₂ was added. In the OmpC synthesis, when chlorine, formaldehyde, and H₂O₂ were added, it was determined to decrease by 50% compared to the untreated state, while the increase was found as a 1.5 time in the cases where SDS was added and about 2 times in the bleach. In these alterations, it has been determined that the roles of RpoS, Pta, EnvZ, and H-NS proteins on both OmpC and OmpF porin protein synthesis but have not yet been elucidated by their molecular mechanisms.

Keywords: Disinfectan chemicals, *Escherichia coli*, Porin

1. Giriş

Gram (-) bakterileri Gram (+) bakterilerden ayıran farklardan birisi dış membranın varlığı olup, dış yüzeyi lipopolisakkaritlerle kaplanmış, iç membran gibi polisakkarit ve proteinler içeren, ikinci bir fosfolipit

tabakasıdır (Chevalier vd., 2000). Sitoplazmik membrana göre daha fazla delikli olmasını sağlayan, por oluşturan proteinlerin varlığı olup, bu proteinlere porin adı verilir. Yapısal ve fonksiyonel olarak önemli görevleri olan porin proteinleri,

gerekli besinlerin seçici alımını sağlayan, çevresel değişimlere göre hücreyi koruma amaçlı olarak sentez oranı değişen yapılarıdır (Nikaido ve Vaara 1985; Schulz 2002). Porin proteinleri, ortalarında bulunan deliklerden 600 kDa'dan küçük hidrofilik bileşiklerin alınımını sağlayarak membran permeabilitesinde rolü olan ve çapları 0,6-2,3 nm arasında değişen spesifik yada spesifik olmayan geçirgenlik özelliği gösteren su dolu kanallardır (Achouak vd., 2001). Porin proteinleri 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. OmpF porin proteini 37, OmpC ise 36 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. OmpC ve OmpF proteinleri çevresel şartlara göre hücrede yaklaşık olarak 10^4 - 10^6 kopya bulunmaktadır (Koebnik vd., 2000)

Porin proteinleri öncelikle hücrenin besin alışverişinde, zararlı maddelerin hücre içine alınmasının engellenmesinde, pH stresinde, osmotik stres gibi birçok çevresel strete görevleri bulunmaktadır. Substrat spesifik olmasada OmpC ve OmpF porinleri madde transferinde önemli rol oynamaktadır. Porinlerin madde transferini nasıl gerçekleştirdikleri tam olarak ortaya konamamıştır. Kanal proteinleri olmaları nedeniyle ortalarında L3 loop olarak adlandırılan, kanalın madde transferinde önemli bir görevi olduğu ortaya konulan, kanalın ortasından daralmasını sağlayan ve porine kum saati şeklini kazandıran fonksiyonel bir yapının varlığı tespit edilmiştir (Basle vd., 2004; Sidorova vd., 2014; Song vd., 2015). Besin sınırlaması, büyüme oranının azalmasına neden olan ve bakterilerde fizyolojik-biyokimyasal düzenlemeleri içeren geniş bir adaptasyon sağlayan stres şartlarından birisidir. Porin sentezinin değişiminin besin sınırlamasındaki bu düzenlemelerin arasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Özkanca, 1993; Liu ve Ferenci 1998). Açlık stresinde porinlerin düzenlenme mekanizmaları ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen mekanizma henüz tam olarak çözülememiştir (Orruno vd.

2017). Logaritmik fazda OmpF sentezinin oldukça yüksek, OmpC sentezinin oldukça az olduğu, popülasyonun durgunluk fazına doğru geçtikçe OmpF sentezinin azaldığı OmpC sentezinin ise arttığı belirlenmiştir. Porinlerin madde transferindeki rolleri düşünüldüğünde, açlık stresinde bakterilerin besin maddelerini toplayabilmek için membran permeabilitesini porinler ile değiştirdiği ifade edilmiştir (Ferenci 1999). Ortam osmolaritesi arttığı zaman *E. coli*'nin OmpC sentezi oldukça artarken OmpF sentezi azalmaktadır. OmpC'deki artışın nedeni olarak, OmpF'ye göre daha küçük çaplı olması nedeniyle hücrenin daha az su kaybetmesini sağladığı düşünülmektedir (Sleator ve Hill 2001). EnvZ, osmosensör olarak osmolaritedeki değişimi regülatöre iletmekle görevlidir. Heyde ve Portalier (1987)'in bildirdiğine göre, *E. coli*'nin *ompF*, *ompC* ve *lamB* porin genleri nötral ve asidik pH ile de düzenlenmektedir. Asidik pH'da *E. coli*'nin OmpF, LamB porininin ve 30 kDa'luk proteinlerinin sentezinde azalma, OmpC sentezinde ise artış olduğu gözlenmiştir (Heyde ve Portalier 1987). 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 (Heyde ve Portalier 1987). Sato vd. (2000) ise çalışmalarında asidik pH şartlarında OmpC porin sentezinin EnvZ'den bağımsız başka bir mekanizma ile çalıştığını ortaya koymuşlar, ancak mekanizmanın bilinmediğini ifade etmişlerdir. Heyde vd. (2000) *E. coli*'de pH 6.0'da OmpC, pH 7.8'de ise OmpF'nin sentezlendiğini bildirmiştir. Ayrıca Darcan (2005) çalışmalarında OmpC'nin asidik pH'daki ifadesinde RpoS, H-NS, AcP'in bir rolünün olmadığını tespit etmiştir. Andersen vd. (1989) çalışmalarında porinlerin sentezinin sıcaklığa bağlı olarak *micF* RNA ile kontrol edildiğini tespit etmişlerdir. 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 (Özkanca 1993). Porinlerin önemli görevlerinden biriside Gram negatif bakterilere antibiyotik direnci sağlamalarıdır (Ghai ve Ghai 2017). 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 diffüzyonunu etkileyerek direnci sağlamaktadır (Achouak vd., 2001). Por yapısındaki düzenlemelere ilaveten, porin sentezindeki değişkenlik de antibiyotik direncinde önemli bir 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 (Low vd., 2001; Nitzan vd., 2002). *Rahnella aquatilis*'in buğday köklerine tutunmasında OmpC porininin (Achouak vd., 1998), *P. fluorescens*'in tahıl köklerine tutunmasında OmpF porin proteininin (De Mot ve Van Der Leyden, 1991) rolünde olduğu gibi çeşitli bakterilerde bitki köklerine tutunmada porinlerin rolü olduğu ortaya konmuştur.

