

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Escherichia coli REPLİKATİF DNA POLİMERAZ III α (DnaE)' YE
İNHİBİSYON ETKİLİ BİTKİ ORGAN ÖZÜTLERİNDE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN HPLC-DAD İLE AYDINLATILMASI

Emine Esra BUDAK

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. CEMAL SANDALLI

TEZ JÜRİLERİ

YRD. DOÇ. DR. EMİNE AKYÜZ TURUMTAY

YRD. DOÇ. DR. HALBAY TURUMTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2016

Her Hakkı Saklıdır


T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


***Escherichia coli* REPLİKATİF DNA POLİMERAZ III α (DnaE)' YE
İNHİBİSYON ETKİLİ BİTKİ ORGAN ÖZÜTLERİNDE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN HPLC-DAD İLE AYDINLATILMASI**


Doç. Dr. Cemal SANDALLI danışmanlığında, Emine Esra BUDAK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18/04/2016 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Doç. Dr. Cemal SANDALLI
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Halbay TURUMTAY

İmzası




Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

Bazı bitki yaprak, çiçek ve tohum özütlerinden Gram (-) replikatif DNA polimeraz inhibitörlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu adlı bu çalışma TÜBİTAK 113Z054 nolu projeden sağlanan destek yardımıyla Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında, ilgi ve desteğiyle her konuda yardımcı olan, engin bilgi ve deneyimleri ile bana öncülük eden çok kıymetli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya;

Tez çalışmalarımnda bitkilerin toplanması sürecinde sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin BAYKAL'a; antimikrobiyal çalışmalarında deney ve sonuçları değerlendirme aşamasında Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na; bitkilerin ekstraksiyon işlemleri, HPLC-DAD analizleri ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY ve sevgili arkadaşım Havva ER'e;

Eğitimimin her aşamasında birlikte olduğum, öğrenciliğim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, hiç bir konuda yardımlarını ve sevgilerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN, Yrd. Doç. Dr. Ayşegül SARAL, Ahmet MİDİLLİ ve Fatma ÇALIK olmak üzere tüm moleküler laboratuvarı ailesine;

Hayatımın her alanında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, maddi ve manevi her türlü desteğiyle yanımda olan değerli aileme teşekkürü borç bilirim.

Emine Esra BUDAK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan *Escherichia coli* replikatif DNA polimeraz III α (DnaE)' ye inhibisyon etkili bitki organ özütlerinde fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile aydınlatılması başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 18/04/2016

Emine Esra BUDAK

Uyarı: *Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

ÖZET

***Escherichia coli* REPLİKATİF DNA POLİMERAZ III α (DnaE)' YE İNHİBİSYON ETKİLİ BİTKİ ORGAN ÖZÜTLERİNDE FENOLİK BİLEŞİKLERİN HPLC-DAD İLE AYDINLATILMASI**

Emine Esra BUDAK

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Danışman: Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Bu yüksek lisans tezinde 11 bitkinin replikatif DNA polimeraz inhibisyonu, antimikrobiyal aktivite ve bazı kimyasal içerikleri çalışılmıştır. Bitkilerden bazılarının tamamı, bazılarının meyve, yaprak, çiçek kısımları kullanıldı. Replikatif bakteriyal DNA polimeraz olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) replikatif DNA polimeraz III α (DnaE) seçildi ve rekombinant üretildi. Bunun için DnaE'yi kodlayan gen PZR ile çoğaltıldı ve pET-100 TOPO vektörüne klonlandı. Ni-afinite ile saflaştırıldı. 11 bitkinin metanol ve DMSO özütleri hazırlandı. Metanol özütleri DnaE karşı inhibisyonun belirlenmesi için primer uzatma deneylerinde kullanıldı. Bu amaçla sentetik olarak dizayn edilen ve florojenik primer ihtiva eden 45/20-mer DNA kullanıldı. *Rosa canina* bitkisinin çiçek kısmının DnaE üzerinde güçlü bir şekilde inhibisyon gösterdiği belirlendi. *Sorbus caucasica* ve *Sorbus aucuparia* bitkilerin yaprak ve meyvelerinin de inhibisyon gösterdiği belirlendi. *Sorbus aucuparia* (meyve, yaprak), *Sorbus caucasica* (meyve, yaprak) ve *Rosa canina* (çiçek, meyve) DMSO ekstraktlarının gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerine antimikrobiyal testi yapıldı. *Sorbus* türlerinin ekstraktlarında gram (+) bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitesi olmadığı gözlemlendi. *Rosa canina* meyve özütlerinin gram (+) ve gram(-) olmak üzere bu iki grup bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivitesi olduğu belirlendi. İnhibisyon görülen bitkilerin metanol ekstraktları sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile sulu ortamda sırasıyla dietil eter, etil asetat, bütanol ve kalan sulu kısım olmak üzere dört ayrı fraksiyona ayrıldı ve ardından HPLC-DAD ile bu ekstraktların fenolik bileşikleri aydınlatıldı. *Rosa canina* bitkisinin çiçek ve meyve özütlerinde gallik asit ve gallik asitin türevi olan ellacik asit bulundu. *Sorbus aucuparia* ve *Sorbus caucasica* bitkilerinin yaprak ve meyve özütlerinde klorojenik asit ve rutin bileşikleri bulundu.

2016, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: *E. coli* replikatif DNA polimeraz III α (DnaE)' ün inhibisyonu, antimikrobiyal aktivite, bitki özütleri, HPLC-DAD, fenolik bileşikler.

ABSTRACT

HPLC-DAD ELUCIDATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM PLANT ORGAN EXTRACTS WITH INHIBITORY EFFECT ON *Escherichia coli* REPLIKATIVE DNA POLYMERASE III α (DnaE)

Emine Esra BUDAK

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cemal SANDALLI

Inhibition of replicative bacterial DNA polymerase, antimicrobial activity and chemical compounds of eleven plants were investigated in this Master Thesis. The whole or some parts (such as leaf, flower and fruit) of plants were used in assay. *E. coli* replicative DNA polymerase III α (DnaE2) was selected to research inhibition affects of plant compounds and it was produced as recombinant. The gene coding DnaE2 was amplified from *E. coli* K12 genom by PCR and inserted into the pET100-TOPO expression vector. It was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by Ni-affinity chromatography. Methanol and DMSO extracts of eleven plant samples were prepared. Methanol extracts were used to investigate their inhibitory affect on polymerase by primer extension assay and DMSO extracts were used to investigate the antimicrobial activity on selective microorganisms by agar diffusion methods. Fluorogenic labeled 45/20-mer synthetic DNA used in primer extension assay. According to results, a strong inhibition against to DnaE2 was determined in flower extract of *Rosa canina*. At the same way, it was determined that *Sorbus caucasica* and *Sorbus aucuparia* had the same affect on DnaE2. Antimicrobial activity of *Sorbus aucuparia* (fruit and leaf), *Sorbus caucasica* (fruit and leaf) and *Rosa canina* (flower and fruit) was investigated for Gram (-) and Gram (+) microorganisms. There was no antimicrobial affects in *Sorbus* extract against to Gram (+), but fruit extract of *Rosa canina* had antimicrobial affect against to both Gram (+) and Gram (-). The plant extracts having inhibitory affect on DnaE2 was fractioned into four sub-fractions (in order to diethyl eter, ethyl acetate, butanol and liquid part) by liquid-liquid extraction method prepared in water and then phenolic compounds in each fraction were identified by HPLC-DAD system. Gallic acid and its derivate (ellagic acid) were found in flower and fruit extracts of *Rosa canina*. Clorogenic and rutin compounds were found in leaf and fruit extract of *Sorbus aucuparia* and *Sorbus caucasica*.

2016, 78 pages

Key words: Inhibition of *E. coli* DNA polimeraz III α (DnaE), antimicrobial activity, plant extracts, HPLC-DAD, phenolic compounds.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Gram Negatif Bakteriler.....	1
1.2.1. <i>Escherichia</i> Cinsi.....	3
1.2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	4
1.3. Antibiyotik Direnci ve Önemi.....	5
1.4. Bakteriler İçin Yeni Antibakteriyal Hedef Sistemler Olarak DNA Polimerazlar.....	6
1.4.1. DNA Polimeraz Familiaları.....	6
1.4.2. C Familiası DNA Polimerazlar (PolIII α).....	8
1.4.2.1. Domain Organizasyonu.....	12
1.4.3. Yeni Antibakteriyal Hedef Sistem Olarak Replikatif DNA PolIII α	14
1.5. Yeni Antibakteriyal Moleküllerin Bitkilerde Araştırılması.....	15
1.6. Çalışmanın Amacı.....	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Besiyeri ve Vektörler.....	23
2.2. <i>Escherichia coli</i> Replikatif DNA PolimerazIII α Proteininin (<i>DnaE</i>) Rekombinant Üretilmesi.....	23
2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	23
2.2.2. <i>E. coli dnaE</i> Geninin PZR İle Çoğaltılması.....	24
2.2.3. <i>E. coli dnaE</i> Geninin TOPO100 Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	24
2.2.4. Plazmit İzolasyonu.....	25
2.2.5. <i>E. coli dnaE</i> Genini ORF Şeklinde Klonlandığının Baz Dizin Analizi İle Doğrulanması.....	25

2.2.6.	Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi	26
2.2.7.	<i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Gösterilmesi	26
2.2.8.	Rekombinant Üretilen Proteinin Analizi.....	26
2.2.9.	Rekombinant Proteinin Saflaştırılması	27
2.2.10.	Saf Proteine Diyaliz Uygulanması.....	28
2.3.	Rekombinant Enzimin Aktivitesinin Gösterilmesi	28
2.3.1.	Enzim Aktivite Deneylerinde Kullanılan Tamponlar	28
2.3.2.	Sentetik DNA Substratının Hazırlanması	29
2.3.4.	Primer Uzatma Deneyi ile Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi	30
2.3.5.	Üre-PAGE Jelinin Hazırlanması	30
2.3.6.	Üre-PAGE' de Örneklerin Yürütülmesi	30
2.4.	Metanolün <i>E. coli</i> DnaE Protein Aktivitesine Etkisinin Araştırılması	30
2.5.	Bitkilerin Çiçek ve Meyve Özütlerinde DnaE İnhibisyonunun Araştırılması ..	31
2.5.1.	Bitkilerin Toplanması	31
2.5.2.	Özütlerin Hazırlanması	31
2.5.3.	Bitki Özütlerinde İnhibisyonun Araştırılması	32
2.6.	Antimikrobiyal Aktivite	32
2.6.1.	Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu	32
2.7.	<i>Rosa canina</i> Güllerinin ve Meyvelerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD İle Aydınlatılması	33
2.8.	<i>Sorbus</i> Türlerinde Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması.....	35
3.	BULGULAR	37
3.1.	<i>E. coli dnaE</i> Geninin Çoğaltılması	37
3.2.	Protein İndüklenmesi	37
3.3.	Protein Saflaştırılması	38
3.4.	Saflaştırılan DnaE Proteinin Aktivitesinin Gösterilmesi	39
3.4.1.	Metanolün DnaE proteini Üzerine Etkisinin Gösterilmesi	40
3.5.	<i>Rosa canina</i> Bitkisinin Meyve ve Çiçek Özütlerinin DnaE Üzerine İnhibisyon Etkileri.....	40
3.6.	<i>Sorbus</i> Türlerine Ait Meyve ve Yaprak Özütlerinin DnaE Üzerine İnhibisyon Etkileri.....	41
3.7.	<i>Rosa canina</i> Güllerinin ve Meyvelerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması	42
3.8.	<i>Sorbus</i> Türlerinde Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması.....	44

3.9. Antimikrobiyal Aktivite.....	48
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	50
5. ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	65



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı (URL1).	2
Şekil 2. Domein organizasyonu açısından PolC ve DnaE'nin şematik gösterilmesi (Timinskas vd., 2013).	9
Şekil 3. C familya DNA polimeraz III α 'ün filogenetik gruplandırılması (Timinskas vd., 2013).	11
Şekil 4. Domein organizasyonu açısından farklı familya C polimerazların organizasyonu (Timinskas vd., 2013).	13
Şekil 5. DnaE1 ve PolC'nin aktif bölgelerinin karşılaştırılması (Timinskas vd., 2013).	14
Şekil 6. <i>Rosa canina</i> bitkisinin meyvesi (solda) ve çiçeği (sağda).	16
Şekil 7. <i>Thymus praecox</i> bitkisi.	16
Şekil 8. <i>Thymus serpyllum</i> bitkisi.	17
Şekil 9. <i>Malva sylvestris</i> bitkisi.	18
Şekil 10. <i>Hyoscyamus niger</i> bitkisi.	18
Şekil 11. <i>Frangula alnus</i> bitkisi.	19
Şekil 12. <i>Sorbus aucuparia</i> bitkisinin meyve ve yaprakları.	19
Şekil 13. <i>Sorbus caucasica</i> var. <i>yaltirikii</i> bitkisi.	20
Şekil 14. <i>Sorbus umbellata</i> bitkisi.	20
Şekil 15. <i>Vitis vinifera</i> (üzüm) bitkisi.	21
Şekil 16. <i>Ziziphora clinopodioides</i> bitkisi.	22
Şekil 17. Primer uzama deneylerinde kullanılan ve primerin 5'-ucundan Cy5 ile florojenik işaretli olduğu çift zincir sentetik DNA substratı.	29
Şekil 18. PZR sonrası <i>E.coli dnaE</i> geninin markır ile agaroz jelde yürütülmesi.	37
Şekil 19. <i>E. coli</i> DnaE proteinine ait pellet ve süpernatantın jelde gösterilmesi.	38
Şekil 20. <i>E.coli</i> DnaE enziminin saflaştırılması sonucunda her bir fraksiyonun ayrı ayrı gösterilmesi.	38
Şekil 21. Saflaştırılan <i>E. coli</i> DnaE proteinin markırla birlikte SDS-PAGE' de gösterilmesi.	39
Şekil 22. Saflaştırılan <i>E. coli</i> DnaE proteinin aktivitesinin Üre-PAGE'de gösterilmesi	39
Şekil 23. Metanolün <i>E. coli</i> DnaE proteinine etkisinin gösterilmesi.	40
Şekil 24. <i>Rosa canina</i> meyve (M) ve çiçek (Ç) özütlерinin <i>E. coli</i> DnaE üzerine etkisi	41

- Şekil 25.** *Sorbus* türleri özütlerinin DnaE üzerine etkisinin gösterilmesi.41
- Şekil 26.** *S. caucasica* bitkisinin meyve ve yaprak ekstraktlarının metanol, organik ve sulu faz kısımlarından HPLC-DAD analiz sonrası bileşiklerin grafik üzerinde gösterilmesi.45
- Şekil 27.** *S. aucuparia* bitkisinin meyve ve yaprak ekstraktlarının metanol, organik ve sulu faz kısımlarından HPLC-DAD analiz sonrası bileşiklerin grafik üzerinde gösterilmesi.46



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. <i>Escherichia coli</i> mikroorganizmasının sınıflandırılması.	4
Tablo 2. Tanımlanan 945 bakteri genomunda C familyası polimeraz tipleri ve kombinasyonları (Timinskas vd., 2013).	12
Tablo 3. SDS – PAGE’ de kullanılan malzemeler.	27
Tablo 4. Saflaştırmada kullanılan tüm çözeltiler.	27
Tablo 5. Enzim aktivite deneylerinde kullanılan bütün çözeltiler.	29
Tablo 6. Çalışmada kullanılan bitki türlerinin teminindeki ayrıntılar.	31
Tablo 7. HPLC-DAD analizlerinin kalibrasyon ve validasyon değerleri.	42
Tablo 8. <i>Rosa canina</i> bitkisinin meyve özütlerinde fenolik bileşiklerin gösterilmesi.	43
Tablo 9. <i>Rosa canina</i> bitkisinin çiçek özütlerinde fenolik bileşiklerin gösterilmesi.	43
Tablo 10. <i>Sorbus aucuparia</i> bitkisinin meyve ve yapraklarının bileşiklerinin HPLC-DAD ile belirlenmesi.	44
Tablo 11. <i>Sorbus caucasica</i> bitkisinin meyve ve yapraklarının bileşiklerinin HPLC-DAD ile belirlenmesi.	47
Tablo 12. Agar kuyucuk metoduyla bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi.	48
Tablo 13. Bitki metanol özütlerinde <i>E. coli</i> DNA polimerazIII α (DnaE) proteinin yönelik inhibisyon etkinin güçlü, zayıf ve etkisiz olarak değerlendirilmesi.	50

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum Per Sülfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
BT	Bitkinin tamamı
DAD	Diyot array dedektör
DMSO	Dimetil Sulfoksit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
HEPES	N-2-hidroksietilpiperazine-N-2-ethan sulfonik asid
HhH	Heliks-hairpin-Heliks
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kb	Kilobaz
KCl	PotasyumKlorür
LB	Luria-Bertani
LBA	Luria- Bertani Agar
MDR	Çoklu ilaç Direnci
MIK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
NaCl	Sodyum Klorür
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmüramikasit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
UV	Ultra Viyole
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
TBE	Tris, Borik asit, EDTA

1. GENEL BİLGİLER

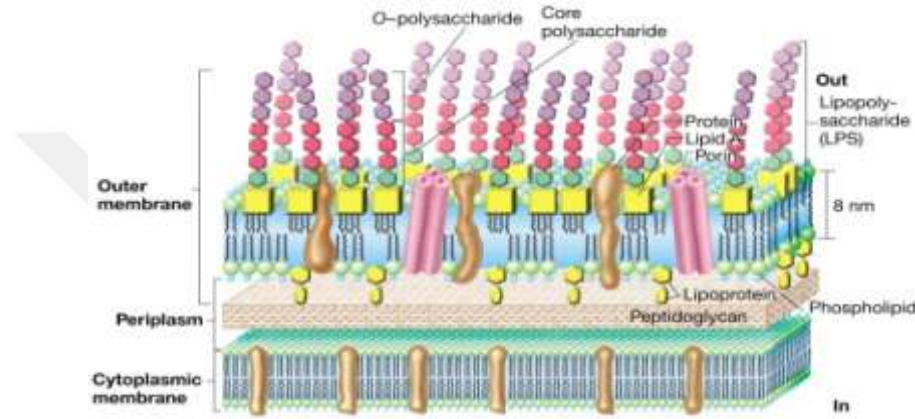
1.1. Giriş

Hücre duvarının spesifik özellikleri farklı boyama reaksiyonlarına yol açar. Gram olumlu, gram olumsuz ve asit-fast bakteriler bu reaksiyonlara göre ayırt edilebilirler. Hücre duvarı kısmen sert olup hücre zarının dışında bulunur. Hemen hemen bütün bakterilerde bulunur ve iki önemli fonksiyonu vardır. Birincisi, hücrenin karakteristik şeklini belirler. İkincisi, ozmoz ile hücreye sıvı alındığı zaman hücreyi parçalamaktan korur. Peptidoglukan; bakteriyal hücre duvarının en önemli bileşeni olup, kovalent olarak bağlı, tek bir molekül olarak düşünülen büyük bir polimerdir. Peptidoglukan polimerinde, N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) molekülleri aralıklı bir şekilde bulunurlar. Peptidoglukan genellikle kendisine tutulu vaziyette duran tekoik asitlere sahiptir. Dış membran; genellikle gram olumsuz bakterilerde bulunan tipik bir bilayer membrandır. Hücre duvarını çevreler ve peptidoglukan tabakaya küçük lipoprotein tabakayla tutunur. Dış membran kaba bir elek gibi iş görür ve peptidoglukan kovalent olarak bağlıdır. Bununla birlikte dış ortamdan bazı proteinlerin taşınımını kontrol eder. Lipopolisakkarid, dış membranın önemli bir kısmı olup gram olumsuz bakterileri belirlemek için kullanılır. Hücre duvarının integral kısmıdır ve ölü bakterinin hücre duvarı parçalanıncaya kadar hücreden ayrılmaz. Lipopolisakkarit, aynı zamanda polisakkaridler ve lipid A içeren bir endotoksin olarak bilinmektedir. Periplazmik boşluk; gram olumsuz bakterilerin bir başka ayırt edici özelliği olup, hücre zarı ve dış zar arasında bulunan boşluktur. Bu boşluk iki parçaya ayrılır; bunlar peptidoglukan ve hücre zarı arasında bulunan geniş parça, peptidoglukan ve dış zar arasında bulunan dar parçalardır. Periplazmik boşluk bakteriye zarar verebilecek maddeleri parçalamaya yarayan parçalayıcı enzimleri içerir (Demirbağ, 2006).

1.2. Gram Negatif Bakteriler

Gram olumsuz bakterilerin hücre duvarları gram olumlu bakterilerin hücre duvarlarına kıyasla daha incedir. Fakat bu duvar gram olumlu bakterilerin hücre duvarlarından daha karmaşıktır. Hücre duvarının sadece %10-20' si peptidoglukanıdır. Geri kalan çeşitli polisakkaritler, proteinler ve lipitlerden oluşmaktadır. Hücre duvarı,

duvarın dış yüzünden tutulu olan bir dış membranla sarılıdır. Duvar ve dış-zar arasında çok ince bir periplazmik boşluk bulunur. Hücre duvarının iç yüzeyi hücre zarından daha geniş bir periplazmik boşlukla ayrılır (Şekil 1). Periplazmik boşlukta, bakteriye zarar verebilen maddeleri parçalamaya yardımcı olabilecek yeterli konsantrasyonlarda bulunan toksin ve enzimler, üretildikleri bakteriye zarar vermezler. Gram olumsuz bakteriler renk giderme prosedürü esnasında boyayı hücrede tutamazlar, çünkü hücre duvarları ince ve duvarda lipoprotein ve lipopolisakkaritler yüksek oranda bulunurlar (Demirbağ, 2006).



