

T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Diospyros kaki* YAPRAK VE MEYVE ÖZÜTLERİNİN GRAM (+)  
REPLİKATİF DNA POLİMERAZ (POLC) ÜZERİNE  
İNHİBİSYONUNUN ARAŞTIRILMASI

AHMET MİDİLLİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. CEMAL SANDALLI

TEZ JÜRİLERİ

YRD. DOÇ. DR. EMİNE AKYÜZ TURUMTAY

YRD. DOÇ. DR. AYŞEGÜL SARAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2016

Her Hakkı Saklıdır

T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Diospyros kaki* YAPRAK VE MEYVE ÖZÜTLERİNİN GRAM (+) REPLİKATİF  
DNA POLİMERAZ (POLC) ÜZERİNE İNHİBİSYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Cemal SANDALLI danışmanlığında, Ahmet MİDİLLİ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13/05/2016 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. Ayşegül SARAL	

İmzası





Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

## ÖNSÖZ

TÜBİTAK 113Z054 numaralı projeden sağlanan destekle çalışılan “*Diospyros kaki* yaprak ve meyve özütlerinin Gram (+) replikatif DNA polimeraz (polC) üzerine inhibisyonunun araştırılması” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında, her alanda bana öncülük eden, ilgi ve desteğiyle her konuda yanımda olan, erdem ve iş ahlakını kendisinden öğrendiğim çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Cemal SANDALLI’ ya;

Tez çalışmalarımnda bitkilerin özütleme işlemleri, HPLC-DAD analizleri ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY ve sevgili arkadaşım Kimyager Havva ER’ e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, hiç bir konuda yardımlarını ve sevgilerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN, Yrd. Doç. Dr. Ayşegül SARAL, Biyolog Emine Esra BUDAK ve Biyolog Fatma ÇALIK olmak üzere tüm moleküler laboratuvarı ailesine;

Eğitim hayatımın her alanında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, maddi ve manevi her türlü desteğiyle yanımda olan değerli arkadaşlarım Rıdvan YILDIZ ile Ayşegül KELEŞ’e ve çok kıymetli aileme teşekkürü borç bilirim.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından 113Z054 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ahmet MİDİLLİ

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan *Diospyros kaki* yaprak ve meyve özütlерinin Gram (+) replikatif DNA polimeraz (polC) üzerine inhibisyonunun araştırılması 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. 13/05/2016

Ahmet MİDİLLİ

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

## ÖZET

### *Diospyros kaki* YAPRAK VE MEYVE ÖZÜTLERİNİN GRAM (+) REPLİKATİF DNA POLİMERAZ (POLC) ÜZERİNE İNHİBİSYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Ahmet MİDİLLİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi  
Danışmanı: Doç. Dr. Cemal SANDALLI

*Diospyros kaki* (*D. kaki*) bitkisinin replikatif DNA polimeraz inhibisyonu, antimikrobiyal aktivitesi ve bazı kimyasal içeriklerinin çalışıldığı bu yüksek lisans tezinde bitkinin yaprak ve meyve kısımları kullanıldı. Replikatif bakteriyel DNA polimeraz olarak *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) replikatif DNA polimeraz III $\alpha$  (PolC) seçildi. Rekombinant üretim aşaması PolC'yi kodlayan genin PZR ile çoğaltılması ve pET-100 TOPO vektörüne klonlanmasıyla sağlandı. Rekombinant protein *E. coli* BL21 hücrelerinde üretildi ve Nikel Affinite kromatografi kullanılarak saflaştırıldı. İnhibisyonun belirlenmesi için primer uzatma deneylerinde kullanılmak üzere bitkinin meyve ve yapraklarının metanol ve DMSO özütleri hazırlandı. Hazırlanan metanol özütleri PolC'ye karşı kullanıldı. Primer uzatma deneylerinde florojenik primer ihtiva eden ve sentetik olarak dizayn edilen 45/20-mer DNA kullanıldı. *Diospyros kaki* bitkisinin yaprak özütünün PolC üzerinde güçlü bir şekilde inhibisyon gösterdiği gözlemlenirken meyve özütünün ise PolC üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği belirlendi. Hazırlanan DMSO özütleri ise antimikrobiyal aktivite için kullanıldı. *Diospyros kaki* yaprak özütlerinin hem Gram (-) hemde Gram (+) olmak üzere iki grup bakteri üzerinde de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. *D. kaki* bitkisinin inhibisyon görülen yapraklarından eter ve metanol özütlerinin HPLC-DAD ile fenolik bileşikleri aydınlatıldı. *D. kaki* bitkisi yaprak özütlerinde rutin türevleri ve kamferol bulundu.