Verilen literatür araştırmalarından görüldüğü üzere bir çok stres faktöründen etkilenen porin proteinlerinin dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin varlığında meydana gelen değişimleri üzerine ve bu değişimi kontrol eden mekanizmalar hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmada, dezenfektan özellikli kimyasalların ortama çeşitli şekillerde ilave edildiği zaman *E. coli*'de bu proteinlerin sentez düzeylerinin nasıl değiştiğini ve bu sentezin kontrolünde osmosensör olarak görev yapan EnvZ, Alternatif sigma faktörü olarak görev alan ve bir çok stres şartında rol oynayan RpoS, Histon proteini olarak tanımlanan ve regülasyonda rol oynayan H-NS ve fosfotransasetilaz enzimini kodlayan ve Acp üretiminde temel rol oynayan

fosfotransasetilaz enzimini kodlayan Pta'nın rolleri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan Bakteriyal Suşlar

Bu çalışmada kullanılan *E. coli* yabani tip ve mutant suşları Sidney Üniversitesinden temin edilmiş (T. Ferenci-Sidney Üniv., Avustralya) ve Tablo 1'de özellikleri verilmiştir. *ompF* ve *ompC* genlerine raportör gen olarak *lacZ* geni yerleştirilmiş MH513 ve MH225 suşları kullanılarak promotor aktivitesinin ölçümü hedeflenmiştir. Bu suşlar, gen ifade analizi yapılırken yabani tip olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu suşların *envZ*, *pta*, *rpoS* ve *hns* genleri nakavt edilmiş olanlarında *ompC* ve *ompF* genlerinin promotor aktivitesine bakılmıştır. %20 gliserol (Merck) içeren Nutrient Brot'da (NB-Merck) stokları hazırlanmış ve derin dondurucuda -20 °C'de saklanmıştır. Çalışmalar sırasında Nutrient Agar besiyerinde üretilmiş ve taze kültür olarak kullanılmıştır.

2.2. 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. Bu konsantrasyonun bakterileri öldürmeyecek düzeyde olmasına dikkat 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 ürünü dağ esintisinin %10'luk sulandırılmış stok solusyonundan 35 µl/ml olacak şekilde kimyasal maddeler ilave edildikten sonra inkübasyona devam edilmiştir.

2.3. β -Galaktosidaz Enzim Aktivitesi Ölçümleri

gen olarak kullanılan β -Galaktosidaz enzim aktivitesi ölçümleri Miller (1992)'ın yöntemine göre yapıldı.

Besiyerinde kimyasal maddelerin yabancı tip *E. coli* ve mutantların OmpC ve OmpF porin sentezi üzerine etkisinin tespitinde raportör

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *E. coli* suşları ve özellikleri.

Bakteri	Genotip	Kaynak
MH225	MC4100 U(<i>ompC-lacZ</i> ⁺)10-25 (yabani tip)	(Liu ve Ferenci 2001)
MH513	MC4100 <i>araD</i> +U(<i>ompF</i> ⁻ <i>-lacZ</i> ⁺)16-13 (yabani tip)	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3343	MH513 <i>envZ60::Tn10</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3345	MH225 <i>envZ60::Tn10</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3303	MH513 <i>ompR::Tn10</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3304	MH225 <i>ompR::Tn10</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3301	MH513 <i>rpoS::Tn10</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3302	MH225 <i>rpoS::Tn10</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3305	MH513 <i>hns::neo</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3306	MH225 <i>hns::neo</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3601	MH513 <i>pta::kan</i>	(Liu ve Ferenci 2001)
BW3602	MH225 <i>pta::kan</i>	(Liu ve Ferenci 2001)

3. Bulgular

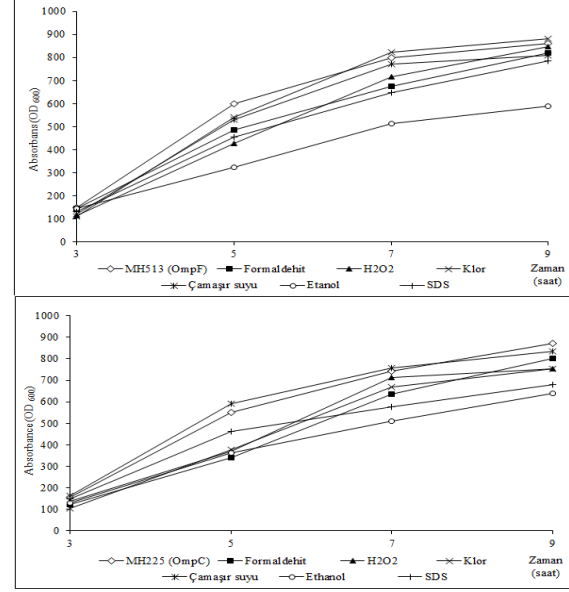
Kimyasal maddelerin besiyerindeki final konsantrasyonları, H₂O₂ (Merck) için 0.00576 M, Etanol (Merck) için 0.6 M, Formaldehit (Merck) 0.004 M, SDS (Merck) 0.012 M, ve Klor 1.96 ppm, Çamaşır suyu olarak kullanılan kimyasal madde ise marketlerde satışı yapılan bir markanın (Domestos) ürününün %10 luk sulandırılmış stok solusyonundan 35 μ l/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Raportör genin miktarını belirleyebilmek için, belirli zaman aralıklarında alınan örnekler Miller (1992) metodu uygulandıktan sonra OD₅₅₀ ve OD₄₂₀ de ölçümler yapılmıştır. Bu ölçümlerde β -Galaktosidaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen değerler promotör aktivitesindeki değişimi ifade etmektedir. Bu aktivitedeki değişimden OmpC ve OmpF porin proteinlerinin miktarındaki değişim belirlenmiştir.

3.1. Kimyasal maddelerin sıvı besiyerinde büyüme üzerine etkisinin belirlenmesi

E. coli'nin büyümesine kimyasalların etkisini gösteren bulgular Şekil 1 ve Tablo 2'de

sunulmuştur. Şekil 1 incelendiğinde ilave edilen tüm kimyasal maddelerin, madde ilave edilmeyen kontrol örnekleri (MH513 ve MH225) ile karşılaştırıldığında *E. coli*'nin hem *ompF-lacZ* hem de *ompC-lacZ* mutantının büyümesini azalttığı görülmektedir. Ancak bütün kimyasalların varlığında bakterilerin üreyebildiği de görülmektedir. *E. coli* en fazla etanol varlığından etkilenmiştir. Tablo 2 incelendiğinde, *E. coli*'nin (*ompC-lacZ*), kimyasal madde olmadan zengin besiyerinde absorbansı 158 \pm 20 den 549 \pm 32 ye artarken, H₂O₂ ilave edildikten 2 saat sonra yani 5. saatte 141 \pm 11 den 362 \pm 15 e, etanol ilave edildiğinde 132 \pm 15 den 364 \pm 22 ye, klor ilave edildiğinde 132 \pm 05 den 398 \pm 22 ye, formaldehit ilavesinde 161 \pm 10 dan 477 \pm 25 e, SDS ilave edildiğinde 148 \pm 20 den 463 \pm 26 absorbansa artış olmuştur. Dolayısı ile dezenfektan özellikli kimyasalların varlığında kontrole göre büyüme oranında azalma olduğu, 5. saatten sonra kimyasal maddeye adaptasyonunu sağlayan organizmalar kimyasal maddenin olmadığı büyüme değerlerine yaklaşmakta oldukları görülmektedir. Aynı şekilde kimyasal madde olmayan *E. coli*'nin (*ompF-lacZ*) absorbansı