Şekil 1. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı (URL1).

Gram-pozitif bakteriler, alkolle yıkandıktan sonra mavi rengi tutmaya devam ederlerken, Gram-negatif bakteriler mavi rengi kaybederler. Gram boyama testinde kristal viyolede sonra bir karşı boya eklenir. Bu boya Gram-negatif bakterileri kırmızı-pembe renge boyar. Bu test, hücre duvarlarının türüne göre çok farklı olan iki bakteri tipini ayırmakta son derece faydalıdır.

Gram-negatif bakterilerin pek çoğu patojendir. Yani, insanlarda hastalık yapma yetisine sahiplerdir. Bu hastalık yapma yetisi, Gram-negatif hücre duvarının bazı özelliklerinden, isim vermek gerekirse LPS (lipopolisakkarit) içeriğinden kaynaklanmaktadır. LPS'ler endotoksinlerdir. Proteobacteria türleri arasında önemli olanlar: *Escherichia coli*, *Salmonella*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdello vibrio*, asetik asit bakteriler, Legionella.

Tıbbi açıdan manalı basil türleri birkaç gruba ayrılırlar. Solunum sistemini etkileyenler: *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*,

Pseudomonas aeruginosa. İdrar yollarını etkileyenler: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*. Sindirim sistemini etkileyenler: *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi* (URL2).

Günümüzde bir çok gram negatif (çok antibiyotiğe dirençli *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Pseudomonas spp*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, penisilin dirençli meningokoklar, kinolon dirençli gonokoklar), gram pozitif (Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklar, vankomisin dirençli enterokoklar penisilin dirençli pnömokoklar, makrolid dirençli streptokoklar) ve aside dirençli (çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* ve *M. avium* complex) mikroorganizmalarda gözlenen antibiyotik direnci infeksiyonların tedavisinde büyük güçlükler yaratmaktadır (Vahaboğlu, 2004; Usluer, 2002).

1.2.1. *Escherichia* Cinsi

Escherichia cinsi üyeleri evrensel olarak insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak kanalında bulunmakla birlikte bu habitatlardaki baskın organizmalar değildir. Bağırsak kanalında *Escherichia* tarafından sentezlenen vitaminler ve özellikle de K vitamini beslenmede önemli bir rol oynar. Fakültatif aerob olan bu organizma muhtemelen oksijenin tüketilmesine yardım ederek kalın bağırsağın oksijensiz hale gelmesini sağlar. Yaban-tip *Escherichia* suşları şekerler, amino asitler, organik asitler ve diğer çok çeşitli karbon ve enerji kaynakları üzerinde gelişebilir ve çok ender olarak herhangi bir büyüme faktörünü gereksinirler.

Bazı *Escherichia* suşları patojendir. Bu suşlar bebeklik çağındaki çocuklarda ishale neden olur. Bu tip ishal vak'aları çocuk yuvalarında ve doğum koşullarında sıklıkla epidemik boyuta ulaşabilir. *Escherichia*, yaşlılarda ve cerrahi operasyon geçirdiği ya da iyonizan radyasyona maruz kaldığı için bağışıklığı baskılanmış bireylerde idrar yolu enfeksiyonlarına da neden olabilir. Enteropatojenik *E. coli* suşları sıklıkla dizanteri benzeri enfeksiyonlara ve ateşin yükselmesine neden olur (Madıgan ve Martıno, 2010).

1.2.1.1. *Escherichia coli*

Genelde *E. coli* kısaltması ile veya koli basili olarak bilinen *Escherichia coli*, memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan bakteri türlerinden biridir. Enterobacteriaceae ailesine ait bakteri türüdür (Tablo 1). Normalde bağırsakta yaşadığı için, *Escherichia coli* (*E. coli*)' nin çevresel sularda varlığı dışkı kirlenmesinin bir belirtisidir. *E. coli*, pediyatrist ve bakteriyolog olan Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarında keşfedilmiştir ve adını ondan alır; coli, “kalın bağırsaktan” demektir. *E. coli*, genel olarak bakteri biyolojisinin anlaşılması amacıyla üzerinde sıkça çalışılmış bir model organizma olmuştur. Canlılar arasında hakkında en fazla şey bilinen organizma olduğu söylenebilir. *E. coli*, normal bağırsak florasına aittir, biyolojik sınıflandırmada da bağırsaklarda yaşayan bakterilerden oluşan enterik bakteriler arasında yer alır. Bakteri çubuk şeklinde olup, boyutları 1-2 µm uzunluğunda ve 0,1 – 0,5 µm çapındadır. *Escherichia coli* gram negatif bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır (URL3).

Tablo 1. *Escherichia coli* mikroorganizmasının sınıflandırılması.

Alem	Eubacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	GammaProteobacteria
Takım	Enterobacteriales
Familya	Enterobacteriaceae
Cins	<i>Escherichia</i>
Tür	<i>Escherichia coli</i>

Mukozal epitelyum ve patojenler arasındaki spesifik etkileşimin kanıtı *Escherichia coli*' nin neden olduğu diyaredir. *E. coli*' nin çoğu suşu patojenik değildir ve cecum (kör bağırsak) ile kolonda yerleşik normal floranın parçasıdır. *E. coli*' nin pek çok suşu aynı anda vücutta bulunur ve bu patojen olmayan suşlar çok fazla sayıda rutin olarak vücuttan geçerek dışkı ile atılırlar. Bununla birlikte, *E. coli*' nin enterotoksik suşları ince bağırsak hücrelerine spesifik olarak tutunan CFA (kolonizasyon faktör antijenleri) olarak adlandırılan fimbriyal proteinleri üretir (Madıgan ve Martinko, 2010).

1.3. Antibiyotik Direnci ve Önemi

Antibiyotik direnci, ilaçlara karşı gözlenen direncin bir türü olup, bakteri türlerinin bir veya birkaç antibiyotik ile karşı karşıya kaldıklarında hayatta kalabilmelerini sağlar. Dirençli patojen türler infeksiyonlara neden olurlar ve sıradan ya da daha önceden kullanılan ilaçlar ile ve eski konsantrasyonlarında tedavi edilemezler. Klinik yönden önemli patojenler çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilirler ve böylece çoklu ilaç dirençli suşlar (MDR) olarak adlandırılırlar. En basit vakalarda bile, ilaç dirençli organizma birinci kuşak antibiyotiklere direnç kazanabilir ve bu yüzden ikinci kuşak antibiyotikler ile tedavi edilmesi gerekir. Özellikle bazı MDR patojenlerinin neden olduğu vakalarda, sırası ile ikinci ve üçüncü kuşak antibiyotiklere de direnç kazanılabilir. Bununla beraber, klinik uygulamalarda görülen antibiyotik dirençli patojen bakterilerin yaygınlaşması hem insan sağlığı için hem de hayvan sağlığı için kullanılan antibiyotiklerden kaynaklanmaktadır. Herhangi bir antibiyotiğin kullanımı, bir bakteri popülasyonundaki seçici baskıyı artırır ve dirençli bakteriler hayatta kalabilirken, duyarlı bakterilerin ölmesine neden olur. Antibiyotik direnci, modern tıbbın ciddi ve artan bir sorunudur. Özellikle patojen mikroorganizma kaynaklı antibiyotik direnci 21. yüzyılda en önemli halk sağlığı konularından birisini oluşturmaktadır ve alternatif tedavilere büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır. Antibiyotik dirençli suşların hızla yaygınlaşmasının neden olduğu bakteri infeksiyonları henüz kullanılmamış ilaç hedeflerine karşı yönlendirilecek yeni antibakteriyallerin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (Richet vd., 2001; Payne vd., 2004).

Enterobacteriaceae üyelerinde görülen direncin en önemli kaynağı (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*) beta-laktamaz enzimleridir. Betalaktamazlar en çok gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen, dizi analizleri benzediği için penisilin bağlayıcı proteinlerden türediğine inanılan ve beta-laktam halkası taşıyan antibiyotiklere karşı dirence neden olan enzimlerdir. Günümüze kadar tanımlanmış 1185 kadar beta-laktamaz bulunmaktadır (URL4). Bazı mikroorganizmalar beta-laktamazları doğal kromozomal bir enzim olarak salgılamakta bazıları bakteriler arasında aktarılabilen plazmidler aracılığı ile salgılamaktadır (Bradford, 2001).

Günümüzde çeşitli antibiyotiklerin toplumda tüketiminin, immun sistemi bozulmuş hastaların sayısının, yoğun bakım ünite sayısının artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Toplum kaynaklı infeksiyon etkenlerinden *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* spp, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* en çok direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalardır (Töreci, 2003; Archibald vd., 1997).

1.4. Bakteriler İçin Yeni Antibakteriyal Hedef Sistemler Olarak DNA Polimerazlar

DNA polimerazlar, DNA sentezi için mevcut DNA'yı kalıp olarak kullanır ve kalıba uygun nükleotitlerin ilavesini katalizleyerek DNA'nın duplikasyonunu sağlarlar. İlk tanımlanan DNA polimeraz enzimi, *E. coli* DNA Polimeraz I'dir ve 1956 yılında Kornberg ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Özellikle son yıllarda birçok mikroorganizmanın genom sekansının belirlenmesi sonucunda çok sayıda yeni DNA polimeraz keşfedilmiştir. Bu DNA polimerazlar sadece DNA'nın replikasyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda DNA'nın tamirini ve rekombinasyonunu da gerçekleştirmektedirler. Ayrıca genel bir üç boyutlu çalışma yapısını ve nükleotitlerin eklenmesi ve uzaklaştırılmasında genel bir mekanizmayı paylaşmak, yapısı bilinen tüm DNA polimerazların karakteristiğidir. Aminoasit sırası benzerlikleri ve yapısal analizler temel alınarak DNA polimerazlar 6 ailede sınıflandırılır (Braithwaite ve Ito., 1993; Cann vd., 1999; Ito ve Braithwaite, 1991; Ohmori ve vd., 2001) (A, B, C, D, X ve Y ailesi DNA polimerazlar). Bütün ökaryotik ve prokaryotik DNA polimerazlar aynı sentez aktivitesini gösterirler. Buna ilaveten bazı DNA polimerazlar ikinci ve üçüncü bir aktivite gösterebilirler. Bu aktivite, 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi (proofreading aktivite) ve 5'→3' nükleaz aktivitesi veya her ikisi birden olabilir.

1.4.1. DNA Polimeraz Familyaları

A ailesi DNA polimerazlar, *E. coli* DNA polimeraz I'e benzeyen polimerazlar olarakta bilinirler. İlk tanımlanan DNA polimeraz I (*E. coli* DNA polimeraz I) bu aileye aittir. İlk kristal yapı çalışmaları ve enzim substrat ilişkisi, polimeraz aktif

bölgesinin tanımlanması, polimerizasyon esnasındaki bir DNA polimeraz enziminin çalışma şeklinin belirlenmesi bu polimeraz ile yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

B familya DNA polimerazlar, polimeraz II olarak da adlandırılmaktadır. B familyasına ait DNA polimerazların çoğu ökaryotik polimerazları (α , δ , ϵ ve ζ) ve arkea bakterilere ait olan replikatif DNA polimerazları kapsar (Hopfner vd., 1999). Ayrıca üç boyutlu yapısı tam olarak aydınlatılan bazı bakteri ve bakteriyofaj DNA polimerazları da bu familya içinde yer alır (T4, Phi29 ve RB69 bakteriyofaj polimerazları) (Wang vd., 1997).

C familyası DNA polimerazlar, bakterilerde genetik materyalin replikasyonunu gerçekleştiren esas enzimlerdir. Kendi içinde polC ve DnaE olarak iki alt gruba ayrılırlar. Bu familya polimerazlarından PolC, 3' ekzonükleaz aktivitesi için 3 adet korunmuş bölgeye sahiptir (Exo I, Exo II, Exo III) (Timinskas vd., 2013).

D familyası DNA polimerazlar, polimerizasyon ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptirler. 3'→5' ekzonükleaz domein, yüksek doğrulukta DNA sentezi yapmasına yardımcı olur. 3'→5' ekzonükleaz aktiviteye ilaveten çok güçlü ve işlem kapasitesi yüksek bir DNA polimeraz aktivitesi gösterirler. D familyasına ait DNA polimeraz enzimi daha çok arkaebakterilerde bulunur (Cann vd., 1998; Uemori vd., 1997; Shen vd., 2001).

X familyası DNA polimerazlar, virüslere ve ökaryotik DNA polimerazlara ait DNA polimeraz enzimlerini kapsar ve DNA'nın tamirini gerçekleştirir (baz kesip çıkarma). Bu enzimler düşük doğruluk ile DNA'nın sentezini gerçekleştirirler. Bu familya DNA polimerazları metal iyon olarak Mg^{+2} yerine Mn^{+2} 'yi kullanarak aktivite gösterirler. Bu familya DNA polimerazları içerisinde insan polimeraz β , λ , pol μ ve terminal deoksiribonükleotidil transferaz ile maya Pol4 enzimi yer almaktadır (Hubscher vd., 2002).

Y familyası DNA polimeraz, bilinen DNA polimeraz enzimleri ile aminoasit seviyesinde hiçbir sekans benzerliği göstermezler. Yüksek hata oranı ve düşük prosesiviti ile normal DNA'nın sentezini gerçekleştirirken, zarar görmüş kalıp zincir

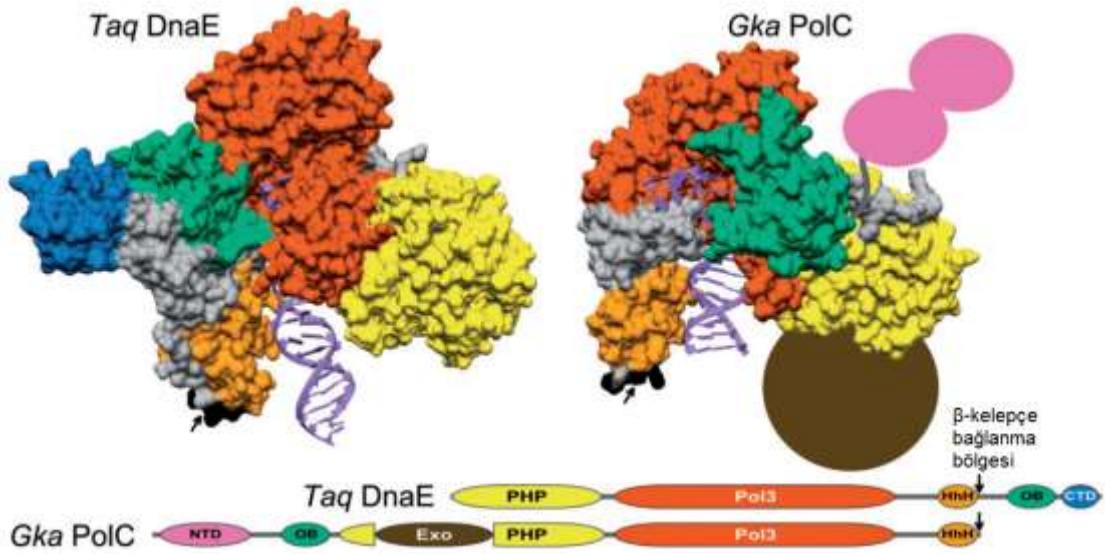
üzerinden de senteze devam edebilirler (Wei, 2005). En önemli özelliklerinden birisi translezyon DNA sentezi gerçekleştirebilmeleridir.

1.4.2. C Familyası DNA Polimerazlar (PolIII α)

DNA polimeraz III, bakteriyal genomların replikasyonundan sorumlu replikasyon makineleridir (Kornberg ve Baker, 2005; McHenry, 2011a; Robinson vd., 2012; . Kurth and O'Donnell 2013; McHenry, 2011b). Esas DNA sentezi DNA polimerazIII α -alt ünite (PolIII α) tarafından gerçekleştirilir ve bu polimerazlar C familyası DNA polimerazlar olarak sınıflandırılırlar (Ito ve Braithwaite, 1991). 2000 civarında bakteri genomu analiz edildiğinde, tek bir istisnai durum olmaksızın, her birinin en az bir veya daha fazla DNA polimeraz III α alt ünitesini (Pol III α) veya homoloğunu kodladığı ortaya çıkmıştır. C familyası DNA polimerazlar sınıflandırıldığında iki büyük forma gruplandırılırlar. Bunlar ortak bir ata polimerazın duplikasyonu ile oluşmuş PolC ve DnaE formlarıdır. PolC, çok yakın akraba üyelerin bir araya geldiği bir grup olurken, DnaE ilave üç alt gruba (DnaE1, DnaE2, DnaE3) daha ayrılır.

Şaşırtıcı bir şekilde, bakteriyal PolIII α alt üniteler B familyasına ait olan hem ökaryot hem de arkea replikatif polimerazlarından farklıdırlar (Lamers vd., 2006; Bailey vd., 2006). Bunun yerine PolIII α katalitik domain uzaktan X familyası DNA polimerazlar ile akrabadır (Lamers vd., 2006; Bailey vd., 2006). Bu beklenmeyen polIII α ve X familya polimeraz benzerliğinin proteinin aminoasit diziliminde olmadığını sadece üç boyutlu protein yapısında bu şekil bir benzerliğin olduğuna dikkat edilmelidir (Lamers vd., 2006; Bailey vd., 2006). Bu benzerlik her iki aileden proteinlerin palm domainlerinin katlanmalarında ve DNA'ya aynı şekilde bağlanmalarında gözlenmektedir (Wing vd., 2008). Aksine A, B ve Y familyası DNA polimerazlarda palm domaini tamamen farklı şekilde katlanır. Bunların hepsi birlikte dikkate alındığında, bakteriyal replikatif polimerazların (C familyası) bir yanda, arkae/ökaryotik replikatif polimerazların (B familyası) diğer yanda yer aldığını desteklemektedir ve iki bağımsız DNA replikasyon sisteminin bileşenleri olduğunu göstermektedir.

PolIII α alt ünite DnaE (Lamers vd., 2006; Bailey vd., 2006) ve PolC olarak iki büyük forma ayrılır. DnaE için tipik örnek, üzerinde en fazla çalışılan Gram (-) *Escherichia coli* polIII α 'dır. PolC ise *Bacillus subtilis* gibi düşük GC içeriğine sahip Gram (+) bakteriler için tipik örnektir. Bu iki farklı polIII α formunun oluşumu, Gram(-) ve Gram (+) bakterilerin ayrılmasından daha önce atasal bir gen duplikasyon olayının sonucu olduğu düşünülmektedir (Koonin ve Bork, 1996). Bu iki form şüphesiz bir şekilde ortak bir orijini paylaşırlar, fakat ortak bütünlük ve yapısal domainlerin düzenlenmesi açısından farklıdırlar (Lamers vd., 2006; Bailey vd., 2006; Evans vd., 2008). Her ikisi de polimeraz ve histidinol fosfat (PHP) domaine, “palm”, “thumb” ve “fingers” dan oluşan polimeraz çekirdek, β -clamp bağlanma motifi tarafından takip edilen ardışık heliks-hairpin-heliks (HhH) $_2$ motiflerine sahiptir ve hepsi aynı sırada düzenlenmiştir (Şekil 2).



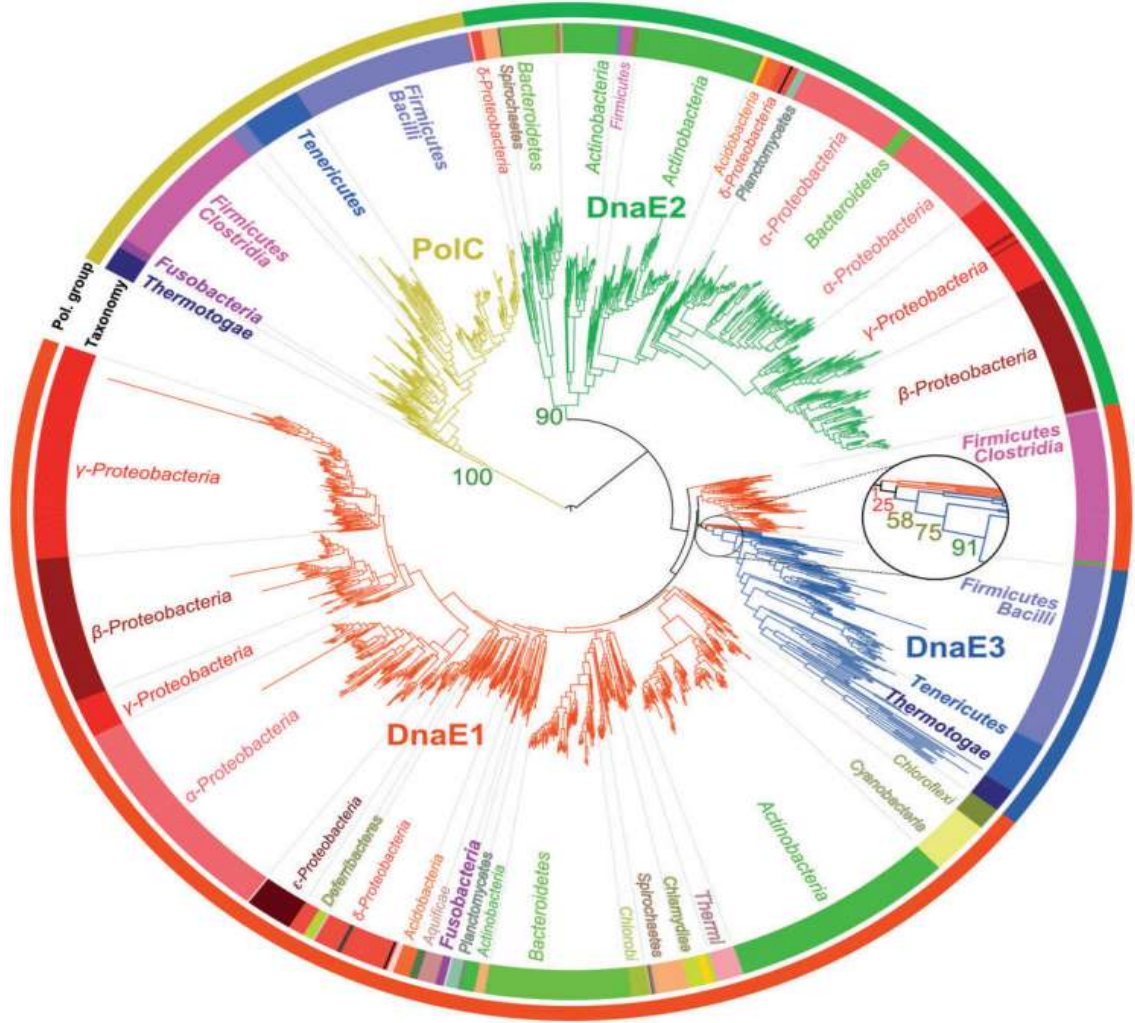
Şekil 2. Domein organizasyonu açısından PolC ve DnaE'nin şematik gösterilmesi (Timinskas vd., 2013).