2016, 60 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus subtilis* replikatif DNA polimeraz III (PolC)'nin inhibisyonu, antimikrobiyal aktivite, bitki özütleri, HPLC-DAD, fenolik bileşikler.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF INHIBITORY EFFECT OF *Diospyros kaki* LEAVE AND FRUIT EXTRACTS ON GRAM (+) REPLICATIVE DNA POLYMERASE (POLC)

Ahmet MİDİLLİ

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

In this thesis, inhibition of DNA replicative polymerase activity, antimicrobial activity and chemical content of *Diospyros kaki* (*D. kaki*) were studied and its fruit and leaf extract were used. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) replicative DNA polymerase III $\alpha$  (PolC) was used a model polymerase in assays. The gene encoding PolC was amplified by PCR and cloned into pET-100 TOPO vector to produce recombinant protein. Expression was achieved in *E. coli* BL21 and the recombinant protein was purified by using nickel affinity chromatography. In order to determine inhibition, methanol and DMSO extract of fruit and leaf of *D. kaki* were prepared. Methanol extract was used for determination of inhibition effect on PolC. In the primer extension experiments, synthetic designed 45/20-mer DNA which contains fluorogenic primer was used. It is observed that, leaf extract of *D. kaki* plant has strong inhibition on the contrary fruit extract on PolC. Prepared DMSO extract was used to determine antimicrobial activity. It is concluded that, leaf extract of *D. kaki* has antimicrobial activity both Gram negative and Gram positive bacteria. Phenolic compounds of leaves of *D. kaki* were obtained ether and methanol extracts by using HPLC-DAD. Finally, routine derivatives and kaempferol were found in the leaf extract of *D. kaki*.

2016, 60 pages

**Key words:** Inhibition of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III $\alpha$  (PolC), antimicrobial activity, plant extracts, HPLC-DAD, phenolic compounds.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	III
ÖZET.....	III
ABSTRACT .....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Gram Pozitif Bakteriler .....	1
1.2.1. <i>Bacillus</i> Cinsi.....	3
1.2.1.1. <i>Bacillus subtilis</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 Polimerazlar .....	7
1.4.2. C Familyası DNA Polimerazlar (PolIII $\alpha$ ) .....	9
1.4.3. Yeni Antibakteriyal Hedef Sistem Olarak Replikatif DNA PolIII $\alpha$ .....	13
1.5. Yeni Antibakteriyal Moleküllerin Bitkilerde Araştırılması .....	13
1.6. Çalışmanın Amacı .....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar, Besiyeri, Enzimler ve Vektörler .....	17
2.2. <i>B. subtilis</i> Replikatif DNA Polimeraz III $\alpha$ proteininin (PolC) Rekombinant Olarak Üretilmesi .....	18
2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu .....	18
2.2.2. Replikatif DNA Polimeraz III $\alpha$ (PolC)'nin PZR İle Çoğaltılması.....	18
2.2.3. <i>B. subtilis</i> Polimeraz III $\alpha$ (PolC) Geninin pET100/D-TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	19
2.2.4. Klonlanan <i>B. subtilis</i> Polimeraz III $\alpha$ (PolC) Geninin Sekanslanması ve Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	20
2.2.5. <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde PolC Ekspresyonunun Gösterilmesi.....	20
2.2.6. SDS – PAGE Hazırlanması .....	21
2.2.7. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması.....	21

2.2.8.	Saf Proteine Diyaliz Uygulanması .....	23
2.3.	Rekombinant Enzimin Aktivitesinin Gösterilmesi.....	23
2.3.1.	Enzim Aktivite DeneYlerinde Kullanılan Tamponlar.....	23
2.3.2.	Sentetik DNA Substratının Hazırlanması.....	24
2.3.3.	Primer Uzatma DeneYi ile Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi .....	25
2.3.4.	Üre-PAGE Jelinin Hazırlanması .....	25
2.3.5.	Üre-PAGE' de Örneklerin Yürütülmesi.....	25
2.4.	Metanolün <i>B. subtilis</i> PolC Aktivitesine Etkisinin Araştırılması.....	25
2.5.	Bitkilerin Yaprak ve Meyve ÖZütlerinde DNA Polimeraz İnhibisyonunun Araştırılması .....	26
2.5.1.	Bitkilerin Toplanması.....	26
2.5.2.	ÖZütlerin Hazırlanması.....	26
2.5.3.	Bitki ÖZütlerinde İnhibisyonun Araştırılması .....	26
2.6.	Antimikrobiyal Aktivite .....	27
2.6.1.	Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu.....	27
2.7.	<i>Diospyrus kaki</i> Bitkisi Yapraklarının Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD İle Aydınlatılması .....	28
3.	BULGULAR .....	30
3.1.	<i>B. subtilis</i> PolC Geninin Çoğaltılması.....	30
3.2.	Protein İndüklenmesi.....	30
3.3.	Protein Saflaştırılması .....	31
3.4.	Saflaştırılan PolC Proteinin Aktivitesinin Gösterilmesi.....	33
3.4.1.	Metanolün PolC Proteinini Üzerine Etkisinin Gösterilmesi.....	33
3.5.	<i>Diospyros kaki</i> Bitkisinin Yaprak ve Meyve ÖZütlerinin PolC Üzerine İnhibisyon Etkileri.....	34
3.6.	Antimikrobiyal Aktivite .....	35
3.7.	<i>Diospyros kaki</i> Yaprak Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması .....	35
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	39
5.	ÖNERİLER .....	42
	KAYNAKLAR.....	43
	ÖZGEÇMİŞ.....	49