148±10 dan 600±19 e artarken, etanol ilave edildikten 2 saat sonra 144±15 den 322±23 e, H₂O₂ de 112±12 den 427±20 ye, SDS'de 130±12 den 453±25 e, formaldehit'de 146±15 den 487±21 e, klor'da 110±11 den 542±31 e artış göstermiştir. Ancak başlangıçta görülen bu azalma 5. saatten sonra yükselmeye başlamıştır. Bu durumun nedeni, üremenin artarak devam etmesi ve hücre konsantrasyonundaki artışa göre azalan kimyasal madde etkisi olup, inkübasyon sonunda kontrolle aynı değerlere geldiği belirlenmiştir. Sadece Etanol ilave edilen örneklerin inkübasyon süresi sonunda dikkate değer oranda daha az üreme gösterdiği görülmektedir. Aynı şekilde *envZ*, *pta*, *rpoS*, *hns* genleri mutant hale getirilmiş olan suşların kimyasal maddeler ilave edildiği zaman büyüme değerleri Tablo 2 de verilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde hem yabancı tip (OmpC ve OmpF) kontrol grubuna göre hem de mutantların kimyasal madde ilave edilmemiş kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında kimyasal maddeler ilave edildikten sonra büyüme değerindeki artış oranının azaldığı belirlenmiştir. Bütün kimyasal maddelerin Tablo 2'deki 5. saat verileri irdelendiğinde *pta* mutant *E. coli*'nin yabancı tip *E. coli*'ye göre çok daha fazla etkilendiği (yaklaşık %50 oranında) görülmektedir.



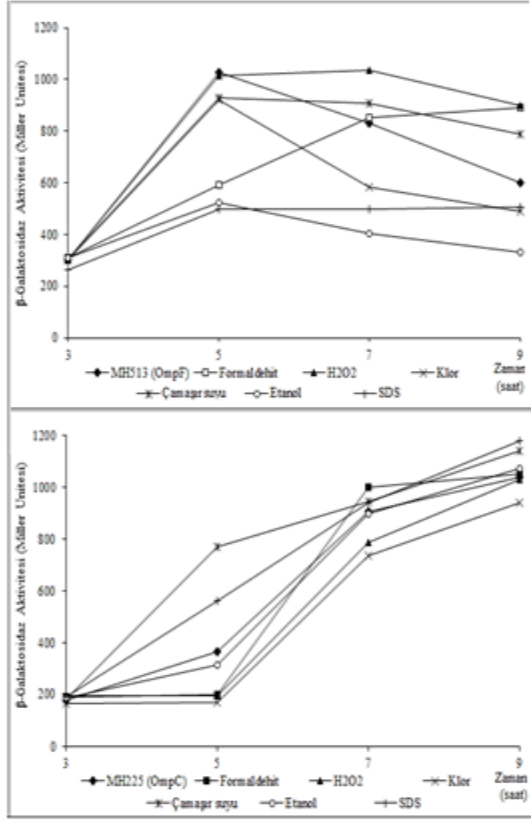
Şekil 1. Dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *E. coli* MH513 ve MH225'in büyümesi üzerine etkisi.

3.2. Kimyasal maddelerin OmpC ve OmpF porin sentezi üzerine etkisinin belirlenmesi

OmpF porin protein sentezi, herhangi bir kimyasal olmadığı zaman Şekil 2 ve Tablo 3'de görüldüğü gibi 3. saatte 302±14 üniteden 5. saatte 1029±10 üniteye (3.4 kat) bir artış gösterirken, 7. saatte 829±29 ve 9. saatte ise 600±34 üniteye azalmıştır. Bu sonuca göre logaritmik fazdan durgunluk fazına doğru OmpF sentezinin azaldığı, logaritmik fazda oldukça yüksek olan OmpF sentezinin sonraki zamanlarda azaldığı görülmektedir. OmpC sentezi ise 3. saatte 175±14 ünite iken 5. saatte 358±14 ünite, 7. saatte 889±11 ve 9. saatte 1016±45 üniteye artış göstermiştir. Burada da logaritmik fazdan durgunluk fazına geçerken OmpC sentezinin arttığı görülmektedir. *E. coli*'nin kimyasal maddelerin ilave edildiği andan itibaren kimyasalların etkisinden korunabilmek için OmpC ve OmpF porin protein sentezinde değişimler meydana getirdiği görülmektedir.

Tablo 2. Kimyasal maddelerin besiyerinde yabancı tip (OmpC ve OmpF), *envZ*, *pta*, *rpoS* ve *hns* mutant *E. coli*'nin büyümesine etkisi (OD₆₀₀).

Kontrol										
Zaman (Saat)	MH225 (OmpC)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>	MH513 (OmpF)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>
3	158±20	109±15	103±22	128±14	111±15	148±10	116±07	103±06	112±10	92±09
5	549±32	366±25	274±20	538±32	442±23	600±19	291±10	295±17	500±32	305±10
7	740±40	690±27	622±46	736±25	747±45	797±25	496±21	497±20	743±30	445±20
9	872±35	843±38	843±50	854±50	857±52	862±30	754±32	772±25	849±25	640±35
Klor										
Zaman (Saat)	MH225 (OmpC)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>	MH513 (OmpF)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>
3	132±05	82±07	93±05	123±05	108±13	110±11	101±03	100±02	120±05	101±17
5	398±22	202±10	151±25	340±12	156±07	542±31	273±13	152±12	275±15	376±26
7	645±30	378±23	384±34	633±35	570±20	824±30	579±27	346±25	613±36	605±27
9	800±36	638±37	644±55	801±25	834±33	883±41	786±39	644±25	795±34	726±37
Formaldehit										
Zaman (Saat)	MH225 (OmpC)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>	MH513 (OmpF)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>
3	161±10	121±17	90±05	139±13	122±05	146±15	109±06	100±05	131±11	107±07
5	477±25	287±17	162±14	371±33	218±18	487±21	265±18	156±12	377±16	139±10
7	697±22	486±33	421±21	713±37	437±21	673±15	420±21	279±18	657±21	311±20
9	843±25	721±21	642±25	822±39	665±26	820±25	691±24	571±25	822±36	533±24
H ₂ O ₂										
Zaman (Saat)	MH225 (OmpC)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>	MH513 (OmpF)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>
3	141±11	77±07	92±08	104±17	106±10	112±12	101±12	101±13	112±10	94±15
5	362±15	262±15	184±13	376±18	304±28	427±20	223±15	146±15	357±30	183±25
7	692±25	540±35	401±28	669±47	631±26	717±21	442±30	393±23	645±35	351±21
9	845±39	726±25	743±37	753±49	731±43	847±45	753±35	704±20	816±25	605±34
Çamaşır Suyu										
Zaman (Saat)	MH225 (OmpC)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>	MH513 (OmpF)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>
3	164±15	99±13	98±05	132±17	121±19	121±15	100±11	98±06	132±24	90±08
5	592±30	393±33	133±15	301±27	398±21	532±31	176±18	126±21	279±25	202±18
7	755±31	599±23	233±21	655±34	699±33	771±46	250±21	234±17	550±36	313±21
9	836±48	652±37	557±29	710±27	774±37	807±35	357±33	381±27	690±43	447±32
Etanol										
Zaman (Saat)	MH225 (OmpC)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>	MH513 (OmpF)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>
3	132±15	85±12	95±04	126±11	129±14	144±15	105±13	98±09	116±12	95±07
5	364±22	179±14	151±12	265±23	272±15	322±23	282±23	132±13	318±20	159±15
7	510±25	319±28	299±20	488±22	522±23	514±32	391±27	205±13	444±24	257±17
9	637±44	487±26	520±33	582±43	615±31	587±25	494±29	313±33	524±28	364±23
SDS										
Zaman (Saat)	MH225 (OmpC)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>	MH513 (OmpF)	<i>envZ</i>	<i>pta</i>	<i>rpoS</i>	<i>hns</i>
3	148±20	120±12	95±10	131±11	122±10	130±12	100±09	103±11	102±15	97±12
5	463±26	261±15	175±12	326±13	391±31	453±25	176±13	219±23	380±23	162±15
7	615±34	306±27	320±19	596±39	498±25	646±33	250±20	428±31	614±38	264±12
9	746±47	343±16	445±28	807±32	644±35	786±25	357±23	535±30	751±47	338±20