Bu iki C familya polimerazların farklılıklardan bahsetmek gerekirse oligonükleotid bağlanma domaini her iki formda da vardır ancak polipeptid zincirin karşı uçlarına yerleşmişlerdir. En önemlisi PolC, PHP domaininin içine yerleşmiş 3'→5' ekzonükleaz domaine sahipken, DnaE bu domaine sahip değildir ve ayrı bir alt ünite olan ϵ tarafından 3'→5' ekzonükleaz fonksiyon (görev) yerine getirilir.

Bakteri hücrelerindeki farklı PolIII α alt ünitelerinin ve rollerinin sayısı düşünülürse, dikkate değer farklılıklar vardır. Yaygın olarak çalışılan *E. coli* tek bir DnaE tipi PolIII α alt ünite kodlar ve polimeraz hem lider hem de izci DNA zincirinin sentezinin gerçekleştirir (Kornberg ve Baker, 2005; Reyes-Lamothe vd., 2010; Georgescu vd., 2012). Bununla beraber bakteri dünyasında evrensel bir durumda değildir. Örneğin düşük GC içeriği sahip Gram (+) bakterilerde hem polC hem de DnaE bulunur (Koonin ve Bork, 1996). *Bacillus subtilis* ve diğer Gram (+) bakteriler ile yapılan deneyler PolIII α 'nın her iki tipinde gerekli olduğunu göstermiştir (Dervyn vd., 2001; Inoue vd., 2001). Başlangıçta PolC ve DnaE'nin sırası ile lider ve izci zincirin sentezinden sorumlu olduğu düşünülmüştür (McHenry, 2011a). Bununla beraber, son zamanlarda DnaE'nin hem lider hem de izci zincirde RNA primerinin başlangıç uzamasını gerçekleştirir ve daha sonra polC görevi alarak uzun DNA zincirinin hızlıca sentezini gerçekleştirir (Sanders vd., 2010). Bu bağlamda *Bacillus subtilis* DnaE, RNA primerini uzatan ve daha sonra processive (ilerleyen) replikasyon yolunu açan ökaryotik Pol α 'yı hatırlatır (Perera vd., 2013).

Bazı bakteriler ikinci bir DnaE kopyası taşır ve bu da DnaE2 olarak tanımlanır. Şuana kadar, DnaE2'yi hedef alan genetik çalışmalar tek bir istisna olmaksızın DnaE2'yi gereksiz bir gen olarak tanımlamaktadır (Boshoff vd., 2003; Zeng vd., 2011) ve bu da DnaE2'nin kromozomal DNA replikasyonu için gerekli olmadığına işaret etmektedir. Bunun yerine DnaE2, DNA zararlıları ile indüklenen hataya meyilli translezyon DNA sentezi (TLS) ile ilişkili aktivite göstermektedir (Boshoff vd., 2003; Sanders vd., 2006; Dulermo vd., 2009; Zeng vd., 2011).

Filogenetik analizler, PolC ve DnaE polimeraz grupların birbirinden iyice ayrıldığını ortaya koymaktadır ve farklı derecelerde değişim gösterir (Şekil 3). PolC polimerazlar *Bacillus subtilis* (*B. sub*)'in iki tane gerekli PolIII α alt ünitesinin bir tanesi (PolC) dikkate alınarak tiplendirilir. PolC'nin kompakt tek bir grup oluşturduğu görülür. Aksine DnaE tipi polimerazlar anlamlı derecede çok farklılık gösterirler. DnaE tipi polimerazlar arasında en farklı grubu DnaE2 grubu oluşturur.



Şekil 3. C familya DNA polimeraz III α 'ün filogenetik gruplandırılması (Timinskas vd., 2013).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda C familyası polimerazı taşımayan tek bir bakteri genomu bulunamamıştır. Bakterilerin çoğu 2, 3 veya 4 adet C familyası DNA polimeraza sahiptirler. Bununla beraber genomların büyük kısmının (%41) *E. coli*'deki gibi DnaE1 tipi tek bir polimeraz kodlamaktadır. Bakteriyal genomlarda DNA polimeraz III'lerin dağılımı incelendiğinde üç büyük kombinasyonda buldukları ortaya çıkıyor. Bunlar; (1) DnaE1 tek başına veya bir veya daha fazla sayıda DnaE, (2) PolC ve DnaE birlikte, (3) PolC ve DnaE1 birlikte. İlk iki kombinasyon sırası ile *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'te bulunmaktadır. Üçüncü kombinasyon (PolC+DnaE1) *Clostridia*'da bulunan ve yeni bir kombinasyon oluşturmaktadır ve bugüne kadar da henüz karakterize edilmemiştir (Timinskas vd., 2013) (Tablo 2).

Tablo 2. Tanımlanan 945 bakteri genomunda C familyası polimeraz tipleri ve kombinasyonları (Timinskas vd., 2013).

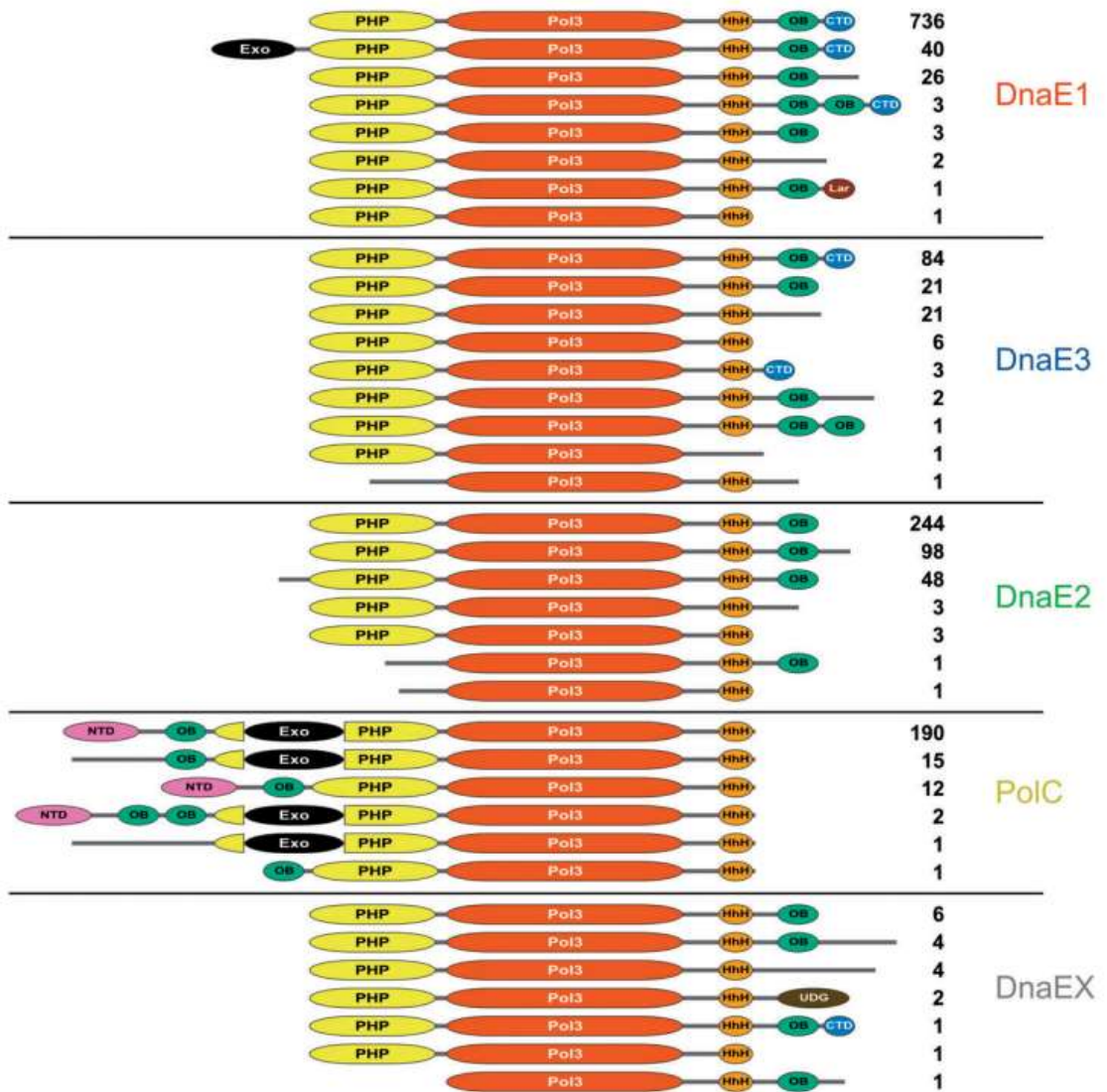
Genom sayısı	Polimeraz sayısı	Polimeraz kombinasyonu	Taksonomik dağılımı
386	1	DnaE1	Firmicutes hariç (Bacilli, Erysipelotrychi), Tenericutes, Thermotogae, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Ignavibacteria
282	2	DnaE1+DnaE2	Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Thermodesulfobacteria, Verruimicrobia, Gemmatimonadetes, Ignavibacteria, Nitrospirae, Thermi, Firmicutes, Clostridia
40	3	DnaE1+2xDnaE2	Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Acidobacteria
8	4	DnaE1+3xDnaE2	Bacteroidetes, Proteobacteria
3	2	2xDnaE1	Actinobacteria, Deferribacteres
3	3	2xDnaE1+DnaE2	Actinobacteria, Proteobacteria
3	3	DnaE1+DnaE2+DnaEX	Actinobacteria, Proteobacteria
2	2	DnaE1+DnaEX	Proteobacteria
66	2	PolC+DnaE1	Firmicutes (Clostridia, Negativicutes), Fusobacteria
3	3	PolC+DnaE1+DnaE2	Firmicutes (Clostridia)
6	3	PolC+DnaE1+DnaEX	Firmicutes (Clostridia, Negativicutes)
1	3	PolC+2xDnaE1	Firmicutes (Clostridia)
1	4	PolC+DnaE1+2xDnaEX	Firmicutes (Negativicutes)
1	4	2xPolC+DnaE1+2xDnaEX	Firmicutes (Clostridia)
130	2	PolC+DnaE3	Firmicutes (Bacilli, Erysipelotrychi), Tenericutes, Thermotogae
3	3	PolC+DnaE3+DnaE2	Firmicutes (Bacilli, Clostridia)
5	3	PolC+DnaE3+DnaEX	Firmicutes (Bacilli)
2	3	2xPolC+DnaE3	Tenericutes, Thermotogae

1.4.2.1. Domain Organizasyonu

Farklı DNA polimeraz grupları arasındaki farklılıkları daha iyi anlamak için bu polimerazların domain organizasyon düzenlerini incelemek gerekir (Şekil3). Gruplar kendi içlerinde incelendiğinde her bir grubun tipik bir mimaride olduğu görülmektedir. Ancak aynı zamanda her grup içinde önemli değişkenliklerde gözlenmektedir. Yapısal-fonksiyonel domainlerin en önemli korunmuş alt organizasyonu PHB, Pol3 ve (HhH)₂ kombinasyonunu içerir. Polimeraz aktiviteden sorumlu esas merkezin (Pol3) korunması beklenir. Ancak PHB ve (HhH)₂ domainlerinin neredeyse evrensel düzeyde

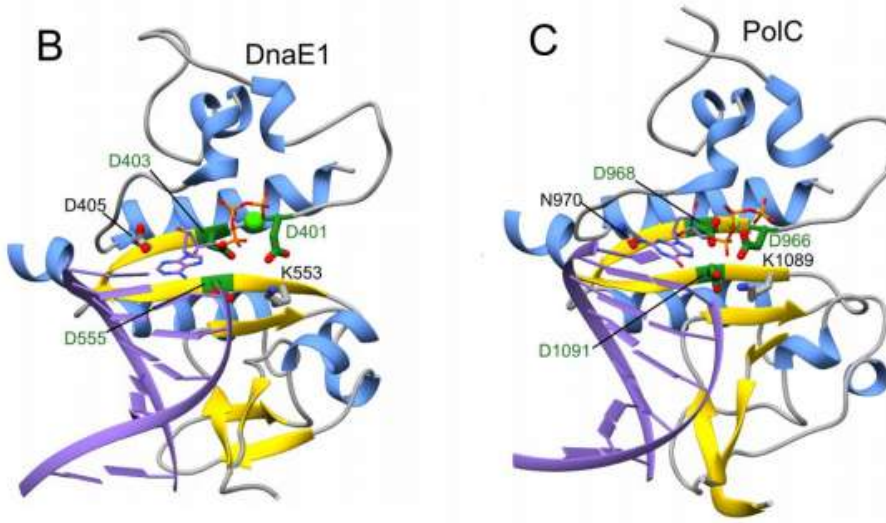
korunması/var olması bir dereceye kadar şartıktır ve yapısal ve fonksiyonel rolünün önemini göstermektedir.

En yaygın PolC mimarisi *B. subtilis* PolC ile aynıdır (%86). NTD, OB domain, PHB domainine yerleşik ekzonükleaz (Exo) domain, Pol3 ve (HhH)₂ motifinden oluşur. DnaE1 grubu için en tipik organizasyon *E. coli* polIIIα alt ünitesi tarafından temsil edilir (%91) ve PHB, Pol3, (HhH)₂, OB ve CTD domainlerinden oluşur (Şekil4) (Timinskas vd., 2013).



Şekil 4. Domein organizasyonu açısından farklı familya C polimerazların organizasyonu (Timinskas vd., 2013).

Katalitik magnezyum iyonlarını koordine eden polimeraz aktif bölge aspartik asit rezidüleri (D401, D403 ve D555, *E. coli*) tüm C familya polimerazlarında korunmuştur (Lamers vd., 2006; Pritchard ve McHenry, 1999) (Şekil4). Bununla birlikte bütün gruplarda polimeraz aktif bölge yüksek oranda korunmasına rağmen çevresindeki hangi dereceye kadar olan değişimler önemlidir bilinmemektedir. PHB domainin, C familya polimerazlarda yeni bir Zn^{+2} bağımlı hata düzeltme ekzonükleaz aktivitesi gösterilmiştir (Wing vd., 2008; Stano 2006).



Şekil 5. DnaE1 ve PolC'nin aktif bölgelerinin karşılaştırılması (Timinskas vd., 2013).

1.4.3. Yeni Antibakteriyal Hedef Sistem Olarak Replikatif DNA PolIII α

Farklı bitkiler tarafından üretilen triterpenler, flavonoidler, kromonlar, lipidler, iridoidler, fitosteroller, kumarinler, antrasiklinler, kinonlar, tanenler, protoberberinler, benzimidazoller gibi kimyasal açıdan çok kapsamlı bileşikler ve diğer doğal ürünler DNA metabolizmasıyla ilgili enzimlere karşı inhibisyon etkilerinin olması, anti-bakteriyal, anti-viral ve kanser araştırmaları için önemli olan yeni moleküler hedeflerin ortaya çıkmasına izin vermektedir. Bakteriyal DNA polimerazlar bakteri DNA replikasyonunda oynadığı önemli rolü nedeniyle, anti-bakteriyal yeni ilaçlar için önemli hedef haline gelmiştir. Bitkilerden doğal bileşiklerin tanımlanmasının DNA replikasyonu üzerinde etkili olan anti-bakteriyal ilaçların keşfedilmesinde önemli rol oynayacaktır.

1.5. Yeni Antibakteriyal Moleküllerin Bitkilerde Araştırılması

Son zamanlarda, patojen organizmaların kontrol altına alınmasında antimikrobiyal aktiviteye sahip bazı aromatik bitki özütlerinin yada uçucu yağlarının kullanım olanaklarını araştıran çalışmalarda önemli bir artış gözlenmektedir (Perez vd., 1990; Ahmad vd., 1998). Bu çalışmada 11 adet bitkiye ait adet organlar (çiçek, yaprak, meyve) organ değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bitkilerin genel özellikleri aşağıdaki başlıklarda özetlendiği şekildedir.

***Rosa canina* (1)**, köpek gülü olarak ve merkezi Avrupa' da Rosaceae ailesinin en geniş çapta bulunan cinsidir (Wissemann vd., 2006). Asıl vatanının Türkiye olduğu tahmin edilmektedir (URL5). Çiçekleri kalp şeklinde beyazımsı pembe veya pembe renkte, beş adet taç yapraktan meydana gelir. Meyveleri koyu kırmızı renkte oval veya yumurta şeklindedir (URL5). *Rosa canina* bitkisinin yalancı meyveleri yüzyıllarca beslenme, tıbbi amaçlar ve süslemelerde kullanılmıştır. Çay, nektar, şarap veya marmelat olarak tüketilir (Uggla vd., 2005; Yıldız ve Alpaslan, 2012). Avrupa' da geleneksel tıpta kuşburnu özütleri diüretik, kabızlık giderici olarak; böbrek hastalıklarında, eklem iltihaplarında, gut hastalığında, ateş, soğuk algınlığı ve C vitamini yetersizliğinde kullanılır (Chrubasik vd., 2008). *Rosa canina* özütleri antiproliferatif (hücre büyümesini engelleyen) (Guimaraes vd., 2014; Tumbas vd., 2012), obezite ve diabete karşı aktif özellik gösterdiği bildirilmiştir (Chrubasik vd., 2008). Fitokimyasal çalışmalar kuşburnu özütlerinin fenolik asitler, proantosiyeninler, taninler, flavonoidler, doymamış yağ asitleri, fosfolipidler, mineraller, galaktolipidler ve karotenoidler gibi aktif bileşenler içerdiğini göstermiştir (Chrubasik vd., 2008). Jäger ve arkadaşları, in vitro ortamda kuşburnundaki linoleik ve alfa-linoleik asitlerin siklooksigenaz 1 (COX-1) ve siklooksigenaz 2 (COX-2) inhibitör aktivitesi olduğunu göstermişlerdir (Jäger vd., 2007, 2008). Ayrıca üç triterpen asitlerin COX ve lipooksigenaz inhibitör özelliği göstermiştir (Wenzig vd., 2008).



Şekil 6. *Rosa canina* bitkisinin meyvesi (solda) ve çiçeği (sağda).

***Thymus praecox* (Anzer çayı) (subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*) (2)**
Türkiye'nin Doğu Karadeniz bölgesinde Rize Anzer yaylasında geniş yayılış göstermekte olup ismini burdan almıştır. Çok yıllık bitkidir ve oldukça aromatik olan çiçekleri mordan pembe-beyazdır (Şekil 7). *Thymus* (Lamiaceae), Türkiye'de 24 endemik olan 41 türle temsil edilen bir cinstir (Şekeroğlu vd, 2007). Literatürde bu bitkinin ilaç özelliği iyi bilinen yüz üzerinde madde etraflıca tanımlanmıştır (Orhan vd., 2009; Pank vd., 1982; Kanas ve Loukis, 1987). Çoğu raporlar *Thymus*' un uçucu bitki yağlarını tartışmıştır; çoğunlukla bazı büyük fenolik bileşenlere odaklanmıştır ki bu bileşenler bitkilerin organoleptik özelliğini belirler. *Thymus* rosmarinik, kafeik, p-koumarik ve ferulik asit, luteolin, kuersetin, apigenin bakımından zengindir (Zgorka ve Glowniak, 2001; Marin vd., 2003; Fecka ve Turek, 2008a; Boros vd., 2010; Costa vd., 2012; Jabri-Karoui vd., 2012). Anzer çayı özütlerinde HPLC-UV ile fenolik asitler (kafeik asit, ferulik asit, p-koumarik asit, p-hidrobenzoik asit, protokatehuik asit ve vanilik asit) ve flavonoidler (kateşin, epikateşin, kaemferol ve kuersetin) tanımlanmış ve nicelik belirlenmesi yapılmıştır (Turumtay vd., 2014).



Şekil 7. *Thymus praecox* bitkisi.