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı.....	2
Şekil 2.	PolC ve DnaE replikatif enzimlerin domain organizasyonundaki farklılığın şematik olarak gösterimi.....	8
Şekil 3.	Nükleotit trifosfatın DNA'ya eklenmesinde iki metal iyonlu mekanizma.....	9
Şekil 4.	Domain organizasyonu açısından PolC ve DnaE'nin şematik gösterilmesi.....	11
Şekil 5.	C familya DNA polimeraz III $\alpha$ 'ün filogenetik gruplandırılması.....	12
Şekil 6.	Çalışmada kullanılan bitki kısımları.....	15
Şekil 7.	DNA polimeraz aktivite deneylerinde kullanılan primer 5'-ucundan Cy5 ile florojenik işaretli çift zincir sentetik DNA substratı.....	24
Şekil 8.	PZR sonrası <i>B. subtilis</i> PolC geninin Markerla agaroz jelde yürütülmesi.....	30
Şekil 9.	<i>B. subtilis</i> PolC proteinine ait pellet ve süpernatantın jelde gösterilmesi.....	31
Şekil 10.	<i>B. subtilis</i> PolC enziminin her bir fraksiyonun ayrı ayrı gösterilmesi.....	32
Şekil 11.	<i>B. subtilis</i> PolC proteinin markırla SDS-PAGE' de gösterilmesi.....	32
Şekil 12.	Üre-PAGE' de <i>B. subtilis</i> PolC saflaştırılan proteinin aktivitesinin gösterilmesi.....	33
Şekil 13.	<i>B. subtilis</i> PolC proteinine metanol etkisinin gösterilmesi.....	34
Şekil 14.	<i>Diospyrus kaki</i> yaprak ve meyve özütlerinin <i>B. sub</i> PolC üzerine etkisi.....	34
Şekil 15.	Hurma metanol özütlerinin 254 nm (a) ve 370 nm'de (b) HPLC-DAD kromatogramları.....	37
Şekil 16.	Hurma eter özütlerinin 254 nm (a) ve 370 nm'de (b) HPLC-DAD kromatogramları.....	37

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> <i>Bacillus subtilis</i> mikroorganizmasının sınıflandırılması.....	5
<b>Tablo 2.</b> Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar .....	17
<b>Tablo 3.</b> SDS – PAGE’ de kullanılan malzemeler.....	21
<b>Tablo 4.</b> Saflaştırmada kullanılan tüm çözeltiler.....	22
<b>Tablo 5.</b> HPLC-DAD analizlerinin kalibrasyon ve validasyon değerleri.....	35
<b>Tablo 6.</b> HPLC-DAD ile hurma metanol ve eter özütlerinde tanımlanan fenolik bileşenler.....	36
<b>Tablo 7.</b> Agar kuyucuk metoduyla bitki özütünün antimikrobiyal aktivitesi.....	38
<b>Tablo 8.</b> <i>B. subtilis</i> DNA polimeraz III (PolC) proteinine <i>Diospyrus kaki</i> meyve ve yaprak metanol özütlerinin inhibisyon etkisi gösterip göstermediğinin değerlendirilmesi.....	39

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

## **1. GENEL BİLGİLER**

### **1.1. Giriş**

Bakteriler, Gram boyama yönteminden yararlanılarak; Gram negatif ve Gram pozitif olmak üzere gruplandırılırlar. Son görüşlere göre gram boyamadan, hücre duvarının kesinlikle sorumlu olduğu ve murein tabakasının tek veya çok katlı oluşunun rol oynadığı vurgulanmaktadır. Gram pozitif bakterilerin çoğunda hücre duvarındaki murein ağı 50'nin üzerinde katmanlı olup gram negatif bakterilere göre daha kalındır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarında az miktarda lipopolisakkarit bulunmaktadır (Güven ve Demirel Zorba, 2013). Hemen hemen bütün bakterilerde var olan hücre duvarı kısmen sert olup hücre zarının dışında bulunur. Hücre duvarı iki önemli fonksiyona sahiptir. Birincisi, hücrenin karakteristik şeklini belirler. İkincisi, ozmoz ile hücreye sıvı alındığı zaman hücreyi parçalamaktan korur (Demirbağ, 2006).