Şekil 2. Dezenfektan özellikli kimyasal maddelerin *E. coli* OmpC ve OmpF porin proteinini ifadesine etkisi.

Şekil 2 ve Tablo 3'de görüldüğü gibi Formaldehit, Etanol ve SDS kimyasalları ortama ilave edildikten sonra OmpF sentezi, ilave edilmeyen kontrole göre yaklaşık yarı yarıya azalmıştır. Etanol ilave edildiğinde 307 ± 24 üniteden 5. saatte 524 ± 43 üniteye artarken daha sonraki saatlerde sentez 404 ± 43 ve 333 ± 23 ünite olarak gerçekleşmiştir. Formaldehit ilave edildiği zaman 308 ± 25 üniteden 591 ± 44 üniteye, SDS ilave edilen örneklerde 264 ± 14 üniteden 499 ± 10 üniteye yükselmiştir. Kimyasal maddeler ilave edildikten 2 saat sonraki (5. saat) verilere göre herhangi bir kimyasal ilave edilmeyen kontrol örneğinde 3.4 kat artan OmpF sentezinin, etanol, SDS, formaldehit, çamaşır suyu, klor ve H_2O_2 kimyasalları ilave edildiğinde sırasıyla 1.70, 1.89, 1.92, 3.04, 3.08, 3.38 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 3). *envZ* mutant ile elde edilen en dikkat çekici sonucun çamaşır suyu ilave edilen durumda olduğu Tablo 3'den görülebilir. Yabani tip

kontrol grubunda kimyasal madde olmadığı durumda artış oranı 2.04 iken, çamaşır suyu ilave edildiği zaman bu oran 4.25 olmaktadır. *envZ* mutant *E. coli*'de ise çamaşır suyu ilave edilmemiş durumda 0.36 katlık bir değişim görülürken çamaşır suyu ilave edilmiş örneklerde 0.90 katlık bir oran belirlenmiştir. Dolayısı ile çamaşır suyu ilave edildiği zaman EnvZ sensöründen bağımsız OmpC sentezi artışı görülmektedir. *envZ* mutant *E. coli*'de benzer durum etanol ilave edildiği zaman OmpF porin protein sentezi için söz konusudur. Yabani tipte OmpF porin protein sentezinde 0.40 oranında sentez görülürken *envZ* mutant *E. coli*'de 0.90 oranında bir sentez belirlenmiştir. *pta* geni mutant hale getirildiğinde *E. coli*'nin OmpC ekspresyonu oldukça yüksek gerçekleşmektedir. Dolayısı ile başlangıç seviyesine göre karşılaştırıldığında en dikkat çekici sonuç formaldehit ve çamaşır suyu ilave edilen örneklerde görülmektedir. Kontrol grubunda sentezde artış görülürken bu kimyasalların ilave edilmesiyle 3. saate göre azalma olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde OmpF porin protein sentezinin de etanol, SDS ve formaldehit ilave edildiği zaman oldukça önemli azalma gösterdiği görülebilmektedir. Özellikle etanol ilavesindeki azalma oldukça dikkat çekicidir. *Hns*'nin mutant olması ile elde edilen sonuç, çamaşır suyu ilavesinde OmpC sentezinin kontrolünde önemli bir rolünü göstermektedir. Çamaşır suyu bulunan ortamda OmpC artışının gerçekleşebilmesi için *hns*'ye ihtiyaç olduğu görülmektedir. Klor *hns*'den bağımsız olarak başka bir faktör tarafından kontrol edilerek OmpF artışını sağlamaktadır. Etanol ilavesinde OmpC artışının olabilmesi için *hns*'ye ihtiyaç vardır. H_2O_2 varlığında da OmpF sentezi için *hns*'ye ihtiyaç bulunmaktadır. *rpoS* geni mutant durumunda klor ve çamaşır suyunda OmpC sentezi 2 kat artıyorken, etanol ve SDS varlığında *rpoS* mutant iken OmpF sentezinde yabani tipte görülen azalmanın görülmediği tespit edilmiştir.

Tablo 3. Kimyasal maddelerin varlığında *E. coli* OmpC ve OmpF ekspresyonu ve EnvZ, pta, RpoS, H-NS proteinlerinin rolü.