Thymus serpyllum (3), yabancı kekik olarak iyi bilinir ve Akdeniz, Avrupa ve Kuzey Afrika’da çoğunlukla yüksek rakımda doğal olarak yetişir (Şekil 8). Geleneksel olarak hazırlanan çeşitli ilaçlar için kullanıldığı kabul edilmektedir. Eterli uçucu yağ; thymol (%50 civarında), karvakrol, borneol, pimen, tanen ve flavonlar içerir. Miloš Nikolić vd.’nin yaptığı çalışmada, GC/MS analiz yardımıyla büyük bileşen olarak thymol, *T. algeriensis*, *T. vulgaris* ve *T. serpyllum* bitkilerinde sırasıyla %56, %48.9 ve %38.5 oranında yağ katkısıyla sonuçlandırılmıştır. Üç bitkide esansiyel yağlar bütün suşlara karşı önemli antimikrobiyal aktivite sergilemiştir, *T. serpyllum* bitkisindeki yağ en kuvvetlisidir (MIC 2.5–5 µg/mL, MBC 5–10 µg/mL; MIC 1–2 µg/mL, MFC 2–4 µg/mL).



Şekil 8. *Thymus serpyllum* bitkisi.

Malva sylvestris (4), Türkçe adı; yabancı ebegümececi. Yatık gövdeli veya eğik yükselişli iki veya çok yıllık bitkilerdir (Şekil 9). Ebegümececi Avrupa, Kuzey Afrika, Güney-Batı Asya’da yetişen doğal bitkidir. Fitokimyasal çalışmalar bu bitkinin çok sayıda polisakkaritler, antosiyaninler, kumarinler, taninler, flavonlar, musilajen ve temel yağ içerdiğini açığa çıkartmaktadır (Cuttillo vd., 2006; Farina vd., 1995; Gasparetto vd., 2012; Schulz vd., 2003). Ayrıca Cuttillo vd., *Malva sylvestris* bitkisinde sesquiterpenler, diterpenler, monoterpenler benzeri terpenoidlerin olduğunu tanımlamışlardır.



Şekil 9. *Malva sylvestris* bitkisi.

***Hyoscyamus niger* (L) (5)**, *Solanaceae* familyasında genellikle banotu olarak bilinen Asya ve Avrupa'da geniş yayılım gösteren bitkidir (Şekil 10). *H. niger* antikolinergik tropan alkaloidlerin önemli kaynağıdır. Ayrıca nor-tropan alkaloid içerir, glikosidaz inhibitör aktivitesi güçlüdür (Asano vd., 1996). Alkaloidlerin yanı sıra bazı alkaloid olmayan bileşikler, tiramin türevleri (Ma vd., 1999), lignanamidler (Ma vd., 2002) ve lignanlar (Begum vd., 2009; Sajeli vd., 2006) rapor edilmiştir.



Şekil 10. *Hyoscyamus niger* bitkisi.

***Frangula alnus* (Barut ağacı) (6)**, cehrigiller (*Rhamnaceae*) familyasından 4-5 m'ye kadar boylanan yaprak döken yavaş gelişen bir bitki türüdür (Şekil 11). İskandinavya'dan Kuzey Afrika'nın güneyi ve Türkiye'de Kuzey Anadolu'da dağlık bölgelerdeki nemli ormanlık sahalarda sakallı kızılâğaç, doğu kayını ve adi gürgen türleriyle birlikte yer alır. Kabukları tanin ve peptid alkaloidlerini içerir (Hansel & Sticher, 2007, chap. 26; Wichtl, 2004).



Şekil 11. *Frangula alnus* bitkisi.

Sorbus aucuparia (7), Türkiye’ de kuş üvezi, yöresel adları ovaz, ayı ovazı olarak bilinen bitkinin ortalama boyu 7-15 m’ dir (Şekil 12). 1500-2500 m rakımda yetişir. *Sorbus aucuparia* (üvez), Avrupa’ nın her yerinde, Asya’ nın batı bölümlerinde kolaylıkla bulunabilir ve Kuzey Amerika ile Avrupa’ da park ve bahçelerde yetişen popüler süs bitkisidir. *S. aucuparia*’ nın, quersetin, izoquersetin, hiperin, rutin, kateşin, epikateşin ve klorogenik asit polifenolik bileşikleri içerdiği rapor edilmiştir (Kylli vd., 2010; Olszewska vd., 2012; Termentzi vd., 2008). Fenolik içerik yönünden zengindir (Gil-Izquierdo vd., 2001; Maatta-Riihinen 2004) bu yüzden antibakteriyal (Krisch vd., 2008) ve antioksidan aktivite gösterir (Heinonen vd., 1998; Termentzi vd., 2006). Yiyecekleri koruyan olarak bilinen sorbik asit ilk kez adından da anlaşılacağı gibi *S. aucuparia*’ dan izole edilmiştir.



Şekil 12. *Sorbus aucuparia* bitkisinin meyve ve yaprakları.

Sorbus caucasica var. *yaltirikii*, (8), 7 metreye kadar boylanan ülkemizde sadece Artvin ilimizin dağlarında 900-2000 metreler arasında yayılan küçük ağaçlardır (URL6) (Şekil 13).



Şekil 13. *Sorbus caucasica* var. *yaltirikii* bitkisi.

Sorbus umbellata (9), Ak üvez olarak bilinir. *S. umbellata* var *umbellata*, *S. umbellata* var *taurica*, *S. umbellata* var *orbiculata*, *S. umbellata* var *cretica* olmak üzere dört adet varyetesi vardır (Şekil 14). Ülkemizin her yerinde peyzaj uygulamalarında kullanılabilir (URL6). *S. umbellata* meyveleri özel tat ve aroması ile yabancı hayatta yenilebilir doğal bir kaynaktır. Bitkinin meyveleri özellikle insan ve kuşlar tarafından tüketilir ayrıca diğer canlılar tarafından da tüketilir. *S. umbellata* meyvelerinin analizinde, birleştirilmiş elektrosprey iyonizasyon eş zamanlı kütleli spektrometre ultra-performans sıvı kromatografisi kullanılmıştır (UPLC-ESI-MS/MS). Bu çalışmada, toplam fenolik ve flavonoid içeriği, bireysel fenolik profil antioksidan aktivite ile ilişkilendirilmiştir ve besinsel değeri çalışılmıştır. *S. umbellata* meyveleri büyük bileşen olarak gentsik asit, protokatehuik asit içerirler; ve ferulik asit, klorogenik asit, kafeik asit, syringik asit, vanilik asit, 3,4-dihidrobenzaldehit içerir. *S. umbellata* meyvelerinde toplam fenolik ve flavonoid içeriği değerlendirilmiştir ve fenolik içerik sonuçları LC ile uyumluluğuna bakılmıştır (Kıvrak I ve Kıvrak S, 2014).



Şekil 14. *Sorbus umbellata* bitkisi.

***Vitis vinifera* (Üzüm), (10)**, en çok kültürü yapılan meyve bitkisi ve ekonomik olarak dünya çapında önemli bir üründür (Şekil 15). Üzümde çoğunlukla bulunan flavan-3-ols, flavonlar ve antasiyoninler, oksidasyon derecesine göre üç yapısal sınıfa bölünmüştür. Flavanoid olmayanlar ise çoğunlukla hidroksisinamik asit, hidroksibenzoik asit, stilbenler ve volatile fenollerdir (Figueiredo-González vd., 2012; Liang vd., 2011; Teixeira vd., 2013). Siyah üzüm kabuğunda bulunan resveratrol maddesi, anti-kanserojen ve anti-oksidan olma özelliklerini taşımakta ve beyin hücrelerini korumaktadır. Üzümün çekirdeğindeki diğer bir madde olan kuersetin ise, kan yapımına yardımcı olmaktadır. Bu yolla damarların sağlığını da olumlu yönde etkilemektedir (URL7).



Şekil 15. *Vitis vinifera* (üzüm) bitkisi.

***Ziziphora clinopodioides* (11)**, *Lamiaceace* ailesine ait çok yıllık, geleneksel Uygur medikalinde iyi bilenen bir bitkidir (Şekil 16). Taze ve kuru *Ziziphora clinopodioides* (*Z. clinopodioides*) halk tarafından erişte ve çayda baharat olarak kullanılırdı. Fitokimyasal araştırmalar bu cinsin flavonoidler, polifenoller, polisakkaritler, yağ asitleri ve steroller bakımından kaynak olduğu gösterilmiştir (Yu vd., 2012). Ayrıca bu bitki kafeik asit, rosmanirik asit gibi fenolik bileşenlerin biyosentezini yapar ve flavonoid türevleri, luteolin, linarin, diosmin, thymonin içerir (Yang vd., 2008; Tian vd., 2012). *Z. clinopodioides* bitkisinin esansiyel yağları pulegon, trans-izopulegon, menthol, 1,8-kineol ve limone ana bileşik olarak bulunmuştur (Ding vd., 2014a, b). Sıçanlardan izole edilen göğüsel aortik halka in vitroda model olarak kullanılarak, tüm bitkinin (*Z. clinopodioides*) hidroalkolik özüt fraksiyonlarında biyoaktif bileşiklerin aktivitesi belirlenmiş ve değerlendirilmiştir. Akasetin, apigenin, krisin, thymonin, acetovanilin, 4-hidroksi asetofenon ve etil 4-kumarat olmak üzere yedi

bileşen aktif olarak tanımlanmıştır. Apigenin, krisin ve etil 4-kumaratın en etkili olduğu bulunmuştur. Senejouxa vd.,yaptığı bu çalışmada sonuç olarak *Z. clinopodioides* bitkisinin en azından bir kısım fenolik bileşenleri damar genişlenemesini uyardığının ilk kez kanıtı bulunmuştur.



Şekil 16. *Ziziphora clinopodioides* bitkisi.

1.6. Çalışmanın Amacı

Bakteri DNA polimerazlarını hedef alan bir antibiyotik henüz bilinmemektedir. Son zamanlarda çeşitli bitki kaynaklarından farklı DNA polimeraz ailelerine yönelik inhibitör etkinin araştırılması çalışmaları yürütülmektedir. Rize ili zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir ve çok sayıda endemik bitkiye ev sahipliği etmektedir. Planlanan bu tez kapsamında, bölge florasında yer alan ve yukarıda özelliklerinden bahsedilen bitkilerin çeşitli organlarından (çiçek, yaprak ve meyve gibi) hazırlanan özütlerde model olarak kullanılan *E. coli* bakteriyal replikatif polimerazIII α (DnaE)'e yönelik inhibisyon etki olup olmadığı ve inhibisyon etkili bitki organlarında major bitki bileşenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar, Enzimler, Besiyeri ve Vektörler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar: Bovine serum albumin (BSA) (Sigma), dithiothreitol (DTT) (Fisher scientific), β -merkaptoetanol (Sigma), agaroz (Sigma), akrilamid (Merck), bisakrilamid (Amresco), amonyum persülfat (Sigma), asetik asit (Sigma), gliserol (Sigma), glisin (Merck), glukoz (Merck), dNTP (Fermentas), brom fenol mavisi (BioRad), coomassie brilliant blue R 250 (BioRad), etidyum bromür (BioRad), ampisilin (Sigma), izopropanol, metanol (J.T. Baker), etanol (Merck), N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamin (TEMED) (BioRad), üre (Merck), borik asit (Merck), nonidet P40 (Sigma), SDS (Merck), NaCl (Fluka), KCl (Merck), MgCl₂ (Merck), Tris (Merck), EDTA (Merck), agar (Merck).

Çalışma kapsamında kullanılan enzimler: Lizozim (Fermentas), RNaseA (Fermentas), High Fidelity *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), T4 DNA ligaz (Fermentas).

Çalışmada kullanılan LB besiyerleri Maniatis ve arkadaşlarına göre (1989) hazırlandı. LB (Lauria-Bertain) besiyeri 5 g maya özütü, 10 g tripton ve 5 g NaCl 1 litre suda çözülerek hazırlandı. LBA ise 1 litre LB besiyerine 15 g agar ilavesi ile hazırlanmıştır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve kullanıldı.

Çalışmalarda vektör olarak Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen) kullanıldı.

2.2. *Escherichia coli* Replikatif DNA PolimerazIII α Proteininin (*DnaE*) Rekombinant Üretilmesi

2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Escherichia coli hücreleri -80°C' de gliserolden alınıp 3 mL LB sıvı besiyerinde gece kültürü yapıldı. 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 13.000 rpm'de 2 dakika

boyunca santifüj edildi. Üst faz atıldı ve GF-1 Genomik DNA İzolasyon (Vivantis) kitine göre DNA izolasyonu yapıldı.

2.2.2. *E. coli dnaE* Geninin PZR İle Çoğaltılması

E.coli DnaE-F_5'-CACCATGTCTGAACCACGTTTCGTACACC-3' ve *E.coli DnaE-R_5'*-TTAGTCAAACCTCCAGTTCCACCTGC-3' primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu 50 µL hacimde 1X *Taq* polimeraz tampon, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM her bir dNTP, 300 ng her bir primer, 3 µL *E. coli* genomik DNA ve 2 ünite High Fidelity *Taq* polimeraz kullanılarak yapıldı.

1. Ön denatürasyon	94°C'de	3 dakika
2. Ayrılma	94°C'de	45 saniye
3. Primer bağlanma	55°C'de	1 dakika
4. Sentez	72°C'de	8 dakika
5. Son sentez	72°C'de	10 dakika

2-4. basamaklar 24 kez tekrar edildi. PZR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.2.3. *E. coli dnaE* Geninin TOPO100 Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

PZR ürünü GF-1 Clean-up kiti kullanılarak temizlendi. Daha sonra Invitrogen pET-100 TOPO kitine göre şartlar belirlenip gece boyu 16°C'de ligasyon yapıldı. Ligasyon ürünü ampisilin içeren LBA besiyerine transforme edildi. 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petride oluşan kolonilerden belli sayıda seçilerek 3 mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerlerine ekimi gerçekleştirilip 37°C'de 16 saat boyunca gece kültürü yapıldı ve kültürler 13000 rpm' de 1 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Plazmit izolasyonu yapıldı.

2.2.4. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonunda aşağıda solusyon II diye adlandırılan çözelti günlük olarak hazırlandı.

1. Solusyon I: 50 mM glukoz, 25 mM Tris-HCl (pH:8.0), 10 mM EDTA (pH:8.0), 4 mg lizozim
2. Solusyon II: 0,2 NaOH, %1 SDS
 - Transformasyon işlemi sonucu olarak seçilip büyütülen saf koloni mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 13.000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüj edildi.
 - Solusyon I’den 200 µL eklendi ve vortekslendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
 - Solusyon II’den 400 µL eklendi, hafifçe alt üst edildi. 5 dk buzda bekletildi.
 - 300 µL amonyum asetat eklendi, alt üst edildi. 10 dk buzda bekletildi.
 - 11000 rpm’de 15 dk çöktürüldü.
 - İçerisinde 100-700 µL izopropanol bulunan mikrosantrifüj tüpüne çöktürülme işlemi yapılmış tüpün süpernatantından 600 µL konuldu.
 - 1-2 dk da bir alt üst edilerek 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
 - 13.000 rpm’de 15 dk çöktürülür ve üst faz döküldü.
 - Pellet üzerine 500 µL %70’lik soğuk EtOH ilave edilir ve 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
 - Üst faz dökülür ve 37°C de kurutularak dipteki sıvının uçması sağlandı.
 - Kurutma işleminden sonra pellet 60 µL RNase içeren TE tamponda çözüldü.
 - %1’lik agaroz jelde gen içermeyen TOPO® vektörü kontrol olarak kullanılarak yürütme işlemi yapıldı ve klonların doğruluğu belirlendi.

2.2.5. *E. coli dnaE* Genini ORF Şeklinde Klonlandığının Baz Dizin Analizi İle Doğrulanması

Doğruluğu belirlenen klonların yeniden gece kültürü yapıldı ve 14000 rpm’ de 2 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Elde edilen pelletler Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (ABD) kullanılarak plazmit DNA purifikasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitler MacroGen-Europe (Hollanda) şirketine gönderilerek sekans analizi yaptırıldı.

2.2.6. Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi

DNA baz dizin analizi için Macrogen' e gönderilen örneklerin sonuçları Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) ve Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programları kullanılarak değerlendirildi.

2.2.7. *E. coli* BL21 Hücrelerinde Ekspresyonun Gösterilmesi

Rekombinant olduğu belirlenen plazmitlerden ekspresyon için *E.coli* BL21 (DE3) Lys hücrelerine transforme edildi. Petrilerden birer koloni seçilerek ekspresyon için kullanıldı. Ekspresyon basamakları:

- Ekspresyon için seçilen tek bir koloni, 5 mL 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerinde 37 °C'de gece kültürü yapıldı ve daha sonra 0.1 OD olacak şekilde ampisilin içeren 200 mL' lik LB besiyerine yeniden ekildi ve 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildi.
- Hücre yoğunluğu 0.6 OD'ye ulaştığında son hacim 0.1 mM olacak şekilde IPTG (izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozit) ile indüklendi ve 3 saat 30 dk inkübasyona devam edildi.
- İnkübasyon sonrası hücre kültürü 5 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 6500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine; 50 mM Tris (pH: 7,4), 500 mM NaCl, 2 mM DTT ile hazırlanan tampon eklenerek çözülmesi sağlandı. Daha sonra 20 mg/mL lizozim eklendi. 30 dk buzda bekletildikten sonra sonikatör yardımıyla hücrelerin patlatılması sağlandı.
- Sonikatör sonrasında 20 dk 8000 rpm' de soğutmalı santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı alındı. %8' lik SDS-PAGE' de yürütülerek proteinin büyüklüğü doğrulandı.

2.2.8. Rekombinant Üretilen Proteinin Analizi

Ekspresyon sonrası elde edilen süpernatantlardaki proteini görebilmek için %8' lik SDS jel hazırlandı. Süpernatantlardan 30 µL, yürütme boyasından 10 µL olmak üzere mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 95°C' de 5 dk boyunca ısı işlemine tabi tutuldu.

Tablo 3’ de belirtilen 10X yürütme tamponu 1X olacak şekilde sulandırılarak yürütme işleminde kullanıldı.

Tablo 3. SDS – PAGE’ de kullanılan malzemeler.

SDS - PAGE Yürütme Boyası	10X SDS - PAGE Yürütme Tamponu	SDS – PAGE Jel Boyası
- 1 M Tris pH:6,8	- 72 g glisin	- 250 ml metanol
- %10 SDS	- 15 g Tris - Base	- 50 ml asetik asit
- Gliserol	- 50 ml SDS	- 0,625 g Coomassie
- 2- β -Merkaptoetanol		Brillant Blue R-250
- Bromofenol Blue		(CBB)

2.2.9. Rekombinant Proteinin Safaştırılması

Protein safaştırmada nikel kolon kullanıldı. Safaştırma işlemi 4°C soğuk odada yapıldı. Safaştırma boyunca kullanılan tamponlar Tablo 4’ de verilmiştir.

Tablo 4. Safaştırmada kullanılan tüm çözeltiler.

Kolon Temizleme	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	500 mM İmidazol
Kolon Dengeleme	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
Yıkama 1	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	25 mM İmidazol
Yıkama 2	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	100 mM İmidazol
Bağlanma	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	300 mM İmidazol

Kolon öncelikle 10 mL 500 mM imidazollü çözelti ile iyice temizlendi ve daha sonra 10 mL pellet çözme tamponu ile dengeye getirildi. Kolondan proteinin süpernatantı geçirildi ve altta fraksiyon toplandı. Tekrar pellet çözme tamponundan 10 mL kolondan geçirildi fraksiyon toplandı. Yıkama 1 tamponu olan 25 mM imidazollü çözeltiden 20 mL kolondan geçirildi fraksiyonu alındı. 100 mM imidazol içeren ikinci yıkama tamponunda 5 mL kolondan geçirildi ve toplandı. Son basamak saf proteini almak için 300 mM imidazollü tampon kolondan ard arda üç kez geçirilerek her bir fraksiyondan 4 mL toplandı ve saflaştırma işlemi sonlandırıldı.

Her bir fraksiyon %8' lik SDS-PAGE' de marker ile yürütülüp proteinin saflığına bakıldı.

2.2.10. Saf Proteine Diyaliz Uygulanması

SDS-PAGE sonrası 300 mM imidazollü çözeltinin kolondan geçirilmesiyle elde edilen saf protein diyaliz tüpüne alındı. 50 mM Tris (pH:7,4), 50 mM NaCl, 1 mM DTT içeren 2 litre çözeltide gece boyu bekletilerek diyaliz edildi. Bu diyaliz sonrası yeniden aynı konsantrasyonda tekrar diyaliz edildi. Diyaliz sonrası %10 gliserol eklenerek protein -20°C' de saklandı.

2.3. Rekombinant Enzimin Aktivitesinin Gösterilmesi

2.3.1. Enzim Aktivite Deneylerinde Kullanılan Tamponlar

Üretilen proteinin aktivitesini görmek için; jelin hazırlanması, deneyin yapımı ve deneyin sonlandırılmasında kullanılan çözeltiler Tablo 5' te verilmiştir.

Tablo 5. Enzim aktivite deneylerinde kullanılan bütün çözeltiler.

5X TBE Tamponu (1 L)	10X Annealing Tamponu
54 g Tris-Base	500mM Tris-HCl (pH:7,8)
27,5g Borik Asit	1M KCl
3,36 g Na ₂ .EDTA	
20X Polimeraz Aktivite Tamponu	%40 Akrilamid
10µL HEPES (pH:7,5) (1,5 M)	38g Akrilamid
2 µL Nonident P40	2g BisAkrilamid
2 µL BSA (100X)	
2 µL DTT (1 M)	
4 µL dH ₂ O	
2X Sonlandırma Boyası	
% 95 formamide, % 0,05 bromophenolblue, % 0,05 ksilen siyanol, 20 mM EDTA pH:8,0	

2.3.2. Sentetik DNA Substratının Hazırlanması

DNA polimerizasyon sentetik DNA kullanıldı. 5'- ucundan Cy5 ile işaretli primerin hibridize olduğu sentetik çift zincir DNA substrat olarak kullanıldı (sentez ürünlerinin takibi için primer 5'-ucundan florojenik 5'Cy5 ile işaretli olarak temin edildi). Sentetik oligonükleotit karışımları 1X annealing tamponu varlığında (10X Annealing Tampon: 500 mM Tris-HCl /pH: 7,8 ve 1000 mM KCl) 2 (kalıp DNA): 1 (primer DNA) oranlarında karıştırılarak, çift zincir DNA substratları hazırlandı. Her bir reaksiyon karışımı ısıtıcıda 95°C'de 5 dakika bekletilerek var olan tüm spesifik olmayan eşleşmelerin erimesi sağlandı. Sonra yavaş yavaş soğutularak kalıp zincir ile primerin hibridize olması sağlandı.