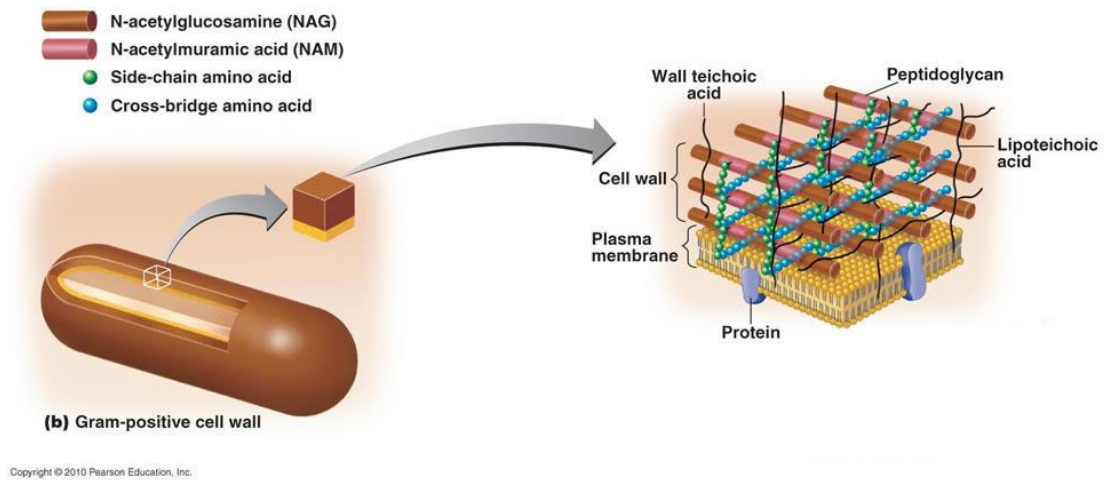
Peptidoglikan tabaka başlıca 3 kısımdan oluşan kompleks bir polimerdir. Sırası ile NacG (N Asetil Glutamik Asit) ve NacM (N Asetil Muramik asit) dizilerinden meydana gelmiş olan ilk kısım duvarın iskeletini oluşturur. Bu kısım tüm bakterilerde aynıdır. NacM'ye bağlı olan tetrapeptit yan zincirler ikinci kısmı oluşturur. Türden türe farklılık gösterir. Genelde bütün türlerin tetrapeptit yan zincirleri önemli bazı genel özelliklere sahiptir. Çoğunda L-Alanin, D-Glutamat, D-Alanin ve bir değişken bölge bulunur. Bu değişken bölge G- lerde Diaminopimelik asitken G+ lerde L-Lizin ya da diğer L aminoasitlerdir. Üçüncü kısım ise tetrapeptit yan zincirlerin arasında çapraz bağlar oluşturan benzer yapıdaki peptidlerdir. Bu kısımda türden türe farklılık gösterir (Bağlan, 2003).

### **1.2. Gram Pozitif Bakteriler**

Gram pozitif gram boyama prosedüründen geçtikten sonra, mikroskop altında mavi-siyah, mor renk alan bakterilerdir. Bu rengin sebebi gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarının kristal viyole/iyot karışımını tutmasıdır. Gram negatif bakterilerin aksine gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarının dışında dış zar bulunmaz. Peptidoglikan hücre duvarı daha kalın olan gram pozitiflerin boyaları tutma kuvvetleri