		3. saat	5. saat	Değişim Oranı		3. saat	5. saat	Değişim Oranı
Yabani Tip (OmpC)	Kontrol	175±14	358±14	2,04	Yabani Tip (OmpF)	302±14	1029±10	3,40
	Klor	163±10	167±02	1,02		300±23	921±46	3,07
	Formaldehit	187±04	195±14	1,05		308±25	591±44	1,92
	H ₂ O ₂	182±10	192±19	1,05		300±16	1015±33	3,38
	Çamaşır suyu	177±19	752±22	4,25		305±14	928±76	3,04
	Etanol	181±14	306±23	1,69		307±24	524±43	1,70
	SDS	186±14	547±38	2,94		264±14	499±10	1,89
envZ mutant OmpC düzeyi	Kontrol	115±08	41±03	0,36	envZ mutant OmpF düzeyi	109±08	43±03	0,40
	Klor	114±05	37±07	0,33		116±14	33±05	0,28
	Formaldehit	117±14	51±07	0,44		124±11	46±03	0,37
	H ₂ O ₂	118±05	74±08	0,63		126±10	62±04	0,49
	Çamaşır suyu	131±16	118±09	0,90		120±12	62±08	0,52
	Etanol	117±04	39±03	0,34		126±26	100±04	0,79
	SDS	123±12	76±05	0,62		120±12	62±08	0,52
pta mutant OmpC düzeyi	Kontrol	1251±15	1589±19	1,27	pta mutant OmpF düzeyi	282±11	440±31	1,56
	Klor	1135±52	1168±14	1,03		279±13	311±21	1,12
	Formaldehit	1021±20	747±21	0,73		266±03	201±19	0,76
	H ₂ O ₂	1152±64	1142±23	0,99		275±25	435±32	1,58
	Çamaşır suyu	1250±34	839±52	0,67		276±22	316±12	1,14
	Etanol	1046±46	1305±72	1,25		266±12	95±03	0,36
	SDS	1146±26	1455±71	1,27		271±20	196±08	0,72
rpoS mutant OmpC düzeyi	Kontrol	110±11	148±11	1,35	rpoS mutant OmpF düzeyi	902±50	928±30	1,03
	Klor	114±10	246±17	2,15		917±49	899±61	0,98
	Formaldehit	114±14	195±16	1,71		922±43	408±15	0,44
	H ₂ O ₂	91±07	153±11	1,67		972±60	956±76	0,98
	Çamaşır suyu	103±09	210±11	2,03		929±28	706±57	0,76
	Etanol	112±57	240±18	2,14		981±76	835±30	0,85
	SDS	146±11	275±13	1,89		936±65	904±29	0,97
hns mutant OmpC düzeyi	Kontrol	211±11	306±14	1,45	hns mutant OmpF düzeyi	248±25	414±10	1,67
	Klor	224±07	141±14	0,63		248±18	704±31	2,84
	Formaldehit	221±22	108±05	0,49		236±21	155±07	0,66
	H ₂ O ₂	212±12	157±08	0,74		250±12	167±17	0,67
	Çamaşır suyu	192±07	136±14	0,71		256±16	263±25	1,03
	Etanol	164±19	279±12	1,70		251±23	278±21	1,11
	SDS	208±10	508±23	2,44		236±24	254±42	1,08

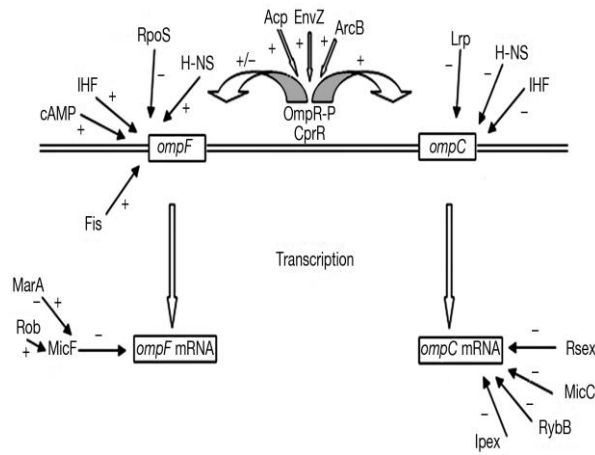
4. Sonuç ve Tartışma

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 (Kumar vd., 2015). 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 ortaya konulabilmiş değildir. Osmolarite, pH, sıcaklık, oksidatif stres, açlık, toksik bileşikler ve antibiyotikler OmpC ve OmpF sentez düzeyini değiştirdiği tespit edilen

faktörlerdir (Ghai ve Ghai 2017). Şekil 3'de görüldüğü gibi stres faktörlerine bağlı olarak bu iki porinin sentezine birçok faktör karışmaktadır. Bu çalışmada dezenfektan özellikli kimyasal maddelerden formaldehit, etanol, çamaşır suyu, klor, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve H₂O₂'in bu proteinlerin ekspresyonu üzerine etkisi çalışma konusu olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu proteinlerin sentezinde EnvZ, Acp sentezini sağlayan pta enzimi, alternatif sigma faktörü RpoS, histon benzeri protein olarak tanımlanan H-NS'nin rolü araştırılmıştır.

Nutrient brot genel 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. Özellikle SDS ve etanol *E. coli*'nin ikiye katlanma zamanını oldukça düşürmüştür. Mutantlarda bu etki daha fazla görülmektedir. Zararlı toksik kimyasal maddelerle karşılaşan mikroorganizmalar metabolik hızlarını azaltır, adaptasyon süreci geçirir ve üreme hızları yavaşlamaktadır. Bu süreç içerisinde adaptasyon sağlayabilmek amacı ile bazı genlerin sentezinin azaltıldığı ve bazı genlerin ekspresyonunun artırıldığı ifade edilebilir. Genel bir besiyerinde optimal şartlar altında *E. coli* büyütüldüğünde OmpF sentezi artarken OmpC sentezi azalır, ancak süre ilerledikçe OmpC sentezi artar, OmpF sentezi azalmaktadır (Darcan 2005). Dış şartlarda meydana gelecek optimal şartlardan uzaklaşma direkt olarak porin proteinlerinin ekspresyonunu etkilemektedir. OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentezinde en önemli etken OmpR regülatörüdür. Bu regülatör olmadığı zaman bu iki protein sentezlenemez. Regülatörü fosforlayarak porinlerin sentezini kontrol eden ise EnvZ osmosensörüdür. Yokluğunda hem OmpC hem de OmpF sentezi oldukça azalmaktadır. EnvZ sensörü, OmpR regülatörünü fosforlayarak OmpR-P haline getirerek OmpC sentezini artırırken OmpF sentezini azaltır, fosforu kopardığı zaman ise tersine OmpF sentezi artarken OmpC sentezi azalır. Bu iki bileşik fosforlama sistemi dışında OmpC ve OmpF sentezini etkileyen, Şekil 3'de belirtilen ve belirtilemeyen, bir çok faktör vardır.



Şekil 3. OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentezini kontrol eden bazı faktörler (Darcan, 2012).

E. coli'nin büyüme ortamına salisilat veya etanol ilave edildiğinde OmpF sentezinin arttığı yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Andersen vd., 1989; Rosner vd., 1991). Darcan vd. (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. Ancak *E. coli*'nin, zengin besiyeri ortamlarında üretildiğinde ortama ilave edilen etanol ile OmpF sentezinin azaldığı gösterilmiştir (Delias 1995). 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 bildirilmiştir (Delias 1995). MicF RNA *ompF* mRNA'sına bağlanarak onun translasyonunu engelleyen dolayısı ile OmpF sentez düzeyini azaltan bir görevi vardır (Aiba vd., 1987; Negrete ve Shiloach 2017). Bu sonuçlara göre OmpF sentezinin etanol nedeni ile azalmasında MicF RNA'nın rolü olduğu belirtilebilir. Ayrıca çalışmamızda OmpF sentezinde görülen azalmada RpoS, H-NS, EnvZ ve AcP'in rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Etanol ilave edildiği zaman *envZ* mutant *E. coli*'de *ompF* ekspresyonu yükselirken, *envZ*'den bağımsız bir faktörün bu sentezi arttırdığı görülmektedir. Bu faktörün ne olduğunu değerlendirebilmek için *pta* mutant *E. coli*'den elde edilen sonuçlara bakıldığında etanol varlığında OmpF ekspresyonu için AcP'in varlığının oldukça önemli olduğu ifade edilebilir. *rpoS*'nin bir rolü olmadığı belirlenirken *hns* mutant *E. coli*'de OmpF sentezinin azaldığı ve bu etmeninde bir rolü olduğu belirtilebilir. Etanol ilavesinin OmpC sentezi üzerine etkisine bakıldığı zaman yabani tip *E. coli*'de herhangi bir değişimin olmadığı belirlenmiştir. Dolayısı ile etanol ilave edilmesi *ompC* sentez düzeyini dikkate değer bir oranda değiştirmemiştir. Mutantlarla yapılan çalışmalar sonucunda da etanol ilavesinin önemli bir değişime sebep olmadığı görülmektedir. Ancak