45/20-mer sentetik DNA kalıbı

3' - GCAATCGGTGAGGCTCACACTCGACTGAAGTACGACAGCCACTAG - 5'

5' - CGTTAGCCACTCCGAGTGTG - 3'

Şekil 17. Primer uzama deneylerinde kullanılan ve primerin 5'-ucundan Cy5 ile florojenik işaretli olduğu çift zincir sentetik DNA substratı.

2.3.4. Primer Uzatma Deneyi ile Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi

Enzim aktivite deneyinde iki ayrı reaksiyon bileşeni kullanıldı. Öncelikle birinci bileşen hazırlandı. Bileşen 1 ayrı ayrı deney tüplerine konularak üzerlerine 1µL aktivitesine bakılacak enzim ilave edildi. Daha sonra ikinci reaksiyon bileşeni hazırlandı ve bu bileşen ile deney başlatıldı. Deney süresi 1 ve 10 dk olmak üzere iki ayrı sürede yapılan deneyler bu süreler boyunca 30°C su banyosunda bekletildi ve sırasıyla 10 µL 2X sonlandırma boyası ile deneyler sonlandırıldı. Her bir deneyde hem metanol hemde su kullanılarak kontroller yapıldı. Son olarak 95°C’de 5 dk ısı muamelesi yapıldı ve yürütme işlemi yapılanaya kadar örnekler 4°C’de saklandı.

Bileşen 1: 1µL PAB; 0,5 µL DNA (1 P:2 K); 4,75 dH₂O

Bileşen 2: 2 µL MgCl₂ (50mM); 0,75 µL dNTP (4mM)

2.3.5. Üre-PAGE Jelinin Hazırlanması

48 g üre tartıldı, üzerine 20 mL 5X TBE tamponundan ve 40 mL %40 akrilamid eklenerek ısıtıcıda karıştırılarak çözüldü. Filtre kağıdı ile süzme işlemi sağlandıktan sonra son hacim 100 mL’ ye tamamlandı. %10 APS ve TEMED eklenerek jelin hazırlanması tamamlandı. Donması beklenildi.

2.3.6. Üre-PAGE’ de Örneklerin Yürütülmesi

Donan jel yürütme sistemine yerleştirildi. 5X TBE, 1X olacak şekilde sulandırıldı ve sisteme ilave edildi. Kuyucuklar enjektör yardımıyla temizlendi. Her bir örnekten 6 µL jele yüklendi ve 1350 V’ da 2,5 saat yürütme yapıldı. Yürütme sonrasında örnekler Typhoon FLA9500 cihazında görüntüldü.

2.4. Metanolün *E. coli* DnaE Protein Aktivitesine Etkisinin Araştırılması

Çözücü olarak metanolün enzim aktivitesine etkisi araştırılırken deneylerde yukarıda anlatıldığı gibi aynı şekilde deney karışımları hazırlandı. %20 ve %35 oranlarında olmak üzere iki ayrı konsantrasyon olmak üzere metanol hazırlandı.

Metanolün aktiviteye etkisi bakılacağından dolayı enzim içeren reaksiyon bileşenine 1 µL metanol eklenerek deneyler başlatıldı. 30°C sıcaklıkta 1dk ve 10 dk olmak üzere iki ayrı sürede bekletildikten sonra 2X sonlandırma boyası ile sonlandırılarak deneyler tamamlandı.

2.5. Bitkilerin Çiçek ve Meyve Özütlerinde DnaE İnhibisyonunun Araştırılması

2.5.1. Bitkilerin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan bitkilerin tümü Rize ilinin Çamlıhemşin, Güneysu ve Ardeşen ilçelerinden temin edilmiştir. Bitkilerin nereden, ne zaman, ne kadar yükseklikten alındığı gibi bilgiler Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan bitki türlerinin teminindeki ayrıntılar.

Bitkinin Adı	Bulunduğu Yer	Rakım	Tarih	Mekan
<i>Rosa canina</i>	Hisarcık-Sıralar	1670m	28.06.2014	Çalılık yamaçlar
<i>Thymus praecox</i>	Verçenik dağı	2350m	16.07.2014	Kayalık yamaçlar
<i>Thymus serpyllum</i>	Çağrankaya yaylası	1800m	22.07.2014	Kayalık yamaçlar
<i>Malva sylvestris</i>	Ortayayla	2000m	27.07.2014	Yol kenarı, çayırliklar
<i>Hyoscyamus niger</i>	Sıralar altı	1800m	04.06.2014	Yol kenarı, çayırliklar
<i>Frangula alnus</i>	Handüzü-Arapdüzü arası	900m	12.07.2014	Yol kenarı, ormanlık alanlar
<i>Sorbus aucuparia</i>	Ortayayla	2000m	27.07.2014	Dere kenarı, çalılık
<i>Sorbus caucasica</i>	Hisarcık-Sıralar	1650m	13.09.2015	Dere kenarı, çalılık
<i>Sorbus umbellate</i>	Hisarcık-Sıralar	1650m	23.09.2015	Yol kenarları
<i>Vitis vinifera</i>	Fırtına deresi ağzı	10m	18.06.2014	Yol kenarı
<i>Ziziphora clinopodioides</i>	Handüzü-Arapdüzü arası	850m	12.07.2014	Çayırlik alanlar

2.5.2. Özütlerin Hazırlanması

11 bitkiden ve çeşitli organlarından alınan taze örnekler blender ile toz haline getirildi. 5 g bitki dokusu 20 mL metanol içerisinde oda şartlarında 2 saat süre ile ultrasonik banyoya tabi tutuldu. Elde edilen ilk özütün tamamı 50 mL falkon tüpe

aktarılarak, 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst faz yeni bir falkon tüpe aktarıldı. Özütleme sonrası geri kalan pellet iki kez 5 mL metanol ile aynı koşullarda özütlemeye tabi tutuldu. Tüm metanol özütleri birleştirilerek toplam özüt, hız vakum konsantratöründe 5 mL hacme konsantre edildi. 5 mL özüt ikiye bölünerek yarısı 4 °C'de ve diğer yarısı -20 °C'de saklandı. Her bir özütün 1 µL' si polimeraz aktivite deneylerinde kullanılarak inhibisyon özelliğine bakıldı.

2.5.3. Bitki Özütlerinde İnhibisyonun Araştırılması

İnhibisyon deneylerinde iki ayrı reaksiyon bileşeni kullanıldı. Öncelikle birinci bileşen hazırlandı ve tüplere aktarıldı üzerine 1 µL inhibisyon bakılacak özüt örneklerinden ilave edildi. Daha sonra ikinci bileşen hazırlanarak deney başlatıldı. Deney süresi 10 dk olmak üzere 30°C su banyosunda bekletildi ve sırasıyla 10 µL 2X sonlandırma boyası ile deneyler sonlandırıldı. Son olarak 95°C'de 5 dk ısı muamelesi yapıldı ve Üre - PAGE' de yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Bileşen 1: 1 µL PAB; 0,5 µL DNA (25/40); 1 µL *E. coli* DnaE; 4,75 dH₂O.

Bileşen 2: 2 µL MgCl₂ (50mM); 0,75 µL dNTP (4mM).

2.6. Antimikrobiyal Aktivite

Özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri olup olmadığının belirlenmesi için agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı. Antimikrobiyal aktivite bakılırken özütlerin DMSO' da hazırlanmış özütleri kullanıldı (Perez vd., 1990; Ahmad vd., 1998).

2.6.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden Mueller-Hinton sıvı besiyeri içinde (MH) (Difco, Detroit, MI), yaklaşık olarak Mac Farland 0,5 bulanıklıkta olacak şekilde (10^{6-7} koloni oluşturan birim (kob/mL)) sulandırmaları hazırlandı. Önceden hazırlanmış Mueller Hinton Agar besiyeri üzerine steril pamuklu çubuk yardımıyla yayma ekimleri yapıldı.

Anti tüberküloz aktivite için (*M. smegmatis*'e karşı etkinlik) ise Brain heart infusion agar (BHIA) besiyerinde yapılan 2-3 günlük *M. smegmatis* kültüründen 5 mL Brain heart infusion (BHI) sıvı besiyerine alınan 3-4 öze dolusu koloniler çam boncuk yardımıyla süspansiyona edildi. Bu süspansiyondan Mac Farland 0.5 bulanıklıkta (10^{6-7} kob/mL) sulandırmaları hazırlandı. Önceden hazırlanmış BHIA besiyeri üzerine steril pamuklu çubuk yardımıyla yayma ekimleri yapıldı.

Mayalar için maya ekstreli sıvı besiyeri (YEG) (Difco, Detroit, MI) kullanılarak Mac Farland 2 (10^{7-8} kob/mL) sulandırmaları yapılarak ve önceden hazırlanmış Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, Detroit, MI) besiyerleri üzerine steril pamuklu çubuk yardımıyla ekimleri yapıldı.

Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa bitki stok özütlerinden 50 µL damlatıldı. Bakteri ihtiva eden petripler 24 saat, *M. smegmatis* ihtiva eden petripler ile maya ihtiva eden petripler 48 saat 36 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zon çapları ölçüldü. Standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), *M. smegmatis* için Streptomisin (10 µg), mayalar için flukonazol (5 µg) ve standart çözücü kontrolü olarak DMSO kullanıldı.

2.7. *Rosa canina* Güllerinin ve Meyvelerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD İle Aydınlatılması

Bu çalışmada bakteriyel replikatif DNA inhibisyonunun yanında *Rosa canina*'nın soluk pembe renkli güllerinin fenolik bileşikleri HPLC-DAD ile aydınlatıldı.

Bitkinin taze gülleri ve meyveleri blender ile öğütüldü ve 85 g gül tartılarak 200 mL metanol ile ve 11,69 g meyve 100 mL metanol ile 25°C'de karıştırıcıda 2 saatte elde edilen özüt mavi bant süzgeç kağıdı ile süzüldü. Gülün geri kalan posa kısımları 50 mL metanol ile meyve ise 60 mL metanol ile 10 dk karıştırıcıda tekrar ekstrakte edildi ve süzüldü. Direkt metanol özütlerinin HPLC-DAD analizleri ve DNA polimeraz inhibisyonu için gül özütünün 40 mL'sinin çözücüsü evaporatörde uçurularak 1 mL metanol ile çözüldü (Çiçek metanol (ÇM): 148,3 mg/mL) ve meyve özütünün 25

mL'sinin çözücüsü uçurularak 1,5 mL metanol ile çözülerek (Meyve metanol (MM); 108,3 mg/mL) kullanıldı.

Asidik hidroliz: Özütlerdeki fenolik asitler ve flavonoidlerin kendi aralarında bağ yaparak oluşturdukları türevlerinin ve şeker gruplarının kırılarak çekirdek yapının belirlenmesi amacıyla asidik hidroliz uygulandı. Gülün çiçeğinin asidik hidrolizi için 700 µL metanollü kısma (ÇM: 148,3 mg/mL), 700 µL 4N HCl eklenerek 2 saat 100°C' de hidroliz edildi. Meyvenin metanol özütünden 65 mL (6,49 mg/mL) alınıp çözücüsü uçurularak 5 mL metanol ve 5 mL 4N HCl eklendi ve gül ile aynı şekilde asidik hidrolize tabi tutuldu. Hidroliz edilen kısımlar 3x3 mL dietil eter ve 3x3 mL etil asetat ile ekstrakte edildi. Organik fraksiyonlar yani dietil eter ve etil asetat fraksiyonları birleştirildi ve hem organik hem sulu fraksiyonların çözücülerini uçuruldu. Gülün organik (RHO) ve sulu fraksiyonu (RHS) 500 µL metanolde çözüldü (RHO: 77,0; RHS: 112,0 mg/mL), meyvenin organik fraksiyonu 1 mL metanolde (MHO: 88,1 mg/mL) ve sulu fraksiyonu 1,5 mL metanolde (MHS; 401,1 mg/mL) çözülerek HPLC-DAD analizleri yapıldı.

Gül özütünün geri kalan 220 mL'sinin ve meyvenin kalan 65 mL'sinin çözücüsü evaporatörde uçuruldu ve suyla çözülerek sırasıyla hekzan, dietileter, etil asetat ve bütanol ile sıvı-sıvı özütlemeye işleme tabi tutuldu. Kalan sulu kısım ile organik kısımların çözücülerini uçurularak gülün fraksiyonları 1 mL metanol ile çözüldü (sadece hekzan 1,5 mL ile çözüldü) ve konsantrasyonları sırasıyla, hekzan: 49,47; dietileter: 42,3; etilasetat: 55,2; bütanol: 483,8 ve su: 240,5 mg/mL idi. Meyvenin fraksiyonlarından sulu 1,5 mL diğer organik fraksiyonlar 500 µL metanol ile çözüldü ve konsantrasyonları sırasıyla, hekzan: 99,8; dietileter: 77,2; etilasetat: 49,8; bütanol: 108,4 ve su: 268,8 mg/mL idi. Bu kısımlarında HPLC-DAD analizleri yapıldı.

Analizler Diyot Array dedektör (DAD) ile donanımlı Dionex Ultimate 3000 HPLC (Thermo scientific, Germering, Germany) sisteminde yapıldı. Sistem Chromeleon program ile kontrol edildi. Tüm analizler için Agilent PLRP-S C18 (150 mm × 4,6 mm i.d., 5µm pd., 100 Å) kolonu kullanıldı. Ayrıca ön kolon olarak kolonla uyumlu Macherey Nagel (iç çap 3mm) kullanıldı. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) %70 asetonitril-su çözeltileri kullanıldı. Elüsyonda takip eden

gradyent kullanıldı; 0-3 dk %5,5 B; 3-10 dk %5,5-23 B; 10-20 dk %23-31 B; 20-30 dk %31-56 B; 30-40 dk %56-85 B; 40-45 dk %85-5,5 B; 45-60 dk %5,5 B. Akış hızı 1 mL.dk⁻¹ ve enjeksiyon hacmi 10 µL idi. Kolon sıcaklığı 30 °C ve örnek saklama sıcaklığı 18 °C idi. Dedektör 254, 280, 315 ve 370 nm’de kromatogram alacak şekilde 200-400 nm aralığında çalıştırıldı.

Çalışmada 19 adet fenolik bileşik standardı kullanıldı. Bu standartlar: Gallik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, p-hidroksi benzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, ellacik asit, rutin, sirincik asit, mirisetin, fisetin, kuersetin, apigenin, kaemferol ve isoramnetin, paenol ve timol’dü. Stok çözeltiler metanolde hazırlandı ve kalibrasyon grafiklerini belirlemek amacıyla ana stok çözeltilerinden %56’lık metanolle seyreltme koşuluyla 19 adet standardın 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1 0,5 ve 0,25 mg/L’lik karışımları hazırlandı. Tekrarlanabilirlik ve dedeksiyon limitlerinin hesaplanması amacıyla 0,5 ppm karışım 7 tekrarlı olarak yürütüldü.

2.8. *Sorbus* Türlerinde Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması

Özütleme prosedürü, HPLC-UV ile bileşenlerin net kromatogramının elde edilmesi ve dolayısıyla bileşenlerin kolay şekilde tanımlanabilmesi açısından detaylı bir şekilde yapıldı. *S. caucasica* ve *S. aucuparia* bitkilerinin 10 g meyve ve yaprak dokularından alınan taze örnekler blender ile toz haline getirildi. 28°C’ de 100 mL metanolde 2 saat boyunca özütleme işlemine tabi tutuldu. Özütler 4°C’ de 4000 rpm’ de 20 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatantlar yeni bir falkon tüpüne transfer edildi ve özütün 10 mL’ si kuruyana kadar evapore edildi (EZ-2 Evaporator, GeneVac). Kuru özütler 2 mL metanolde çözüldü ve HPLC-DAD analizi yapıldı (metanol özütü). Geri kalan özütler kuruyana kadar evapore edildi ve sıvı-sıvı seçimli özütleme için 100 mL suda çözüldü. İki kez 10 mL hekzan, iki kez 10 mL dietil eter ve iki kez 10 mL etil asetat ile fraksiyonlarına ayrıldı. Hekzan fraksiyonu kullanılmadı. Dietileter ve etilasetat fraksiyonları aynı deney tüpünde birleştirildi. Bunlar evapore edildi ve HPLC-DAD analizi öncesinde 1 mL metanol ile çözüldü (organik kısım). Geri kalan sulu kısım kuruyana kadar evapore edildi ve 5 mL metanol ile çözümlenerek HPLC-DAD analizi yapıldı (sulu kısım).

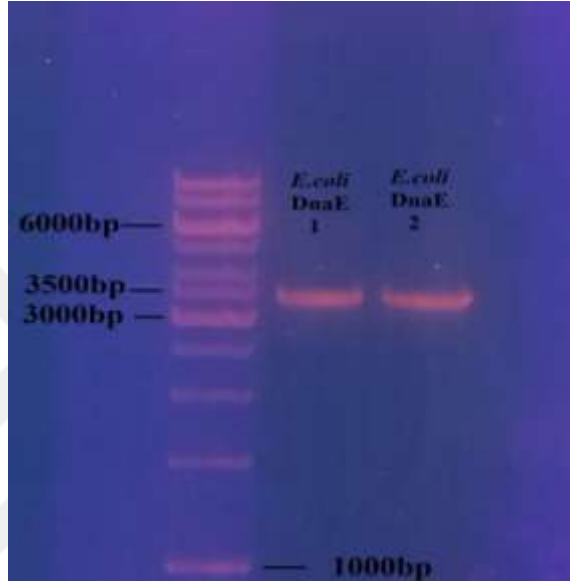
Analizler Diyot Array dedektör (DAD) ile donanımlı Dionex Ultimate 3000 HPLC (Thermo scientific, Germering, Germany) sisteminde yapıldı. Sistem Chromeleon program ile kontrol edildi. Tüm analizler için Agilent PLRP-S C18 (150 mm × 4,6 mm i.d., 5µm pd., 100 Å) kolonu kullanıldı. Ayrıca ön kolon olarak kolonla uyumlu Macherey Nagel (iç çap 3mm) kullanıldı. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) %70 asetonitril-su çözeltileri kullanıldı. Elüsyonda takip eden gradiyent kullanıldı; 0-3 dk %5,5 B; 3-10 dk %5,5-23 B; 10-20 dk %23-31 B; 20-30 dk %31-56 B; 30-40 dk %56-85 B; 40-45 dk %85-5,5 B; 45-60 dk %5,5 B. Akış hızı 1 mL.dk⁻¹ ve enjeksiyon hacmi 10 µL idi. Kolon sıcaklığı 30 °C ve örnek saklama sıcaklığı 18 °C idi. Dedektör 254, 280, 315 ve 370 nm'de kromatogram alacak şekilde 200-400 nm aralığında çalıştırıldı.

Gallik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, p-OH benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sirincik asit ve timol 50:50 su-metanolde 1000 µg/mL hazırlandı. Ellagik asit, rutin, kuersetin, apigenin ve kaemferol 1000 µg/mL metanolde; mirisetin, fisetin 2000 µg/mL ve isorhamnetin 250 µg/mL metanolde; paeonol 833 µg/mL 1 mL metanol ile 1 M NaOH' da hazırlandı.

3. BULGULAR

3.1. *E. coli dnaE* Geninin oğaltılması

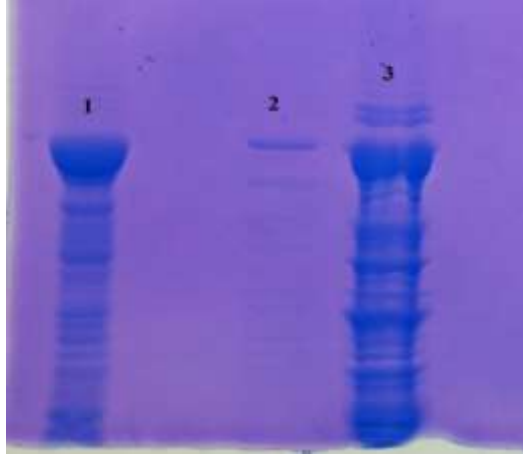
İki kontrollü olarak çoğaltılan *E.coli dnaE* geni PZR sonrası %1'lik agaroz jel hazırlanıp Marker (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder) ile yürütüldü.



Şekil 18. PZR sonrası *E.coli dnaE* geninin markır ile agaroz jelde yürütülmesi.

3.2. Protein İndüklenmesi

0,1 M IPTG ile 3 saat boyunca indüklenen proteinler %8' lik SDS – PAGE' de yürütüldü. Hücrelerin patlatılmasından sonra yapılan santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant ve pellet kontrol protein eşliğinde yürütüldü. Şekil 19' da 1 ile numaralandırılan örnek *E. coli* DnaE proteinin pelleti olup sırasıyla kontrol enzim ve süpernatant kısımları gösterilmiştir.



Şekil 19. *E. coli* DnaE proteinine ait pellet ve süpernatantın jelde gösterilmesi.