fazladır. Orijinal bakteri sınıflandırmasında gram pozitifler Firmikütler şubesini oluşturuyorlardı. Firmikütler şubesinin içerdiği bazı ünlü familyalar şunlardır: *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Clostridium*. Actinobacteria Gram pozitiflerin başka bir ailesidir. Actinobacteria ve Firmikütler, DNAlarındaki yüksek ve düşük G+C miktarı sebebiyle (sırasıyla) guanin ve sitozin grupları olarak adlandırılırlar. İkinci hücre zarına sahip olmamaları ve sterollere sahip olmaları sebebiyle bu şubelerin ökaryotların ataları oldukları iddia edilmiştir. Deinococcus-Thermus grubu bakterilerde yapıları gram negatif bakterilerle aynı olmasına rağmen boyanma şekilleri yüzünden gram pozitif sayılmışlardır. Hem gram pozitif bakterilerin hem de gram negatif bakterilerin S-tabakası denen ayrı bir zarları daha vardır. Gram negatiflerde S-katmanı, dış zara yapışıktır. Gram pozitiflerde ise S-katmanı, peptidoglikan tabakasına yapışıktır. Gram pozitiflerin kendilerine has bir özellikleri hücre duvarlarında teyikoik asit bulundurmalarıdır. Lipoteyikoik asit denen, özel teyikoik asit türünün lipid kısmı, peptidoglikan tabakasının hücreye demirlenmesine yardımcı olur (URL-1).

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı, bu duvarın %95'ini oluşturan kalın bir peptidoglikan tabakasından oluşmaktadır (Şekil 1). Bu oran Gram negatiflerde %5-10'dur. Bazı Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı glikozaminlere ve muramikasitlere saldıran lizozim ile tamamen parçalanabilmektedir (URL-2).



**Şekil 1.** Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı (URL-3).

### 1.2.1. *Bacillus* Cinsi

*Bacillus* cinsi çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Çoğu kötü şartlara dirençlidir. Genelde gram pozitiflerdir. Peritrik flagellalı ve flagellaları hareketlidir. Aerobik ve fakültatif anaerobtur. Çoğunda oksijen terminal elektron alıcısıdır. Endospor oluştururlar. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır (Buchanan ve Gibbons, 1974).

*Bacillus*'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37°C da ve pH 7 civarında ürerler. Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Taubman, 1992).

*Bacillus* cinsi uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğu endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus*'ların hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamiyle örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus*'lar genellikle karbonhidrat kapsülü bulundururlar. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilebilirler (Robinson, 1985).

Katalaz ve asit üretirler ama gaz oluşturmazlar. *Bacillus*'ların bazı türleri yiyecekler için önemli olabilir. Bazı *Bacillus*'ların proteolitik enzimleri peynir yapımında kullanılabilir (Bonwart, 1989).

*Bacillus* türlerinin teşhisi ve türler arasındaki farklılıkların tespiti için spor ve sporangiyum morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre de *Bacillus*'lar 3 grupta toplanmıştır. Birinci grup *Bacillus*'larda kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Bu her iki grupta sporangia şişmemiştir. Sporlar elips veya silindirik şekilli, sentral veya terminal konumdadır. Gram pozitiflerdir. A grubu ve B grubu arasındaki

fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1µm den küçük, B alt grubunda ise 1µm den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. megaterium* ve *B. cereus*; B alt grubuna örnek olarak da *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir. İkinci grupta yer alan *Bacillus* türlerinde sporangia şişmiştir. Sporları elips, sentral veya terminaldir. Bu grupta yer alan *Bacillus* türlerine örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir. Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporangia şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal veya terminal konumludur. *B. sphaericus* bu gruba örnek olarak verilebilir (Turnbell ve Kramer, 1991).

Bu cins içindeki bakterilerin çoğu patojen değildir. İki adedi insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan basillerdir. Bunlar da *B. anthracis* ve *B. cereus*'tur. *Bacillus anthracis* insan ve hayvanlarda antraks, şarbon, çoban çıbanı denilen hastalığın etkenidir. Hastalık *B. anthracis* sporlarınının zedelenmiş deri, mukozalar ve seyrek olarak solunum yolu ile akciğerlerden organizmaya girmeleri sonucunda oluşur. *B. anthracis*'ler buldukları yerden lenfa yolu ile kana yayılma ve orada çoğalma eğilimindedirler. *B. anthracis* giriş kapısına göre deri şarbonu, akciğer şarbonu, bağırsak şarbonu ve septisemiye sebep olur (Bilgehan, 1995).

#### **1.2.1.1. *Bacillus subtilis***

*B. subtilis* toz, toprak, gübre, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda bulunan bir bakteridir. Sütlü içeceklerin, ekmeğin, sebze ve meyvelerin bozulmasında etkindir. *B. subtilis*'in kültür süzüntülerinden elde edilenin adı verilen bu maddenin bazı bakterilere karşı inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bakteri aslında saprofit olmakla birlikte doğrudan doğruya doku ve özellikle göz içerisine girmesi sonucunda panoftalmi, iridoksilit gibi göz yangıları meydana getirebilir. *B. subtilis*'in besin zehirlenmesi yaptığından da şüphelenilmektedir (Bilgehan, 1995).