çalışmamızda ilginç bir sonuç olarak *rpoS* mutant *E. coli*'nin OmpC sentezinde artış olduğu tespit edildi. *hns* indirekt tarzda OmpF ve OmpC sentezini düzenlemektedir. H-NS'nin OmpF üzerine pozitif etkisi düşünüldüğünde (Dorman vd 1999) bu azalmayı nasıl sağladığı henüz bilinmemektedir. Darcan vd. (1999) 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 (Darcan 2005). Porin sentez mekanizması oldukça kompleks bir kontrol mekanizmasına sahiptir (Darcan 2012-Şekil.3). Etanol ilave edildiğinde meydana gelen OmpF porin sentezindeki azalmada *pta*'nın, dolayısı ile Acp'in rolünün nasıl olduğu ileriki çalışmaların konusunu oluşturacaktır.

Formaldehit ilavesinde OmpF sentezinin %50 oranında azaldığı, aynı şekilde *rpoS*, *pta* ve *hns* mutant *E. coli*'de de %50 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. OmpC sentezinin de ortama formaldehit ilave edildiğinde azaldığı, *pta* ve *hns* mutant *E. coli*'de de aynı şekilde azaldığı ancak *rpoS* mutant *E. coli*'de OmpC artış göstermiştir. Formaldehit oldukça reaktif bir kimyasal olup, proteinler, DNA ve RNA ile etkileşmektedir ve Proteinler ile ilişkisi amino grupları ile olmaktadır (McDonnell ve Russell 1999). 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. Bu çalışmada formaldehit varlığında porin sentezinde H-NS nin rolü ortaya konulmuş, ancak varlığında negatif etkisi olduğu bilinen H-NS nin, yokluğunda OmpC sentezinin azalması ilginç bir sonuçtur.

SDS ilave edildiği zaman *E. coli*'nin OmpF sentezinde kontrole göre yarı yarıya azalırken, OmpC sentezinin artış gösterdiği görülmektedir. Aynı şekilde *pta* mutant *E. coli* ve *hns* mutant *E. coli*'de OmpF sentezi yine yarı yarıya azalmıştır. *envZ* mutant *E. coli*'de ise artış tespit edilmiştir. SDS varlığında OmpC sentezinin ise arttığı belirlenirken, aynı şekilde *pta* mutant hariç *envZ*, *rpoS* ve *hns* mutant *E. coli*'de yaklaşık %50 lik artış olmuştur. Özkanca (1993) göl suyunda yaptığı bir çalışmada SDS gibi deterjanlara maruz kalmış *E. coli*'de OmpC ve OmpF porin proteinlerinin neredeyse yok denecek kadar azaldığını belirtmiştir. Chong vd. (2015) OmpC'nin durgunluk fazında *E. coli*'nin EDTA/SDS direncinde önemli olduğunu ifade etmiştir. Sheinfeld vd. (2017) de yapmış oldukları çalışmada *ompC* ve *ompF* defektli *E. coli*'de SDS ve EDTA'ya karşı hassasiyet oluştuğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da büyüme deneylerinde hassasiyet görülmüştür. Kimyasal maddeler ilave edildiğinde maddelerin içeri alınımını azaltmak için *E. coli*'nin büyük por çaplı OmpF porin sentez düzeyini azaltmaları ve OmpC'yi arttırması gerekecektir. 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. *pta* geninin dolayısı ile Acp üretiminin OmpF sentezi için oldukça önemli olduğu görülmektedir.

Klorin temelli bileşikler klinik olarak veya geleneksel olarak hem antiseptik hemde dezenfektan olarak kullanılan en önemli mikrobiyal halojenlerdir (Erickson vd., 2017; Ofori vd., 2017). Klorin açığa çıkaran bileşikler içinde en önemlisi sodyum hipoklorit ve klorin dioksit gibi bileşiklerdir (Ofori vd., 2017; Massicotte vd., 2017). Su içerisinde sodyum hipoklorit, sodyum ve hipoklorit iyonlarını açığa çıkarır. Klor ilave edilen örneklerde OmpC sentezinin %50 oranında azaldığı, *hns* mutant *E. coli*'de de aynı şekilde azalma görülmüş, ancak *rpoS* mutant *E. coli*'de önemli bir artış tespit edilmiştir. Dolayısı ile *rpoS*'nin OmpC üzerine baskılayıcı bir etkisi olduğu ifade

edilebilir. OmpC'nin *rpoS* tarafından kontrol edilmediğine dair literatürde var olan bilgilere rağmen (Liu ve Ferenci 2001) *rpoS*'nin *ompC* ile ilişkili olduğu görülmektedir. Daha önce yaptığımız çalışmalarda da benzer ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (Darcan 2005). OmpF sentezi ise yabancı tipte hafifçe azalmış, aynı şekilde *envZ*, *pta* ve *rpoS* genlerinin mutasyonlarında da benzer bir durum görülürken *hns* mutant *E. coli*'de önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir. *hns* mutant hale getirildiğinde ise yabancı tipe daha yakın ancak mutantın kendi kontrolüne göre yaklaşık 2 kat daha yüksek sonuç görülmekte iken çamaşır suyu ilave edildiğinde *hns* mutantta OmpF sentezinin oldukça azalması dikkat çekicidir. Klor ve çamaşır suyu ilave edildiğinde *hns*'nin önemli bir rolü tespit edilmiştir. *hns* yokluğunda meydana gelen bu değişimin moleküler mekanizması ileriki çalışmaların konusunu oluşturacaktır. Yabancı tip *E. coli*'de azalma görülürken *rpoS* mutant olduğunda *ompC* sentezinin arttığı belirlenmiştir. Aynı şekilde *ompF* ekspresyonunun ise *hns* mutasyonunda arttığı görülmektedir (Darcan 1999). Yoğun bir şekilde çalışılmasına rağmen klorin serbest bırakan ajanların etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Du vd 2017). Oldukça etkin okside edici ajanlar olmaları nedeniyle proteinlerin aktivitelerini yıkar (Bloomfield 1996). pH 4 ile 7 arasında, klor ağırlıklı olarak HClO, aktif bileşen olarak bulunurken, pH 9'un üstünde, OCl₂ baskındır. Dolayısı ile kimyasal maddelerin etkinliklerinde pH oldukça önemli yer tutmaktadır (McDonnell ve Russell 1999). Klorinler DNA'da nükleotid bazlarının klorinlenmiş derivatlarının oluşumuna neden olduğu tanımlanmıştır (Shih ve Lederberg 1976). Hipoklorik asitin oksidatif fosforilasyonu ve membranla ilişkili aktiviteleri dağıttığı belirlenmiştir (Barrette vd., 1989). *Salmonella typhimurium* ile yapılan bir çalışmada OmpW ve OmpD porinini kodlayan genlerin ekspresyonunun ortama H₂O₂ ve hipoklorik asit ilave edildiği zaman azaldığı tespit edilmiştir (Morales vd., 2012; Aguayo vd. 2015). Ancak