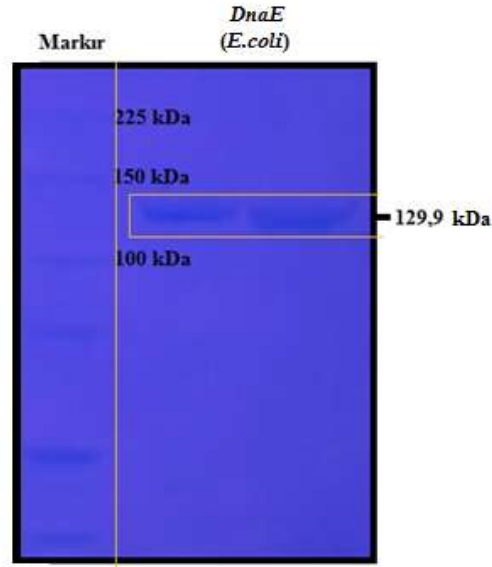
3.3. Protein Saflaştırılması

Protein saflaştırma sonucunda toplanan her bir fraksiyon %8' lik SDS-PAGE' de yürütüldü. Bir numara olarak adlandırılan örnek PolIII α ' nın indüklenme sonucunda elde edilen süpernatant olup kontrol amaçlı kullanıldı. İki numara süpernatantın kolondan geçirilmesiyle elde edildi. Üç numara 25 mM imidazollü tampondan sonra elde edilen fraksiyondur. Dördüncü ve 5. numaralar 100 mM imidazollü tamponun kolondan geçirilmesiyle toplanan fraksiyon olup yıkama işleminin başarılı olduğu görülmektedir (Şekil 20). Altı, 7 ve 8. numaralarla adlandırılan örnekler 300 mM imidazol içeren tamponun kolondan geçirilmesiyle elde edilmiş olup *E. coli* DnaE proteinini gösterir. Şekil 20' da görüldüğü üzere konsantrasyon ve saflığa göre 7 numaralı örneğin diyalizi yapıldı.



Şekil 20. *E.coli* DnaE enziminin saflaştırılması sonucunda her bir fraksiyonun ayrı ayrı gösterilmesi.

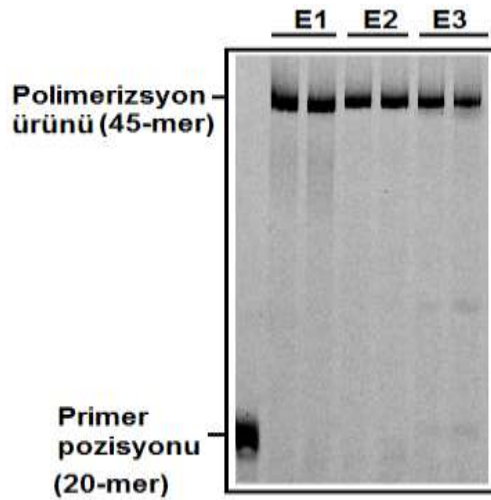
Ayrıca bu protein markır (New England Biolabs) ile yürütölüp doğruluğu gösterildi. *E. coli* DnaE proteini 129,9 kDa' dur (Şekil 21).



Şekil 21. Saflaştırılan *E. coli* DnaE proteinin markırıla birlikte SDS-PAGE' de gösterilmesi.

3.4. Saflaştırılan DnaE Proteinin Aktivitesinin Gösterilmesi

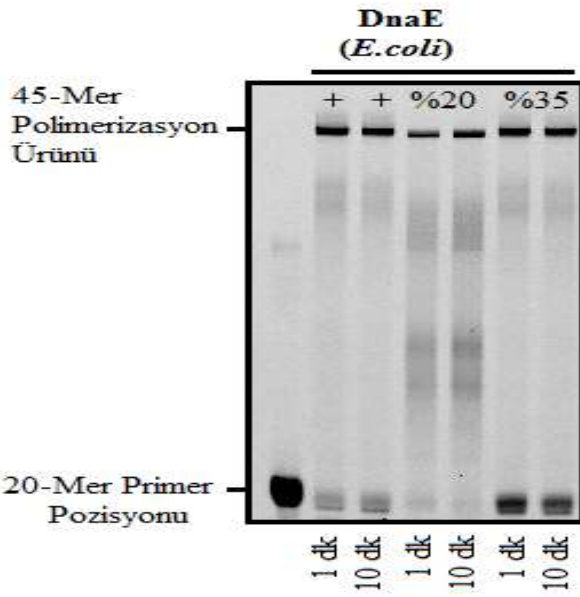
Saflaştırılması yapılan *E. coli* DnaE proteininin 1'er µL kullanılarak yapılan aktivite deneyleri sonucunda üretilen üç ayrı enzimin de 20-mer primer pozisyonundan 45-mer pozisyonuna ürün oluşturmaları ile aktif oldukları gösterildi (Şekil 22).



Şekil 22. Saflaştırılan *E. coli* DnaE proteinin aktivitesinin Üre-PAGE' de gösterilmesi.

3.4.1. Metanolün DnaE proteini Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

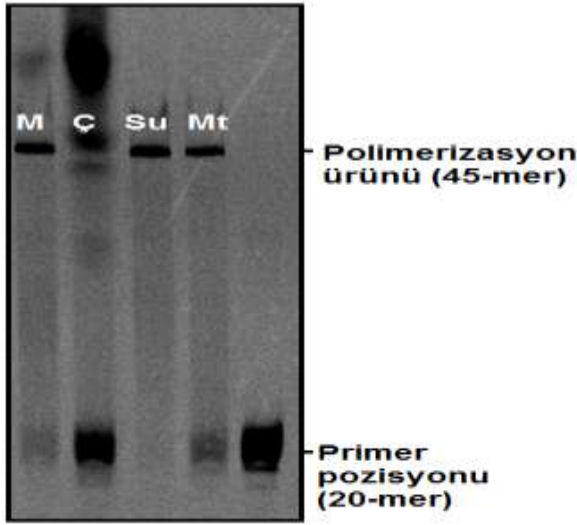
Özütleme işleminde çözücü olarak kullanılan metanolün *E. coli* DnaE proteininin aktivitesine etkisinin olup olmadığına bakılmak üzere %20 ve %35' lik metanol hazırlandı. 1 dk ve 10 dk olmak üzere iki süreli deney yapıldı. Typhoon FLA9500 cihazında görüntülendi. Şekil 23' de görüldüğü gibi 20-mer pozisyondan 45-mer pozisyonuna ürün oluşturması ile %35' lik metanol konsantrasyonunda dahi enzim aktivitesinin metanolden etkilenmediği belirlendi.



Şekil 23. Metanolün *E. coli* DnaE proteinine etkisinin gösterilmesi.

3.5. *Rosa canina* Bitkisinin Meyve ve Çiçek Özütlerinin DnaE Üzerine İnhibisyon Etkileri

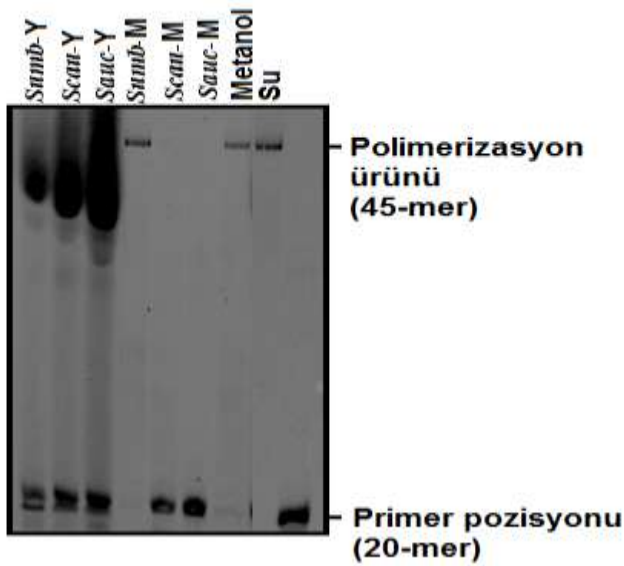
Rosa canina (*R. canina*) bitkisine ait meyve ve çiçek özütlerinden 1 µL alınıp yapılan inhibisyon deneylerinin sonucu Şekil 24' te verilmiştir. Buna göre *R. canina* çiçek (*R. canÇ*) çiçek özütlerinin DnaE üzerinde güçlü inhibisyon gösterdiği, *R. canina* meyve (*R. canM*) olarak adlandırılan meyve özütlerinin ise inhibisyon göstermediği sonucuna varıldı.



Şekil 24. *Rosa canina* meyve (M) ve çiçek (Ç) özütlerinin *E. coli* DnaE üzerine etkisi.

3.6. *Sorbus* Türlerine Ait Meyve ve Yaprak Özütlerinin DnaE Üzerine İnhibisyon Etkileri

Sorbus türlerinin meyve ve yaprak kısımlarında inhibisyon bakıldığında *Sorbus caucasica* ve *Sorbus aucuparia* bitkilerinin meyve ve yaprak özütlerinin *E. coli* DnaE proteini üzerine inhibisyonu etkisi olduğu görülmektedir. *Sorbus umbellata* bitkisinin meyve kısmında inhibisyon görülmemekte olup yapraklarında zayıf inhibisyon vardır (Şekil 25).



Şekil 25. *Sorbus* türleri özütlerinin DnaE üzerine etkisinin gösterilmesi.

3.7. *Rosa canina* Güllerinin ve Meyvelerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması

Elde edilen kalibrasyon ve validasyon değerleri Tablo 6' da verilmiştir. Lineer kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir ($R^2 \approx 1$). Dedeksiyon limitleri bitki örneğinden doğal bileşikleri analizleri için yeterli seviyededir (Tablo 7). 19 standart *Rosa canina* bitkisinin çiçek ve meyve özütlerinde bakılmıştır.

Tablo 7. HPLC-DAD analizlerinin kalibrasyon ve validasyon değerleri.

Standartlar	RT	%BSS (RT)	%BSS (Alan)	*LOD	*LOQ	R ²	Kesim noktası	Eğim
1 Gallik asit	2,98	3,96	7,26	0,10	0,30	0,999	0,03	0,47
2 Protokatekuik asit	7,19	3,65	4,44	0,06	0,18	0,999	0,06	0,56
3 Klorojenik asit	11,02	0,50	1,79	0,02	0,07	0,999	-0,01	0,47
4 <i>p</i> -OH Benzoik asit	11,37	0,76	1,67	0,02	0,07	1,000	0,02	1,08
5 Kafeik asit	12,41	0,48	1,82	0,03	0,08	0,999	0,03	0,90
6 Vanilik asit	13,36	0,39	1,76	0,02	0,07	0,999	0,01	0,52
7 Sirincik asit	13,73	0,33	0,35	0,01	0,02	0,999	-0,09	0,52
8 Rutin	15,07	0,14	2,82	0,04	0,12	0,999	-0,02	0,23
9 Ellagik asit	15,26	0,19	1,51	0,02	0,06	0,999	-0,14	1,29
10 <i>p</i> -Kumarik asit	16,33	0,26	1,28	0,02	0,06	1,000	-0,02	1,27
11 Ferulik asit	18,72	0,18	2,12	0,03	0,09	0,999	0,06	0,88
12 Mirisetin	22,95	0,15	4,07	0,06	0,17	0,999	-0,13	0,59
13 Fisetin	23,63	0,10	4,47	0,04	0,12	0,999	-0,11	0,76
14 Kuersetin	28,12	0,05	1,39	0,08	0,24	1,000	-0,05	0,66
15 Apigenin	31,55	0,02	1,90	0,03	0,08	1,000	-0,01	0,29
16 Kaempferol	32,17	0,03	2,79	0,04	0,11	0,999	-0,05	0,65
17 Isorhamnetin	33,05	0,05	2,04	0,13	0,40	0,999	0,03	0,27
18 Paenol	38,81	0,01	2,20	0,02	0,07	0,999	-0,24	0,77
19 Timol	40,70	0,01	4,24	0,05	0,15	0,999	-0,16	1,22

*: mg.L⁻¹

Rosa canina bitkisinin meyvelerinin metanol özütlerinin, sıvı-sıvı seçimli özütleme sonucu elde edilen fraksiyonlarının (eter, etil asetat ve bütanol) ve asidik hidrolizinden sonraki organik (eter+etil asetat) faz ile sulu fazın fenolik bileşenlerinin HPLC-DAD ile analizi sonuçları Tablo 8’ de verilmiştir. Organik fraksiyonda diğerlerine göre daha yüksek miktarda vanilik asit ve ellagik asit bulunmaktadır (mg standart/g ekstrakt). Gallik asit ise sulu fazlar ve bütanollü fazda bulunmaktadır.

Tablo 8. *Rosa canina* bitkisinin meyve özütlerinde fenolik bileşiklerin gösterilmesi.

<i>Rosa canina</i> bitkisinin meyve özütlerinin asidik hidrolizi								
RT	Bileşikler	MeOH	Eter	Etil asetat	Bütanol	Su	Organik fraksiyon	Sulu fraksiyon
2,9	Gallik asit	Y	Y	Y	0,2	0,28	Y	0,27
11,3	<i>p</i> -OH benzoik asit	Y	0,04	Y	Y	Y	0,14	Y
13,3	Vanilik asit	Y	0,1	Y	Y	Y	1,14	Y
13,7	Sirincik asit	0,1	0,01	0,21	Y	0,01	0,03	0,01
15,2	Ellagik asit	0,09	0,16	0,36	Y	Y	0,62	0,02
16,3	<i>p</i> -Kumarik asit	Y	0,02	Y	Y	Y	Y	Y
33,0	İsorhamnetin	Y	Y	Y	Y	Y	0,4	Y

mg standart/g özüt. Y: Mevcut değil. RT: Alıkonma zamanı (dk).

Rosa canina bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ekstraktların HPLC-DAD analiz sonuçları Tablo 9’ da verilmiştir. Tabloya bakıldığında en yüksek miktarda bulunan bileşik etil asetat fraksiyonunda ellacik asit olduğu görülmektedir. Ellacik asit bütanol fazı hariç diğerlerinde bulunmaktadır. Ellacik asit bir gallik asit türevidir ve bütün fraksiyonlarda gallik asit gözlenmiştir.

Tablo 9. *Rosa canina* bitkisinin çiçek özütlerinde fenolik bileşiklerin gösterilmesi.

<i>Rosa canina</i> bitkisinin çiçek özütlerinin asidik hidrolizi								
RT	Bileşikler	MeOH	Eter	Etil asetat	Bütanol	Su	Organik fraksiyon	Sulu fraksiyon
2,9	Gallik asit	1,36	1,18	0,21	0,14	1,13	9,04	0,68
7,4	Protokatekhuik asit	Y	0,05	0,05	0,02	0,02	Y	Y
15,2	Ellacik asit	2,83	10,17	22,83	Y	1,03	17,03	0,65
28,1	Kuersetin	0,08	2,32	Y	0,01	0,01	0,04	Y
32,1	Kampferol	0,02	0,83	0,12	Y	Y	Y	Y
33,0	İsorhamnetin	Y	0,05	0,02	Y	Y	2,16	Y

mg standart/g özüt. Y: Mevcut değil. RT: Alıkonma zamanı (dk).

3.8. *Sorbus* Türlerinde Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması

Sorbus aucuparia (*S. aucuparia*) ve *Sorbus caucasica* (*S. caucasica*) bitkilerinin meyve ve yaprak özütlerinin metanol, organik (eter+etil asetat+bütanol) ve sulu faz olarak ayrılmış olup HPLC-DAD sonuçları Tablo 10 ve Tablo 11’ de verilmiştir. *Sorbus umbellata* (*S. umbellata*) *E. coli* DnaE proteini üzerine inhibisyon etki göstermediği için fenolik bileşenleri aydınlatılmadı. *S. aucuparia* ve *S. caucasica* özütlerinde ortak olarak klorojenik asit ve rutin tespit edildi. *S. aucuparia* özütlerinde kuersetin de gözlemlendi. Kromatogramlarda başlıca piklerin DAD ile elde edilen UV spektrumları incelendiğinde, klorojenik asit, rutin ve kuersetinin spektrumları ile benzer spektrumlara sahip oldukları gözlemlendi. Mevcut fenolik bileşik standartları ile bu bileşenlerin kesin tespiti mümkün olmasa da spektrumlarından faydalanarak başlıca pikler klorojenik asit, rutin ve kuersetinin türevleri olarak adlandırıldı. Burada klorojenik asit türevlerinde klorojenik asidin, rutin türevlerinde rutin ve kuersetin türevlerinde kuersetinin kalibrasyon değerleri kullanılarak bu bileşenler cinsinden eşdeğer miktarları hesaplandı.

Tablo 10. *Sorbus aucuparia* bitkisinin meyve ve yapraklarının bileşiklerinin HPLC-DAD ile belirlenmesi.

RT	Bileşikler	SacuM-M	SacuY-M	SacuM-O	SacuY-O	SacuM-S	SacuY-S
7,9	Klorojenik asit türevi	1,94	0,76	1,28	0,45	1,52	0,85
11,0	Klorojenik asit	6,73	9,64	9,44	7,03	5,68	15,38
11,7	p-Kumarik asit türevi	0,05	Y	1,68	Y	0,06	Y
13,1	p- Kumarik asit türevi	0,07	0,44	Y	Y	0,06	0,93
13,4	Rutin türevi	3,69	102,69	6,62	73,10	3,28	153,10
13,8	Rutin türevi	4,03	73,54	5,15	50,70	3,69	109,39
14,9	Rutin	1,33	83,98	1,84	69,41	1,70	126,26
15,9	Rutin türevi	2,35	71,92	11,89	110,54	2,05	101,86
16,1	Rutin türevi	2,82	113,83	15,38	154,27	2,21	162,43
16,7	Kuersetin heksoz türevi	Y	13,79	Y	Y	Y	Y
17,6	Rutin türevi	3,85	70,14	27,61	86,17	3,08	Y
18,0	Rutin türevi	3,74	24,30	28,95	33,09	2,75	109,78
18,9	Rutin türevi	Y	3,68	1,55	7,06	Y	38,36
20,2	Klorojenik asit türevi	0,14	3,04	1,92	10,24	0,06	3,94
20,7	Rutin türevi	Y	5,16	Y	Y	Y	Y
28,1	Kuersetin	Y	Y	0,10	0,09	Y	0,01

RT: Alıkonma zamanı (dk).

SacuM-M: *S. aucuparia* meyve özütünün metanol fraksiyonu.

SacuY-M: *S. aucuparia* yaprak özütünün metanol fraksiyonu.

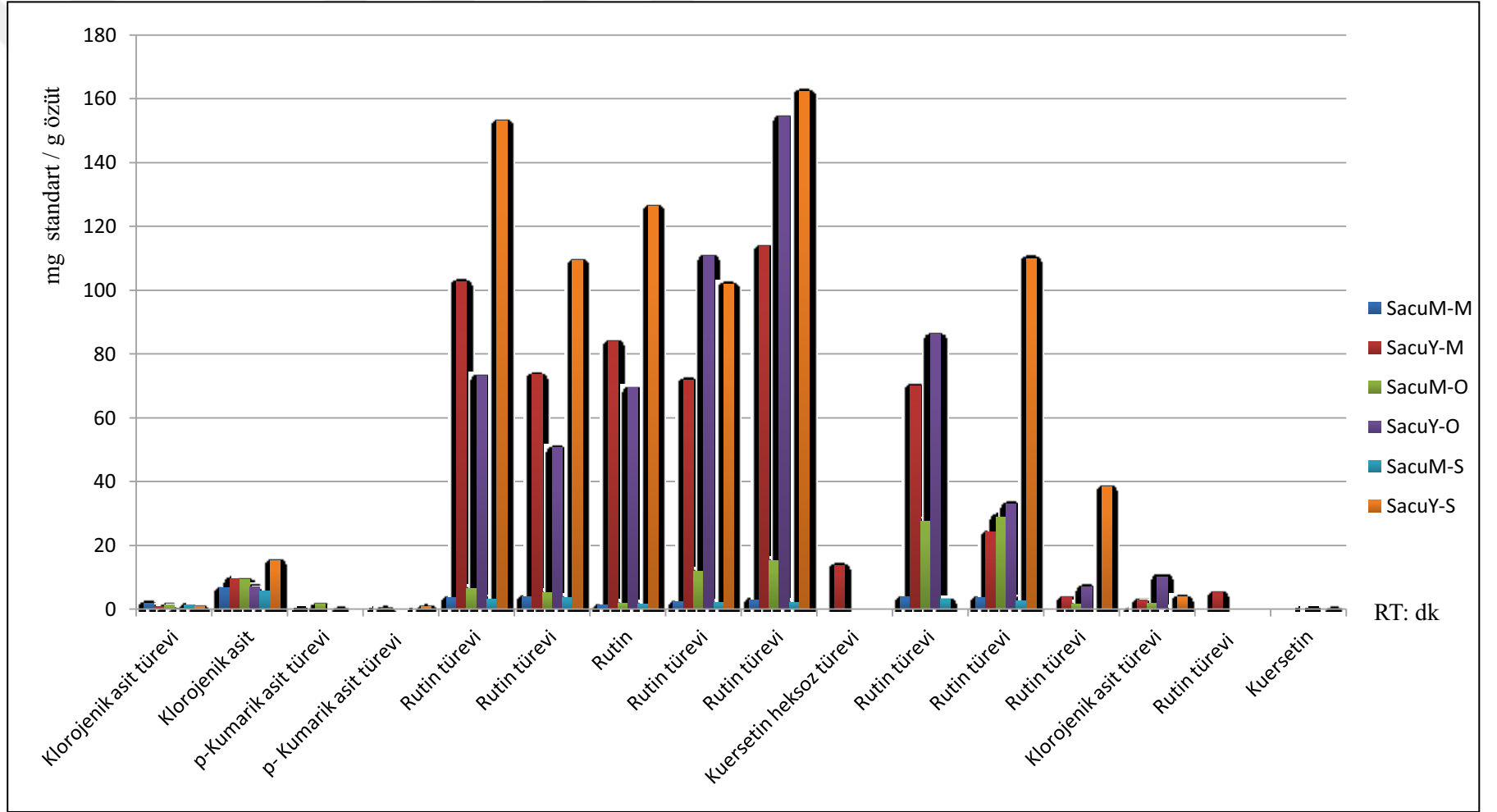
SacuM-O: *S. aucuparia* meyve özütünün organik (eter+bütanol+etil asetat) fraksiyonu.