Başlangıçta 1835 yılında *Vibrio subtilis* adlı bu organizma 1872 yılında *Bacillus subtilis* adını almıştır. *Bacillus subtilis* çalışma yapılan ilk bakterilerden biridir. Bu bakteriler hücresel gelişme ve farklılaşma için iyi bir model organizmadır. *Bacillus subtilis* hücreleri çubuk şeklinde, toprak ve doğal bitki örtüsünde bulunan,

Gram-pozitif bakterilerdir (Tablo 1). *B. subtilis* mezofil ısı aralığında büyür. Optimum sıcaklık 25-35°C'dir. Stres ve açlık durumlarında *Bacillus subtilis*, bu sert koşullar altında hayatta kalmak için bir dizi stratejiler geliştirmiştir. Bir strateji örneği gerilime dayanıklı endosporlar oluşumudur. Başka bir strateji bakteri uyum sağlamak için rekombinasyon yoluyla dış DNA'yı almasıdır. Bununla birlikte, bu stratejiler zaman alıcıdır. *Bacillus subtilis* aynı zamanda, asit, baz, ozmotik ya da okside edici şartlar, ve ısı ya da etanol gibi bir çok stres durumuna karşı daha hızlı bir şekilde koruma kazanabilir. *Bacillus subtilis* patojenik değildir. Ancak nadiren gıda zehirlenmesine neden olabilir. Bunlar, mantar öldürücü olarak bitkilerde kullanılır. *Bacillus subtilis* ilgili bazı suşlar böcekler için toksin üretme kapasitesine sahiptir. Bu suşlar ayrıca bitkileri korumak için de kullanılabilir (URL-4).

**Tablo 1.** *Bacillus subtilis* mikroorganizmasının sınıflandırılması.

Alem	Eubacteria
Şube	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Familya	Bacillaceae
Cins	<i>Bacillus</i>
Tür	<i>Bacillus subtilis</i>

### 1.3. Antibiyotik Direnci ve Önemi

Son 50-60 yıl içinde kullanıma giren antibiyotikler insan yaşamında en önemli katkıyı sağlamış, ölümcül pek çok infeksiyon hastalığının başarıyla tedavisini olanaklı kılmıştır. İnsanlık tarihinin en önemli buluşlarından olan antibiyotikler, başta uygunsuz ve gereksiz kullanımları sonucu gelişen direnç nedeniyle etkilerini önemli oranda kaybetmişlerdir. Mikroorganizmalar kendilerini yok etmek için kullanılan antimikrobik maddelere karşı er ya da geç karşı koyma gücü yani direnç kazanmaktadır. Antimikrobik maddelere karşı gelişen direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek düzeyde çok önemli bir sorundur. Başta hastanelerde çok ilaca karşı dirençli kökenlerle gelişen hastane infeksiyonları hastanede kalışı ve ölüm oranlarını artırmakta ve oldukça fazla ek bir maliyet oluşmasına neden olmaktadır. Artık günümüzde sadece hastane kökenleri değil toplumdan kazanılmış kökenlerde de direnç önemli oranlarda artmakta bu olay sorunu daha da büyütüp ciddi boyutlara taşımaktadır. Bir antimikrobik maddeye



karşı dirençli hale gelen bir mikroorganizma türünde bu kemoterapötik maddeye yapıcı veya etki tarzı bakımından yakın diğer antimikrobiklere karşı da direnç gelişebilir, bu duruma çapraz direnç (cross resistance) denir. Mikroorganizmanın yapısı ve etkisi farklı birçok antimikrobik maddeye karşı dirençli hale gelmesi durumuna ise çok ilaca dirençlilik (multiple-drug resistance) denir. Mikroorganizmaların antimikrobiklere karşı gösterdiği direnç doğal (intrinsik) ve kazanılmış (genotipik, kalıtsal) direnç diye iki ana bölümde ele alınabilir (Öztürk, 2002).

İlaçlara karşı gözlenen direncin bir türü olan antibiyotik direnci, bakteri türlerinin antibiyotiklerle karşı karşıya kaldıklarında hayatta kalabilmelerini sağlar. Direnç kazanan patojen türler infeksiyonlara neden olurlar ve ilaçların eski konsantrasyonlarında veya daha önceden kullanılan ilaçlar ile tedavi edilemezler. Çoklu ilaç dirençli suşlar (MDR) olarak adlandırılan, klinik yönden önemli patojenler çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilirler. En basit vakalarda bile, ilaç dirençli organizma birinci kuşak antibiyotiklere direnç kazanabilir ve bu yüzden ikinci kuşak antibiyotikler ile tedavi edilmesi gerekir. Bu nedenle MDR mikroorganizmalara karşı alternatif tedavi yöntemlerine büyük ihtiyaç duyulmaktadır ve henüz kullanılmamış ilaç hedeflerine karşı yönlendirilecek yeni antibiyotik ajanlar için araştırmalar yapılmasını zorunlu kılmaktadır (Richet vd., 2001; Payne vd., 2004).