çalışmamızda *E. coli*'nin OmpC porin protein sentezi oldukça artarken OmpF sentezinin etkilenmediği belirlenmiştir. Farklı bakteri gruplarında farklı porinlerin tepkileri farklı olabilmektedir (Martinez-Flores vd., 1999). McKenna ve Davies (1988) hipoklorik asitin bakteriyal büyümeyi inhibe ettiği belirlemiştir. Çalışmamız sonucuna göre klor ilave edilen durumlardaki *ompC* sentezi ve moleküler mekanizmasının ve aynı şekilde *hns*'nin *ompF* porin protein geni üzerine klor ve çamaşır suyu bağlantısında araştırılması gereken bir sonuçtur. Osmosensör olarak görev yapan *envZ*'nin mutant olduğu *E. coli*'de OmpC sentezi yabancı tipe göre oldukça azalmıştır. Kimyasal maddeler ilave edildiğinde en dikkat çeken sonuç çamaşır suyunda elde edilmiştir. Yabancı tip *ompC* ekspresyonu 177±19 dan 752±22 ye 4.25 kat artarken *envZ* mutantın kendi kontrolüne göre artışı 3 kata ulaşmıştır. Ayrıca SDS, H₂O₂ ve Formaldehit ilave edilen örneklerde yine OmpC ekspresyonunda artış olmuştur. Çamaşır suyu ilave edilmiş ortamda *envZ* mutant *E. coli*'de görülen OmpC artışı yabancı tipte de görülmüştür. Dolayısı ile EnvZ'den bağımsız başka bir faktörün çamaşır suyuna karşı sentezi regüle ettiği ifade edilebilir. H₂O₂ ilave edildiğinde OmpC sentezi yabancı tipte azalırken aynı oranda *hns* mutant *E. coli*'de de azalmıştır. OmpF sentezi yabancı tip, *pta* ve *rpoS* mutantta bir değişime uğramazken, *hns* mutant olduğunda oldukça azaldığı görülmektedir. *envZ* mutant olduğunda kendi kontrolüne göre hem *ompC* hem de *ompF*'nin artış gösterdiği ancak yabancı tipte sentezin gerçekleşmesinde *envZ*'nin gerekli olduğu ancak yine de bir miktar EnvZ bağımsız sentez bulunduğu tespit edilmiştir. Hidrojen peroksit virüslere, bakterilere, maya ve bakteriyal sporlara karşı dezenfeksiyon, sterilizasyon ve antisepsis için biosit olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Genelde Gram pozitif bakteriler Gram negatiflere göre daha fazla etkilenir. H₂O₂ lipitlere, proteinlere ve DNA'da dahil hücre komponentlerinin tamamına saldıran hidroksil radikali üreterek bir oxidant olarak da hareket eder (Imlay

2008). Spor oluşturmeyen veya mikobakteriyal olmayan Gram pozitif bakterilere göre Gram negatif bakteriler antiseptiklere ve dezenfektanlara karşı daha dirençlidir (Russell ve Gould 1988; Mcdonnell ve Russell 1999). Gram negatiflerdeki dış membran birçok antibakteriyal ajanın girişini sınırlayan bir bariyerdir (Mcdonnell ve Russell 1999). Bu sonuçlar Gram pozitiflerin hassasiyetlerine ve *E. coli*, *S. typhimurium* ve *P. aeruginosa* dış membran proteini mutantları ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır (Russell ve Furr 1986; El-Falaha vd., 1985). Kimyasal kirletici maddelerden olan monoklorofenol, pentaklorofenol ve kadmiyum klorit kimyasallarının da etkisi ile OmpF sentezinin azaldığı gösterilmiştir (Faber vd 1993). Mar regülunun (kimyasal maddelere direnç regülonu) porin proteinlerinin sentezini, özellikle OmpF porinini kontrol ettiği ortaya konmuştur. Mar regülununun kimyasal maddelerin hücre dışına atılması ve hücrenin korunmasında önemli rolü vardır (Aleksun ve Levy 1999). Sonuç olarak, bakteriler birçok kimyasal maddeye karşı dış membrandaki protein sentez oranlarını değiştirerek hem fizyolojik hem de genetiksel olarak direnç gösterebilmektedir. Ancak porinlerin moleküler mekanizması oldukça karmaşık olup birçok stres şartında farklıdır ve detayları henüz açığa çıkarılabilmemiş değildir.

4. Kaynaklar

Achouak, W., Pages, J.M., De Mot, R., Molle, G., Heulin T. 1998. A major outer membrane protein of *Rahnella aquatilis* functions as a porin and root adhesin. *Journal of Bacteriology*, 180, 900-913.

Achouak, W., Heulin, T., Pages, J.M. 2001. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiology Letters*, 199, 1-7.

Aguayo, D., Pacheco, N., Morales, E.H., Collao, B., Luraschi, R., Cabezas, C., Calderón, P., González-Nilo, F., Gil, F., Calderón, I.L. vd. 2015. Hydrogen peroxide and hypochlorous acid influx

through the major *S. typhimurium* porin OmpD is affected by substitution of key residues of the channel. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 568, 38-45.