SacuY-O: *S. aucuparia* yaprak özütünün organik (eter+etil asetat+bütanol) fraksiyonu.

SacuM-S: *S. aucuparia* meyve özütünün sulu fraksiyonu.

SacuY-S: *S. aucuparia* yaprak özütünün sulu fraksiyonu.

Y: Mevcut değil.



Şekil 27. *S. aucuparia* bitkisinin meyve ve yaprak ekstraktlarının metanol, organik ve sulu faz kısımlarından HPLGDAD analiz sonrası bileşiklerin grafik üzerinde gösterilmesi.

Tablo 11. *Sorbus caucasica* bitkisinin meyve ve yapraklarının bileşiklerinin HPLC-DAD ile belirlenmesi.

RT	Bileşikler	ScauM-M	ScauY-M	ScauM-O	ScauY-O	ScauM-S	ScauY-S
7,9	Klorojenik asit türevi	3,31	0,79	1,81	0,48	2,93	1,16
11,0	Klorojenik asit	5,52	3,17	4,30	3,29	5,35	5,18
11,6	Klorojenik asit türevi	0,89	0,39	0,89	0,25	0,77	0,44
11,7	p-Koumarik asit türevi	Y	Y	0,13	Y	Y	Y
12,9	Rutin türevi	Y	13,53	Y	Y	Y	18,87
13,1	p-Koumarik asit türevi	0,15	Y	0,18	Y	0,15	Y
13,2	Kafeik asit türevi	Y	0,63	Y	Y	Y	0,84
13,4	Rutin türevi	Y	7,39	Y	Y	Y	10,11
13,8	Rutin türevi	5,38	61,39	3,29	57,02	6,06	94,41
14,9	Rutin	7,56	170,34	5,65	152,76	10,29	263,71
15,9	Rutin türevi	7,54	57,93	8,62	70,44	7,20	89,34
16,1	Rutin türevi	Y	65,25	5,69	79,27	4,08	92,14
16,7	Kuersetin heksoz türevi	3,16	44,52	4,93	41,01	4,72	67,98
17,4	Rutin türevi	Y	37,12	8,05	35,36	4,37	69,01
18,0	Rutin türevi	2,88	18,66	7,40	17,12	2,88	42,17
18,9	Rutin türevi	Y	1,67	2,86	Y	Y	Y
19,3	Rutin türevi	Y	Y	2,75	Y	Y	Y
20,2	Klorojenik asit türevi	1,25	4,66	9,20	10,68	0,73	7,00
20,7	Rutin türevi	Y	0,81	Y	Y	Y	Y
21,6	Rutin türevi	Y	Y	12,14	Y	2,49	Y
22,0	Rutin türevi	Y	Y	11,21	Y	2,51	Y
22,1	Klorojenik asit türevi	Y	Y	Y	0,55	Y	0,36
24,1	Rutin türevi	Y	Y	Y	8,00	Y	3,07
24,4	p-Koumarik asit türevi	Y	Y	0,17	0,39	Y	0,11
24,6	p-Koumarik asit türevi	Y	Y	0,30	0,54	Y	0,16
27,9	Rutin türevi	Y	Y	2,84	Y	Y	Y

ScauM-M: *S. caucasica* meyve özütünün metanol fraksiyonu.

ScauY-M: *S. caucasica* yaprak özütünün metanol fraksiyonu.

ScauM-O: *S. caucasica* meyve özütünün organik (eter+bütanol+etil asetat) fraksiyonu.

ScauY-O: *S. caucasica* yaprak özütünün organik (eter+etil asetat+bütanol) fraksiyonu.

ScauM-S: *S. caucasica* meyve özütünün sulu fraksiyonu.

ScauY-S: *S. caucasica* yaprak özütünün sulu fraksiyonu.

Y: Mevcut değil.

Yukarıda *S. aucuparia* ve *S. caucasica* ekstraktlarına ait HPLC-DAD analizleri sonuçları hem tablo olarak hem de grafik üzerinde gösterilmiştir. Grafik yardımıyla görsel olarak fenolik bileşenlerin miktarı desteklenmiştir. Tüm bu sonuçları değerlendirdiğimiz zaman; klorojenik asit *S. aucuparia* ve *S. caucasica* bitkilerinin tüm fraksiyonlarında gözlemlendi. Rutin ve rutin türevleri, *S. aucuparia* ve *S. caucasica* bitkilerinin yapraklarında elde edilen sulu fraksiyonda (*S. acuY-S* ve *S. cauY-S*) yüksek miktarda olup, yaprakların metanol (*S. acuY-M* ve *S. cauY-M*) ve organik fraksiyonları (*S. acuY-O* ve *S. cauY-O*) bunu takip etmektedir.

3.9. Antimikrobiyal Aktivite

Bitki özütlerinin agar metodu ile antimikrobiyal aktivitesi *Sorbus* türleri ve *Rosa canina* özütleri üzerine yapıldı. Petrilerdeki zon çapları cetvel yardımıyla ölçüldü.

Test edilen bitki özütlerinin tümünde düşük düzeyde olmakla birlikte (*R.canM* hariç) antimikrobiyal aktivitelerinin var olduğu belirlendi. Bitki özütlerinin tümünün en iyi antibakteriyel aktiviteyi *P. aeruginosa*'ya karşı gösterdiği belirlendi. İlk 6 bitki özütlerinin Gram negatif bakterilere ve maya mantarlarına karşı etkili oldukları, madde konsantrasyonu arttırıldığında bu etkinliğin daha bariz ortaya çıkmış olacağı gözlemlendi. Bu grup bitki özütlerinin Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitenin bulunmadığı gözlemlendi.

Özüt *R.canina* meyve (*R.canM*) test edilen tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, ancak antibakteriyel etkinliğin antimikotik etkinlikten daha yüksek olduğu gözlemlendi. Özellikle antipseudomanal (*P. aeruginosa*'ya) ve enterik bakterilere (Gram negatif basil olan *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* ve Gram pozitif kok olan *E. faecalis*) karşı etkinliğinin çok daha iyi olduğu belirlendi. Düşük de olsa antitüberküloz (*M. smegmatis*) aktivitenin varlığı da önemli bulundu. Bununla birlikte etkinliğin ekstraktın yüksek konsantrasyonu (3493 µg/50 µL) ile de ilişkili olduğu gözlemlendi.

Tablo 12. Agar kuyucuk metoduyla bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi.

Özütler	Stok Kon. (µg/mL)	Mikroorganizmalar ve inhibisyon çapı (mm)								
		<i>Ec</i>	<i>Yp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Bc</i>	<i>Ms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
<i>S.cauY</i>	12 534	-	-	10	-	-	-	-	6	-
<i>S.umbY</i>	8 845	-	-	10	-	-	-	-	-	-
<i>S.aucY</i>	15 689	6	6	8	-	-	-	6	6	10
<i>S.aucM</i>	37 423	6	6	12	-	-	-	-	6	10
<i>S.umb</i>	32 134	-	-	10	-	-	-	-	-	-
M										
<i>S.cauM</i>	27 245	6	-	8	-	-	-	-	6	10
<i>R.canM</i>	69867	16	15	22	10	18	14	13	10	10
<i>R.canÇ</i>	100000	13	10	12	15	-	5	-	-	-
Amp.		10	10	18	10	35	15			
Strep.								35		
Flu.									25	25

Ec: *E. coli* ATCC 35218, Yp: *Y. pseudotuberculosis* ATCC 911, Pa: *P. aeruginosa* ATCC 27853, Sa: *S. aureus* ATCC 25923, Ef: *E. faecalis* ATCC 29212, Bc: *B. cereus* 709 Roma, Ms: *M. smegmatis* ATCC607, Ca: *C. albicans* ATCC 60193, *S. cerevisiae* RSKK 251, Amp.: Ampicillin, Strep.: Streptomycin, Flu.: Fluconazole, (-): Test edilen konsantrasyonlarda aktivite yok.



4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada toplamda 11 bitki çalışıldı. Bazı bitkilerin tamamı, bazı bitkilerin de çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktlar çalışıldı. Yapılan inhibisyon çalışmalarının sonucu Tablo 13' te verildi.

Thymus praecox (BT), *Thymus serpyllum* (BT), *Ziziphora clinopodioides* (BT) , *Hyoscyamus niger* (yaprak, tohum), *Malva sylvestris* (yaprak, çiçek), *Frangula alnus* (meyve, kabuk), *Sorbus umbellate* (meyve) ve *Vitis vinifera* bitkilerinin *E.coli* DnaE proteini üzerine etkisiz olduğu sonucuna varıldı.

Rosa canina bitkisinin çiçek kısmı güçlü inhibisyon verirken, meyve kısmında zayıf inhibisyon etki görüldü.

Tablo 13. Bitki metanol özütlerinde *E. coli* DNA polimerazIII α (DnaE) proteinin yönelik inhibisyon etkinin güçlü, zayıf ve etkisiz olarak değerlendirilmesi.

Bitki adı	Bitki dokusu	<i>E. coli</i> DnaE PolIII α		
		Güçlü	Zayıf	Etkisiz
<i>Thymus praecox</i>	BT			+
<i>Thymus serpyllum</i>	BT			+
<i>Ziziphora clinopodioides</i>	BT			+
<i>Hyoscyamus niger</i>	Yaprak			+
<i>Hyoscyamus niger</i>	Tohum			+
<i>Malva sylvestris</i>	Yaprak			+
<i>Malva sylvestris</i>	Çiçek			+
<i>Frangula alnus</i>	Meyve			+
<i>Frangula alnus</i>	Kabuk			+
<i>Rosa canina</i>	Çiçek	+		
<i>Rosa canina</i>	Meyve		+	
<i>Sorbus aucuparia</i>	Yaprak		+	
<i>Sorbus aucuparia</i>	Meyve		+	
<i>Sorbus caucasica</i>	Yaprak		+	
<i>Sorbus caucasica</i>	Meyve		+	
<i>Sorbus umbellate</i>	Yaprak		+	
<i>Sorbus umbellate</i>	Meyve			+
<i>Vitis vinifera</i>	Yaprak			+

Sorbus aucuparia (meyve, yaprak), *Sorbus caucasica* (yaprak, meyve), *Sorbus umbellata* (yaprak) bitkilerinin *E.coli* DnaE proteini üzerine zayıf etkili inhibisyon olduğu gösterildi.

Genellikle, *Rosa canina*'nın fenolik profili için elde edilmiş sonuçlarda niteliksel ve sayısal farklılıklar doğru ilişkilendirilmiştir (Demir vd., 2014; Guimaraes vd., 2013). Çevresel faktörel (ışık, sıcaklık, topral besinleri gibi) ve meyve olgunlaşma evreleri, metabolizma ve fenoliklerin dönüşümünde etkili olabilir bu da sonuçlar arasındaki farklılıkların nedeni olabilir (Demir vd., 2014). Adamczak, Buchwald, Zielinski, ve Mielcarek (2012) kimyasal sınıflandırmada ne olursa olsun kuşburnundaki çeşitli flavonoidlerin çok değerli olduğunu iddia etmişlerdir. Kuşburnu, vitamin C' nin doğal kaynağı olarak nitelendirilmiştir. Ayrıca, kuşburnundaki flavonoidler ve organik asitler vitamin C' nin oksitlenmesini engeller ve üstelik insanda biyoyararlanımın artmasını sağlar (Adamczak vd., 2012). Ayrıca Nojavan ve diğerleri (2008) kuşburnunun tamamen olgunlaşmış evrelerinde yüksek miktarda vitamin C içerdiğini portakala kıyasla 6 kat daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Bazı yazarlar çalışmalarında, yabani kuşburnunun bütün polifenollerini içerdiğini belirlemişlerdir. Nowak (2007), gül meyvelerinde quercitrin ve kaempferol 3-O-rhamnoside bulmuştur. Mikulic-Petkovsek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2012) HPLC-MSⁿ kullanarak *Rosa canina* meyvelerinde flavonol glikosidlerin quercetin galaktosid, glucuronide ve arabinofuranosit ayrıca kaempferol rutino-side ve koumarolglukositi tanımlamıştır. *Rosa canina* L. meyvelerinin içerdiği diğer fenoller: siyanidin-3- glikozit, taksfolin glikozit, eriyodiktyoll, floridiun, mirisetin, gallik asit türevleri, ellagik ve p-hidroksibenzoik asitler (Hvattum, 2002; Tumbas vd., 2012; Zocca vd., 2011).

Bu çalışmada *Rosa canina* çiçek ve meyve ekstraktlarının HPLC-DAD analizleri sonucu ellacik asit ve gallik asit bulundu ve bu sonuç literatürle örtüşmektedir. Zocca ve arkadaşları, *Rosa canina* özütlerinde kateşin ve epikateşinin türevlerini bulmuşlardır. Yaklaşık olarak litrede 2500 mg epigallokateşin, 37,69 mg epikateşin gallik asit tuzu ve 170 mg' ın üzerinde ellacik asit bulmuşlardır. Kuşburnu' nda tanımlanan organik asitler sırasıyla şöyledir: sitrik > malik > quinik > tartarik > shikimik > fumarik asit. Sitrik asit

ve kuinik asit ikinci numune almaya göre en düşüktür ve sonraki numune almalar arasında önemsiz farklılıklara sahiptir. Böylelikle onlar donmadan etkilenmezler. Malik, shikimik ve fumarik asit olgunlaşma dönemi boyunca büyük çeşitlilik gösterirler; bununla birlikte ayrıca Eylül sonlarında ikinci numune alma çok düşüktür. Adamczak vd. (2012), Kovács vd. (2000) Polonya ve Macaristan' dan farklı *Rosa* türlerinin sitrik asit içerdiğini belirtmişlerdir. Demir ve diğerleri (2014), Türkiye' de toplanılan kuşburnunun sitrik asitinin baskın asit olarak nitelemişlerdir. Zocca vd. (2011) ve Mikulic-Petkovsek vd. (2012) benzer şekilde kuşburnunda sitrik asidi baskın organik asit olarak rapor etmişlerdir ve malik asit onu takip etmektedir. Bunlara ek olarak kuşburnunda laktik asit, oxalikasit ve fumarik asit organik asitleri de tanımlanmıştır (Zocca vd.,2011). Ne yazık ki, ölçü birimi ve analitik metodlar farklılıklarından dolayı veri kıyası mümkün değildir. Mikulic-Petkovsek vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada kuşburnunun fumarik ve shikimik asit içerdiği rapor edilmiştir; ancak şimdiki araştırmalar yüksek oranda sitrik ve malik asit içerdiğini göstermektedir.

Kronik ve dejeneratif hastalıklarının başlaması ve devamında beslenme modellerinin etkili olduğu düşünülür (Liu 2004). İnsan vücundundaki oksidatif stresin azalması veya engellenmesinde yüksek miktarda fitokimyasal içerdiğinden meyve ve sebzelerin tüketilmesinde artış tavsiye edilir (Liu, 2004; Wolfe vd., 2008). Beslenme yaşamında gerekli besinlerin sağlanmasında meyveler ve sebzeler öncelikli yiyecek kaynaklarıdır; ayrıca bunlar içerdiği fenolik ve flavonlar gibi fitokimyasalların çeşitliliği sağlık için önemlidir (Yang vd., 2004).

Kylli ve arkadaşları 2010' da yağ-su sıvı çözeltilisinde (%10 yağ/su) üvez ekstraktlarının mükemmel antioksidan aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir ve bunları birbirlerine bağlı olarak değerlendirmişlerdir. Hertog ve diğerlerinin tarafından yapılan çalışmada, *Sorbus* ekstratlarında en etkili hidroliz şartlarını öncelikli şartlandırmayı temel alarak tespit etmişlerdir (Hertog vd., 1992). *Sorbus* örneklerinin analizinde tanin tipinde proantasiyaninler ve kolay hidroliz edilebilen flavonol glikozlar içerdiği, kısa zamanda ve yüksek HCl konsantrasyonunda tamamen hidroliz edilebilir, bu erken bulgulardan kabul edilen bir bilgidir (Hertog vd., 1992). İlginç olan, orta reaksiyonda Hertog vd. rapor ettiğine kıyasla MeOH konsantreleri daha etkilidir. Muhtemelen bunun sebebi *Sorbus* ekstraktlarındaki mevcut flavonollerin oranıdır.

Sorbus aucuparia meyveleri dışında, yapılan ilk çalışmalarla test edilen tüm *Sorbus* örneklerinin flavonoid içerdikleri belirtilmiştir. Häkkinen ve diğerleri yabani üvezleri analiz ettiğinde, taze ağırlıkta toplam 63 mg/kg olarak flavonoid bulmuşlardır (Häkkinen vd., 1999). Ek olarak Kähkönen vd. rutin olarak ölçtüklerinde kuru ağırlıkta 165 mg/100 g olarak flavonoid bulmuşlardır (Kähkönen vd., 2001). Bu sonuçlar gösteriyor ki; Polonya üvezlerin kuru ağırlıklarında toplam olarak 60 mg/100 g flavonoid içerdiği yapılan çalışmalarda bulunmuştur.

Olszewska vd., (2012) tarafından yapılan çalışmada *S. aucuparia* meyvesinde çeşitli klorojenik asit türevleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada *S. aucuparia* ve *S. caucasica* meyve ve yaprak ekstraktlarının HPLC-DAD analizleri sonucunda klorojenik asit bulunmuştur.

5. ÖNERİLER

Antibiyotiklere karşı direnç her geçen gün yaygınlaşmakta, antibiyotik direnci önemli bir problem olmakta ve alternatif tedavilere ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Kromozomal DNA replikasyonu, bütün patojenlerin çoğalması için gerekli bir işlemdir ve bu işlemin inhibisyonu hızlı bir şekilde mikroorganizmaların ölümüne neden olmaktadır. Bu açıdan bakteri replikasyon sistemleri hedefleyen yeni ilaçların geliştirilmesi çalışmalarının arttırılması gerekmektedir.

Bakteriyal replikatif DNA polimerazları, C familyası DNA polimerazlarını kapsar. Bu çalışma ile 11 bitki türünden elde edilen özütlerin C familyası DNA polimeraz inhibisyonuna bakılmıştır. Ayrıca inhibisyon gösteren özütlerin fenolik bileşikleri HPLC-DAD ile aydınlatılmıştır. Ülkemiz bitki örtüsü açısından zengin olup daha fazla bitki çeşidi üzerinden inhibisyon ve karakterizasyon çalışmaları devam edilebilir. Sağlanacak araştırma destekleri ile polimeraz enzimleri üzerine inhibisyon etkili moleküller saflaştırılarak yapıları aydınlatılabilir.

Bu çalışmada gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine, inhibisyon gösteren bitkilerin sadece DMSO'daki özütlerinin antimikrobiyal test çalışmaları yapılmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon sonucunda elde edilen etil asetat, bütanol, dietil eterdeki fraksiyonların ayrı ayrı inhibisyonuna bakılıp antimikrobiyal testleri yapılabilir.

Ülkemiz zengin bitki çeşitliliğine sahiptir. Çok daha fazla bitki ile bu çalışma yapılarak replikasyon enzimlerine etkileri araştırılabilir. Buna ilaveten viral ve memeli DNA polimerazlarına inhibisyon etki de benzer şekilde araştırılabilir.

Replikatif DNA polimerazlar üzerine etkili bitki kısımlarının tanımlanması durumunda bunların besin takviyelerinde kullanılabilirliği araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Adamczak, A., Buchwald, W., Zieliński, J., Mielcarek, S., 2012.** Flavonoid and organic acid content in rose hips. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 54, 105–112.
- Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammed, F., 1998.** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 183–193.
- Archibald, L., Phillips, L., Monnet, D., McGowan, J.E., Tenover, F., Gaynes, R., 1997.** Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: Increasing importance of the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 211–215.
- Asano, N., Kato, A., Yokoyama, Y., Miyauchi, M., Yamamoto, M., Kizu, H., Matsui, K., 1996.** Calystegin N1, a novel nortropane alkaloid with a bridge head amino group from *Hyoscyamus niger*: structure determination and glycosidase inhibitory activities. *Carbohydrate Research*, 284, 169–178.
- Aziz, S., Rehman, H., 2008.** Studies on the chemical constituents of *Thymus serpyllum*. *Turkish Journal of Chemistry*, 32, 605–614.
- Bailey, S., Wing, R.A. and Steitz, T.A. 2006.** The structure of *T. aquaticus* DNA polymerase III is distinct from eukaryotic replicative DNA polymerases. *Cell*, 126, 89–904.
- Begum, A.S., Verma, S., Sahai, M., Schneider, K., Sussmuth, R., 2009.** Hyoscyamal, a new tetrahydrofurano lignan from *Hyoscyamus niger* Linn. *Natural Product Research*, 23, 595–600.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhar, Z., Kilar, F., Felinger, A., 2010.** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7972–7980.
- Boshoff, H.I., Reed, M.B., Barry, C.E. 3rd and Mizrahi, V. 2003.** DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 113, 183–193.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2007.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus*. *Food Chemistry*, 105, 146–155.
- Bradford, P.A., 2001.** Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 933–951.