Bakterilerin antibiyotiklere direnci ile ilgili bir diğer durum tolerans'tır. Tolerans beta-laktamlar gibi bakterisit antibiyotiklerin etkisiyle bir bakteri suşunun üremesinin inhibe olması fakat bakterinin ölümünün çok daha yüksek konsantrasyonda veya uzun zamanda sağlanmasıdır (Michel ve Goessens, 1984).

#### **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 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 vd., 2001) (A, B, C, D, X ve Y familya 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 Polimerazlar**

DNA polimerazlar, DNA sentezinden sorumlu enzimlerdir ve farklı hücrel organizmalar tipik olarak farklı DNA polimeraz tipleri kullanırlar. Replikatif DNA polimerazlar genom replikasyonunun esas kısmının sentezini gerçekleştirirler. Bununla beraber çeşitli özelleşmiş polimerazlar, zarar görmüş DNA'yı tamir ederler veya Okazaki fragmentlerinden RNA primerlerinin uzaklaştırılmasını sağlarlar (Örn: DNA polimeraz I). Aminoasit sekans homolojisi çalışmalarına ve üç boyutlu yapı analizlerine dayandırılarak, DNA polimerazlar altı familyaya ayrılırlar: A, B, C, D, X ve Y (Delaru vd., 1990; Trincao vd., 2001).

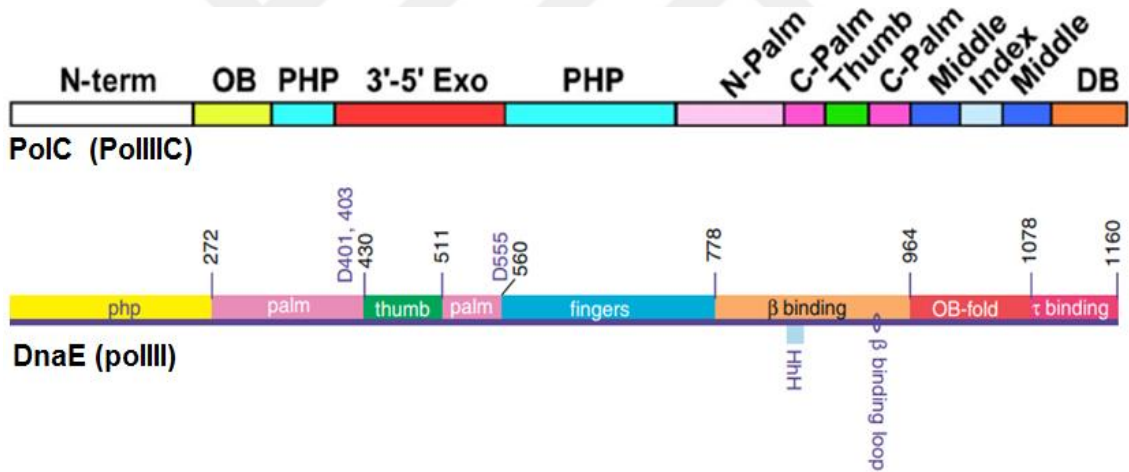
C familyası içerisinde yer alan replikatif DNA polimeraz III enzimleri, hücre içi zorunlu replikasyon enzimleridir ve bütün bakteri sınıflarında bulunurlar (Inoue vd., 2001).

Ayrıca bakteriyal replikatif DNA polimerazlar, B familyasında yer alan ökaryotik, bakteriyofaj ve arkaea replikatif polimerazlarından önemli oranda farklılık gösterirler (Filee vd., 2002).

Bakterilere ait replikatif DNA polimerazlar, primer yapılarına göre iki farklı tipe ayrılırlar. Replikatif DnaE polimerazı gram negative bakterilerde bulunurken, replikatif PolC polimerazı gram pozitif bakterilerde bulunur (Huang ve Ito, 1999).