- Aiba, H., Matsuyama, S.I., Mizuno, T., Mizushima, S. 1987. Function of *micF* as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the *ompF* gene in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 3007-3012.
- Aleksun, M.N., Levy, S.B. 1999. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends in Microbiology*, 7(10), 410-413.
- Andersen, J., Forst, S. A., Zhao, K., Inouye, M., Delihias, N. 1989. The function of *micF* RNA: *micF* RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 17961-17970.
- Barrette, W.C., Hannum, D.M., Wheeler, W.D., Hurst, J.K. 1989. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry*, 28, 9172-9178.
- Basle, A., Qutub, R., Mehrazin, M., Wibbenmeyer, J., Delcour, A.H. 2004. Deletions of single extracellular loops affect pH sensitivity, but not voltage dependence, of the *Escherichia coli* porin OmpF. *Protein Engineering Design & Selection*, 17, 665-672
- Bloomfield, S.F. 1996. Chlorine and iodine formulations, p. 133-158. In J. M. Ascenzi (ed.), *Handbook of disinfectants and antiseptics*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Chevalier, J., Pages J.M., Eyraud, A., Mallea, M. 2000. Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274, 496-499.
- Chong, Z., Woo, W., Chng, S. 2015. Osmoporin OmpC forms a complex with MlaA to maintain outer membrane

- lipid asymmetry in *E. coli*. *Molecular Microbiology* 98, 1133-1146.
- 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, s.71
- Darcan, C., Özkanca, R., Şahin, N., Işık, K., Karıptaş, 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.
- Darcan, C. 2005. Karadeniz suyunda pH, osmolarite ve açlık stresinin *E. coli*'nin dış membran porin protein sentez düzeyine etkisinin araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Samsun, 185 s.
- Darcan, C., 2012. Expression of OmpC and OmpF porin proteins and survival of *Escherichia coli* under photooxidative stress in Black Sea water. *Aquatic Biology*, 17(2), 97-105
- De Mot, R., Van Der Leyden, J. 1991. Purification of a root adhesive outer membrane protein of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Letters*, 81, 323-328.
- Delihis, N. 1995. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNA. *Molecular Microbiology*, 15, 411-414
- Dorman, C.J., Jay, C.D., Free, A. 1999. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trend in Microbiology*, 7(3), 124- 128.
- Du, Y., Lv, X.T., Wu, Q.Y., Zhang, D.Y., Zhou, Y.T., Peng, L., Hu, H.Y. 2017. Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review. *Journal of Environmental Science (China)*, 58, 51-63.
- El-Falaha, B.M.A., Russell, A.D., Furr, J.R. 1985. Effect of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride on the viability of wild-type and envelope mutants of *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 21-24.
- Erickson, M.C., Liao, J.Y., Webb, C.C., Habteselassie, M.Y., Cannon, J.L. 2018. Efficacy of chlorine as a disinfecting agent on produce-harvesting gloves contaminated with *E. coli* O157:H7 or *Salmonella*. *Food Control*, 86, 257-265
- Faber, F., Egli, T., Harder, W. 1993. Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS Microbiology Letters*, 111, 189-196.
- Ferenci, T. 1999. Regulation by nutrient limitation. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 208-213.
- Ghai, I., Ghai, S. 2017. Exploring bacterial outer membrane barrier to combat bad bugs. *Infect Drug Resistance*, 10, 261-273
- Heyde, M., Portalier, R. 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12 by pH. *Molecular and General Genetics*, 208, 511-517.
- Heyde, M., Laloil, P., Portalier, R. 2000. Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 182 (1), 198-202.
- Imlay, J. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review Biochemistry*, 77, 755-776
- Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37 (2), 239-253.

- Kumar, A., Bhandari, A., Krishnaswamy, S. 2015. Sequence and structural perspectives of bacterial β -stranded porins. *Protein Peptid Letters*, 22, 8-22
- Liu, X., Ferenci, T. 1998. Regulation of porin mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180 (15), 3917-3922.
- Liu, X., 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.
- Low, A.S., MacKenzie F.M., Gould, I.M., Booth, I.R. 2001. Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long term antibiotic therapy. *Molecular Microbiology*, 42 (3), 619-630.
- Martinez Flores, I., Cano, R., Bustamante, V.H., Calva, E., Puente, J.L. 1999. The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 556-562.
- Massicotte, R., Mafu, A.A., Ahmad, D., Deshaies, F., Pichette, G., Belhumeur, P. 2017. Comparison between flow cytometry and traditional culture methods for efficacy assessment of six disinfectant agents against nosocomial bacterial Species. *Frontier Microbiology*, 8, 112.
- Mcdonnell, G., Russell, A.D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 47-179.
- McKenna, S.M., Davies, K.J.A. 1988. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. *Biochemistry Journal*, 254, 685-692.
- Miller, H.J. 1992. A Short course in bacterial genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, p 456.
- Morales, E.H., Calderón, I.L., Collao, B., Gil, F., Porwollik, S., McClelland, M., Saavedra, C.P. 2012. Hypochlorous acid and hydrogen peroxide-induced negative regulation of *S. enterica serovar typhimurium ompW* by the response regulator ArcA. *BMC Microbiology*, 12, 63-74.
- Negrete, A., Shiloach, J. 2017. Improving *E. coli* growth performance by manipulating small RNA expression. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 198.
- Nikaido, H., Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 49 (1), 1-32.
- Nitzan, Y., Deutsch, B., Peshatnikov, I. 2002. Diffusion of β -Lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Current Microbiology*, 45, 446-455.
- Ofori, I., Maddila, S., Lin, J., Jonnalagadda, S.B. 2017. Chlorine dioxide oxidation of *Escherichia coli* in water – A study of the disinfection kinetics and mechanism. *Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 52(7), 598-606.
- Orruno, M., Parada, C., Kaberdin, V.R., Arana, I. 2017. Survival of *Escherichia coli* under Nutrient-Deprived Conditions: Effect on Cell Envelope Subproteome. *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*" Chapter 20. Book edited by Amidou Samie, ISBN 978-953-51-3330-8.
- Özkanca, R. 1993. Survival and physiological status of *E. coli* in lake water under different nutrient conditions, Ph D., Department of Biological Sciences, University of Warwick, England, p. 297.
- Rosner, J.L., Chai, T.J., Foulds J. 1991. Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173(18), 5631-5638.

- Russell, A.D., Gould, G.W. 1988. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 167S–195S.
- Russell, A.D., Furr, J.R. 1986. Susceptibility of some porin- and lipopolysaccharide-deficient strains of *Escherichia coli* to some antiseptics and disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 8, 47–56.
- Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa T., Kobayashi, H. 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Applied Environmental Microbiology*, 66(3), 943-947.
- Schulz, G.E. 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565, 308-317.
- Sheinfeld, R., Smith, M.S., Valdes, S. 2017. Sodium dodecyl sulfate-eethylenediaminetetraacetic acid sensitive phenotype associated with *ompC* deficient *Escherichia coli* strains is observed primarily in cells growing in stationary phase and less so in cells growing in log phase. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* 21, 123-126.
- Shih, K.L., Lederberg, J. 1976. Effects of chloramine on *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 125, 934–945.
- Sidorova, O.V., Khomenko, V.A., Portnyagina, O.Y., Likhatskaya, G.N., Vakorina, T.I., Kim, N.Y., Chistyulin, D.K., Solov'eva, T.F., Novikova, O.D. 2014. Mutant OmpF porins of *Yersinia pseudotuberculosis* with deletions of external loops: structure-functional and immunochemical properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(2), 428-432.
- Sleator, R.D., Hill, C. 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 49-71.
- Song, W., Bajaj, H., Nasrallah, C., Jiang, H., Winterhalter, M., Colletier, J.P., Xu Y. 2015. Understanding voltage gating of *Providencia stuartii* porins at atomic level. *PLoS Computational Biology*, DOI:10.1371/journal.pcbi.1004255