- Braithwaite, D.K. and Ito, J., 1993.** Compilation, Alignment, and Phylogenetic Relationships of DNA Polymerases. *Nucleic Acids Research*, 21, 787-802.
- Cann, I.K. and Ishino, Y., 1999.** Archaeal DNA Replication: Identifying the Pieces to Solve a Puzzle, *Genetics*, 152, 1249-1267.
- Cann, I.K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S. and Ishino, Y., 1998.** A Heterodimeric DNA Polymerase: Evidence That Members of Euryarchaeota Possess a Distinct DNA Polymerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 14250-14255.
- Christensen, R., Bartels, E.M., Altman, R.D., Astrup, A., Bliddal, H., 2008.** Does the hip powder of *Rosa canina* (rosehip) reduce pain in osteoarthritis patients? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage*, 16, 965–972.
- Chrubasik, C., Duke, R.K., Chrubasik, S., 2006.** The evidence for clinical efficacy of rose hip and seed: a systematic review. *Phytotherapy Research*, 20, 1–3.
- Chrubasik, C., Roufogalis, B.D., Müller-Ladner, U., Chrubasik, S., 2008.** A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytotherapy Research* 22, 725–733.
- Costa, P., Goncalves, S., Valentao, P., Andrade, P.B., Coelho, N., Romano, A., 2012.** *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135, 1253–1260.
- Cutillo, F., D’Abrosca, B., Dellagreca, M., Fiorentino, A., Zarrelli, A., 2006.** Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. *Phytochemistry*, 67, 481–485.
- Demir, N., Yildiz, O., Alpaslan, M., and Hayaloglu, A. A., 2014.** Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa L.*) fruits in Turkey. *Food Science and Technology*, 57, 126–133.
- Demirbağ, Z., 2006.** Genel mikrobiyoloji. Sonhaber Matbaacılık, ISBN: 93278-1-3, 67-72.
- Dervyn, E., Suski, C., Daniel, R., Bruand C., Chapuis, J., Errington J., Janniere, L., and Ehrlich, S., 2001.** Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork *Science*, 294, 1716–1719.
- Ding, W.H., Li, J., Wang, D.D., Tian, S.G., 2014a.** The extraction technology of polysaccharides from *Ziziphora clinopodioides* Lam. and the dynamic changes of polysaccharides in different growth stages. *Journal of Xinjiang Medical University*, 3, 306–308.

- Ding, W.H., Yang, T., Liu, F., Tian, S.G., 2014b.** Effect of different growth stages of *Ziziphora clinopodioides* Lam. on its chemical composition. *Pharmacognosy Magazine*, 37, 1–5.
- Dulermo, R., Fochesato, S., Blanchard, L. and de Groot, A., 2009.** Mutagenic lesion bypass and two functionally different RecA proteins in *Deinococcus deserti*. *Molecular Microbiology*, 74, 194-208.
- Evans, R.J., Davies, D.R., Bullard, J.M., Christensen, J., Green, L.S., Guiles, J.W., Pata, J.D., Ribble, W.K., Janjic, N. and Jarvis, T.C. 2008.** Structure of PolC reveals unique DNA binding and fidelity determinants. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 105, 20695–20700.
- Farina, A.D., Doldo, A., Cotichini, V., Rajevic, M., Quaglia, M.G., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., 1995.** HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva sylvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversedphase HPLC. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 14, 203–211.
- Fecka, I., Turek, S., 2008a.** Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweetmarjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108, 1039–1053.
- Figueiredo-González, M., Martínez-Carballo, E., Cancho-Grande, B., Santiago, J. L., Martínez, M. C., & Simal-Gándara, J., 2012.** Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry*, 1301, 9-19.
- Gasparetto, J.C., Martins, C.A., Hayashi, S.S., Otuky, M.F., Pontarolo, R., 2012.** Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 64, 172–189.
- Georgescu, R.E., Kurth, I. and O’Donnell, M.E. 2012.** Single-molecule studies reveal the function of a third polymerase in the replisome. *Natural Structural and Molecular Biology*, 19, 113-116.
- Guimaraes, R., Barros, L., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., and Ferreira, I. C. F. R., 2014.** Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from northeastern Portugal: A comparative study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 37–42.
- Guimaraes, R., Barros, L., Duenas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos Buelga, C., et al., 2013.** Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141, 3721–3730.
- Häkkinen, H., Auriola, S., 1998.** High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *Journal of Chromatography A* 829, 91–100.

- Häkkinen S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M., Törrönen, A.R., 1999.** Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 2274–2279.
- Hänsel, R., and Sticher, O., 2007.** *Pharmakognosie – Phytopharmazie* (8th ed.). Heidelberg: Springer.
- Heinonen, M.I., Lehtonen, P.J., Hopia, A.I., 1998.** Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 46, 25–31.
- Helena, I.M.B., Michael, B.R., Clifton, E.B., and Valerie, M., 2003.** DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Cell*, 113, 183-193.
- Hertog, M.G.L., Holman, P.C.H., Venema, D.P., 1992.** Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in fruits and vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 1591-1598.
- Hopfner, K., Eichinger, A., Engh, R.A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R. And Angerer, B., 1999.** Crystal Structure of a Thermostable Type B DNA Polymerase from *Thermococcus gorgonarius*, *Proc. National Academy Science USA.*, 96, 3600–3605.
- Huang, Y., Braithwaite, D.K. and Ito, J., 1997.** Evolution of dnaQ, the Gene Encoding the Editing 3' to 5' Exonuclease Subunit of DNA Polymerase III Holoenzyme in Gram Negative Bacteria, *FEBS Letter*, 400, 94-98.
- Hubscher, U., Maga, G. and Spadari, S., 2002.** Eukaryotic DNA Polymerases, *Annu Review Biochemical*, 71, 133–163.
- Hukkanen, A. T., Pölönen, S. S., Kärenlampi, S. O., & Kokko, H. I., 2006.** Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 112–119.
- Hvattum, E., 2002.** Determination of phenolic compounds in rose hip (*R. canina*) using LC coupled to EI tandem MS and DAD. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16, 655–662.
- Inoue, R., C. Kaito, M. Tanabe, K. Kamura, N. Akimitsu, and K. Sekimizu, 2001.** Genetic identification of two distinct DNA polymerases, DnaE and PolC, that are required for chromosomal replication in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Genetics Genomics*, 266, 564–571.
- Ito, J., and Braithwaite, K., 1991.** Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Research*, 19, 4045-4057.
- Jabri-Karoui, I., Bettaieb, I., Msaada, K., Hammami, M., Marzouk, B., 2012.** Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods* 4, 661–669.

- Jäger, A.K., Eldeen, I.M.S., van Staden, J., 2007.** COX-1 and COX-2 activity of rose hip. *Phytotherapy Research*, 21, 1251–1252.
- Jäger, A.K., Petersen, K.N., Thomasen, G., Christensen, S.B., 2008.** Isolation of linoleic and alpha-linolenic acids as COX-1 and -2 inhibitors in rose hip. *Phytotherapy Research* 22, 982–984.
- Jerzmanowska, Z., Kamecki Z., 1973.** Phytochemical analysis of inflorescence of mountain ash *Sorbus aucuparia*. *Roczniki Chemistry*, 47, 1629–1638.
- Kanias, G.D., Loukis, A., 1987.** Determination and correlation of active constituents and trace-elements in the medicinal plant *Thymus capitatus* Hoffm. and Link. *Fresenius Zeitschrift Analytische Chemie*, 327, 355–357.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen M., 1999.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 3954–3962.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Heinonen, M., 2001.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 4076–4082.
- Kıvrak I and Kıvrak S, 2014.** Antioxidant Properties, Phenolic Profile and Nutritional Value for *Sorbus umbellata* Fruits from Turkey. *Austin Journal of Nutrition Food Science* 2, 1043.
- Koonin, E.V., and Bork, P., 1996.** Ancient duplication of DNA polymerase inferred from analysis of complete bacterial genomes. *Trends Biochemical. Science*, 21, 128-129.
- Kornberg, A., and Baker, T.A., 2005.** DNA Replication. University Science Books, Sausalito, CA.
- Kovács S, Tóth MG, Facsar G., 2000.** Fruit quality of some rose species native to Hungary. *Acta Horticultural*, 538, 103–108.
- Krisch, J., Galgóczy, L., Tolgyesi, M., Papp T., Vágvölgyi, C., 2008.** *Acta Biologiae Szegediensis*, 52, 267–270.
- Kurth, I., and O'Donnell, M., 2013.** New insights into replisome fluidity during chromosome replication. *Trends Biochemical Science*, 38, 195–203.
- Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimia, R., Westerlund-Wikstrom, B., McDougall, G., Stewart, D., et al., 2010.** Rowanberry phenolics: Compositional analysis and bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11985-11992.
- Lamers, M.H., Georgescu, R.E., Lee, S.G., O'Donnell, M. and Kuriyan, J., 2006.** Crystal structure of the catalytic alpha subunit of *E. coli* replicative DNA polymerase III. *Cell*, 126, 881-892.

- Liang, Z., Owens, C. L., Zhong, G.Y., and Cheng, L., 2011.** Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm. *Food Chemistry*, 129, 940–950.
- Liu, R.H., 2004.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479-3485.
- Ma, C.Y., Liu, W.K., Che, C.T., 2002.** Lignanamides and nonalkaloidal components of *Hyoscyamus niger* seeds. *Journal of Natural Products*, 65, 206–209.
- Ma, C.Y., Williams, I.D., Che, C.T., 1999.** Withanolides from *Hyoscyamus niger* seeds. *Journal of Natural Products*, 62, 1445–1447.
- Marin, P.D., Grayer, R.J., Kite, G.C., Matevski, V., 2003.** External leaf flavonoids of *Thymus species* from Macedonia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 1291–1307.
- McHenry, C.S., 2011a.** DNA replicases from a bacterial perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 403–436.
- McHenry, C.S., 2011b.** Bacterial replicases and related polymerases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 587–594.
- Michael T. Madıgan ve John M. Martıno, 2010.** Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Çökmüş, C. (Ç. Edi), 712, 351-353.
- Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., 2012.** HPLC-MSⁿ identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*, 135, 2138–2146.
- Nojavan, S., Khalilian, F., Kiaie, F. M., Rahimi, A., Arabanian, A., & Chalavi, S., 2008.** Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 300–305.
- Nowak, R., 2007.** TLC fingerprinting analysis of the European Dog Rose. *Journal of Planar Chromatography*, 20, 43–48.
- Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P., Goodman, M.F., Hanaok, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C. and Wang, Z., 2001.** The Y-family of DNA Polymerases, *Molecular Cell*, 8, 7-8.
- Olszewska, M., 2012.** *Chemistry of Natural Compounds*, submitted for publication.
- Olszewska, M. A., Presler, A., and Michel, P., 2012.** Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected *Sorbus* species. *Molecules*, 17, 3093–3113.

- Orhan, I., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Kartal, M., Sekeroglu, N., Deveci, M., Kan, Y., Sener, B., 2009.** Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food Chemistry Toxicology*, 47, 1304–1310.
- Pank, F., Eichholz, E., Ennet, D., 1982.** Weed-control in the cropping of medicinal-plants.4. Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Pharmazie* 37, 795–797.
- Payne, DJ., Gwynn, MN., Holmes, DJ., Rosenberg M., 2004.** Genomic approaches to antibacterial discovery. *Methods in Molecular Biology*, 266, 231.
- Perera, R.L., Torella, R., Klinge, S., Kilkenny, M.L., Maman, J.D. and Pellegrini, L. 2013.** Mechanism for priming DNA synthesis by yeast DNA Polymerase alpha. *Elife*, 2, 482.
- Perez, C., Pauli, M., Bazerque, P., 1990.** An antibiotic assay by the well agar method. *Acta Biologicae et Medicinae Experimentalis.*, 15, 113-115.
- Pritchard, A.E. and McHenry, C.S. 1999.** Identification of the acidic residues in the active site of DNA polymerase III. *Journal of Molecular Biology*, 285, 1067-1080.
- Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J., Leake, M.C., 2010.** Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in *Escherichia coli*. *Science*, 328, 498-501.
- Richet, H., Mohammed, J., McDonald, L.C., Jarvis, W.R., 2001.** Building communication networks: international network for the study and prevention of emerging antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 319.
- Robinson, A., Causer, R.J. and Dixon, N.E. 2012.** Architecture and conservation of the bacterial DNA replication machinery, an underexploited drug target. *Current Drug Targets*, 13, 352–372.
- Sajeli B, Sahai M, Suessmuth R, Asai T, Hara N, Fujimoto Y., 2006.** Hyosgerin, a new optically active coumarinolignan from the seeds of *Hyoscyamus niger*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 538–541.
- Sanders, G.M., Dallmann, H.G. and McHenry, C.S. 2010.** Reconstitution of the *B. subtilis* replisome with 13 proteins including two distinct replicases. *Molecular Cell*, 37, 273-281.
- Sanders, L.H., Rockel, A., Lu, H., Wozniak, D.J. and Sutton, M.D. 2006.** Role of *Pseudomonas aeruginosa* *dinB*-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 188, 8573-8585.
- Schulz, H., Schrader, B., Quilitzsch, R., Pfeffer, S., Kruger, H., 2003.** Rapid classification of basil chemotypes by various vibrational spectroscopy methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 2475–2481.

- Sekeroglu, N., Deveci, M., Buruk, C.K., Gurbuz, B., Ipek, A., 2007.** Chemical composition and antimicrobial activity of Anzer tea essential oil. *Journal of Science Food Agricultural* 87,1424–1426.
- Shen, Y., Musti, K., Hiramoto, M., Kikuchi, H., Kawabayashi, Y. and Matsui, I., 2001.** Invariant Asp1122 and Asp1124 are Essential Residues for Polymerization Catalysis of Family D DNA Polymerase from *Pyrococcus horikoshii*, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 27376-27383.
- Stano, N.M., Chen, J. and McHenry, C.S. 2006.** A coproofreading Zn(2+)-dependent exonuclease within a bacterial replicase. *Nature Structure Molecular Biology*, 13, 458-459.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., & Gerós, H. 2013.** Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 18711–18739.
- Termentzi, A., Kefalas P., Kokkalou, E., 2006.** Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry*. 98; 599–608.
- Termentzi, A., Kefalas, P., Kokkalou, E., 2008.** LC–DAD–MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. *Food Chemistry*, 106, 1234–1245.
- Tian, S.G., Yu, Q., Xin, L.D., Zhou, Z.S., Upur, H., 2012.** Chemical fingerprinting by RP-RRLC-DAD and principal component analysis of *Ziziphora clinopodioides* Lam. from different locations. *Natural Product Communications*, 9,1181–1184.
- Timinskas, K., Balvočiūtė, M., Timinskas, A., Venclovas, Č., 2013.** Comprehensive analysis of DNA polymerase III α subunits and their homologs in bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1–21.
- Töreci, K., 2003.** Antibiyotik kullanımı ve direnç ilişkisi. *Flora*, 8, 89-110.
- Tumbas, V.T., Canadanovic-Brunet, J.M., Cetojevic-Simin, D.D., Cetkovic, G.S., Dilas, S.M., Gille, L., 2012.** Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *Journal of Science Food Agricultural* 92, 1273–1281.
- Turumtay, E.A., Islamoglu, F., Cavus, D., Sahin, H., Turumtay, H., Vanholme, B., 2014.** Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*). *Industrial Crops and Products*, 52, 687–694.
- Turumtay, E.A., Turumtay, H., Demir, A., Selvi, E.K., Yazıcı, E., Sandallı, C., Yazıcı, Z.A., 2015.** Anthocyanins profiling of *Thymus praecox* opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* *Industrial Crops and Products*, 77, 748-753.

- Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H. and Ishino, Y., 1997.** A Novel DNA Polymerase in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*: Gene Cloning, Expression, and Characterization, *Genes Cells*, 2, 499-512.
- Ugla M, Gustavsson K.E., Olsson M.E., Nybom, H., 2005.** Changes in colour and sugar content in rose hips (*Rosa dumalis* L., and *R. rubiginosa* L.) during ripening. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80, 204–208.
- URL-1.** <http://www.biyolojidersnotlari.com/dokuz-eylul-universitesi-bakterileriyapisi-ve-siniflandirilmesi.html> (25 Şubat 2016)
- URL-2.** <https://tr.wikipedia.org/wiki/Gram-negatif> (25 Şubat 2016)
- URL-3.** https://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli (26 Şubat 2016)
- URL-4.** <https://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> (20 Nisan 2016)
- URL-5.** <http://www.alternatif-tip.net/kusburnu-hagebutte-rosa-canina.htm/> (28 Şubat 2016)
- URL-6.** http://www.fidanistanbul.com/urun/2382_-sorbus-aucuparia-kus-uvezi.html (28 Şubat 2016)
- URL-7.** <https://tr.wikipedia.org/wiki/Üzüm> (1 Mart 2016)
- Usluer, G., 2002.** Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol *Flora*, 7, 135-141.
- Vahaboğlu, H., 2004.** Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel*, 2, 92-96.
- Wang, J., Sattar, A.K., Wang, C.C., Karam, J.D., Konigsberg, W.H. and Steitz, T.A., 1997.** Crystal Structure of a pol_{II} Family Replication DNA Polymerase from Bacteriophage RB69, *Cell*, 89, 1087-1099.
- Wei, Yang., 2005.** Portraits of a Y-family DNA Polymerase, *FEBS letters*, 579, 868-872.
- Wenzig, E.M., Widowitz, U., Kunert, O., Chrubasik, S., Bucar, F., Knauder, E., Bauer, R., 2008.** Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations. *Phytomedicine* 15, 826–835.
- Wichtl, M., 2004.** Herbal drugs and phytopharmaceuticals (3rd ed.). Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
- Wing, R.A., Bailey, S., and Steitz, T.A., 2008.** Insights into the replisome from the structure of a ternary complex of the DNA polymerase III alpha-subunit. *Journal of Molecular Biology*, 382, 859-869.

- Wissemann, V., Gallenmüller, F., Ritz, C., Steinbrecher, T., Speck, T., 2006.** Inheritance of growth form and mechanical characters in reciprocal polyploid hybrids of *Rosa* section Caninae implications for the ecological niche differentiation and radiation process of hybrid offspring. *Trees (Berl West)*; 20, 340–347.
- Wolfe, K.L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., Liu, R.H., 2008.** Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*; 56: 8418-8426.
- Yamada, H., Kiyohara, H., 2007.** in: J.P. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience*, Elsevier Ltd., Oxford, 663–693.
- Yang J., Meyers KJ, van der Heide J, Liu RH, 2004.** Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*; 52, 6787-6793.
- Yang, X.J., Li, N., Meng, D.L., Li, W., Li, X., 2008.** Isolation and identification of chemical constituents from *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Journal Shenyang Pharmaceutical University*. 25,456–458.
- Yildiz, O., Alpaslan, M., 2012.** Properties of rose hip marmalades. *Food Technol Biotechnology*, 50, 98–106.
- Yu, Q., Shi, Y., Yuan, S.N., Tian, S.G., 2012.** Preliminary study of quality standards of *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Xinjiang Medical University*, 35, 301–305.
- Zeng, Y.H., Shen, F.T., Tan, C.C., Huang, C.C., and Young, C.C., 2011.** The flexibility of UV-inducible mutation in *Deinococcus* *ficus* as evidenced by the existence of the imuB-dnaE2 gene cassette and generation of superior feather degrading bacteria. *Microbiological Research*, 167, 40-47.
- Zgorka, G., Glowniak, K., 2001.** Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 26, 79–87.
- Zocca, F., Lomolino, G., Lante, A., 2011.** Dog rose and pomegranate extracts as agents to control enzymatic browning. *Food Research International*, 44, 957–963.

ÖZGEÇMİŞ

Emine Esra BUDAK 1990 yılında Rize’ de doğdu. Öğrenimine Abdülhak Hamit İnkokulu’nda başladı ve Ertuğrul Gazi İlköğretim Okulu’nda devam edip ilkokulu ve ortaokulu burada, Kaynarca Şevket Sabancı Lisesi’ nde liseyi tamamladı. 2008-2009 Eğitim-Öğretim yılında Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2010-2012 yılları arasında Formasyon eğitimini tamamladı. 2012 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’ nda lisanüstü eğitimine başladı.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları

Sandalli C., Midilli A., Budak E.E., Akyüz Turumtay E., Er H., Baykal H., et al., 2015. *Üç Sorbus* Türünün Meyve ve Yaprak Özütlерinin Bakteriyal Replikatif DNA Polimeraz III Enzimleri Üzerine İnhibisyonunun Karşılaştırmalı Araştırılması, 3. İlaç Kimyası Kongresi, Antalya, Türkiye, 204-204.

Çopur Çiçek A. , Sandalli C. , Budak E.E., Yağmur G., Çizmeci Z., Ak S., et al., 2016. İdrar Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegron Gen Kasetlerinin Karakterizasyonu: Çok Merkezli Bir Çalışma-Characterization of Class 1 and Class 2 Integron Gene Cassettes in *Escherichia coli* Strains Isolated From Urine Cultures: A Multicenter Study, Mikrobiyoloji Bülteni, vol.50, 175-185.

Mengenoğlu Z.F., Çopur Çiçek A., Koçoğlu E., Sandalli C., Budak E.E., Özgümüş O.B., 2014. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Sınıf 1 ve 2 İntegron Taşıyıcılığı ve Yeni Bir Gen Kaseti Birlikteliği: blaOXA-11-cmlA7 - Carriage of Class 1 and 2 Integrons in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Specimens and a Novel Gene Cassette Array: blaOXA-11 -cmlA7", Mikrobiyoloji Bülteni, vol.48, 48-58.