Pol C tipi polimerazlar *polC* geni tarafından kodlanırken DnaE tipi polimerazlar *polE* geni tarafından kodlanır. PolC grubu replikatif polimerazlar kendi grupları içerisinde ve DnaE grubu replikatif polimerazlar da kendi grupları içerisinde yüksek oranda benzerlik gösterirken, PolC ve DnaE enzimleri, birbirlerine baz dizilimleri açısından %20'den daha az bir benzerlik gösterirler. Ayrıca bu iki farklı bakteri grubunun replikatif enzimleri, domain organizasyonu yönünden de birbirinden farklıdır. PolC proteini, DnaE proteininde bulunmayan işlevsel bir 3'→5' proofreading (hata düzeltme) domainine sahiptir (Şekil 2). Bu domain organizasyonundaki farklılıktan dolayı, PolC ve DnaE replikatif enzimleri nükleotit analogları ile yapılan inhibisyon deneylerinde farklı duyarlılık gösterirler (Wright vd., 2005).

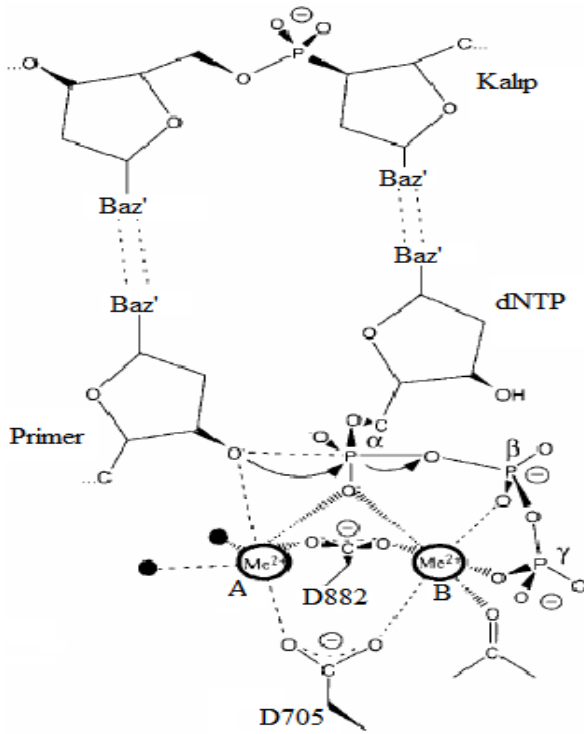
İnhibisyondaki bu farklılık, her bir replikatif enzimin domain organizasyonunun ve aktif bölgelerinin yapısındaki önemli farklılıklardan kaynaklanır.



**Şekil 2.** PolC (Evans vd., 2008) ve DnaE (McHenry, 2011c) replikatif enzimlerin domain organizasyonundaki farklılığın şematik olarak gösterimi.

*E. coli* ve *B. subtilis* DNA polimeraz III, üzerinde en fazla karakterizasyon çalışması yapılan enzimlerdir. Her iki enzim de diğer alt birimlerine ihtiyaç duymaksızın *in vitro*'da sentetik DNA substratları üzerinde polimerizasyon aktivitesi göstermektedir. *E.coli* DNA polimeraz III proteini (DnaE), 1160 aminoasitten oluşur ve 129.9 kDA'luk tek bir polipeptittir (URL-5). *B.subtilis* DNA polimeraz III proteini ise (PolC), 1437 aminoasitten oluşur ve 164.5 kDA'luk tek bir polipeptittir (URL-6). DNA polimerazlar (DNA-bağımlı DNA polimerazlar), DNA'ya hibridize olmuş primerin 3'-OH ucuna deoksiribonükleotitlerin eklenmesini katalizlerler (Kornberg ve Baker, 1992).

Bugüne kadar kristal yapıları bilinen DNA polimerazlara ait superimpoz çalışmaları, nükleotitin DNA'ya eklenmesinde iki metal iyon mekanizmasını desteklemektedir. Bu mekanizma, tüm DNA polimerazlarda aynı şekilde gerçekleşmektedir (Şekil 3). DNA sentezi esnasında, baz dizisine uygun olarak gelen dNTP'ye, iki magnezyum iyonu eşlik etmektedir. Magnezyum iyonlarından bir tanesi nükleotitin fosfatına bağlanırken, ikincisi DNA ve RNA polimerazlarda korunmuş olan aspartik asit aminoasitlerine bağlanır. Aspartik asite bağlanan metal iyonu, primere ait 3'-OH'a düşük afinite gösterir. Bu da primerin 3'-O- kısmının nükleotitin  $\alpha$ -fosfatına yönelmesini sağlar. Nükleotit üzerindeki metal iyonu pirofosfatın ayrılmasını kolaylaştırır ve her iki metal iyonu birlikte polimeraz yapısının stabilizesini sağlar (Thomas, 1998).



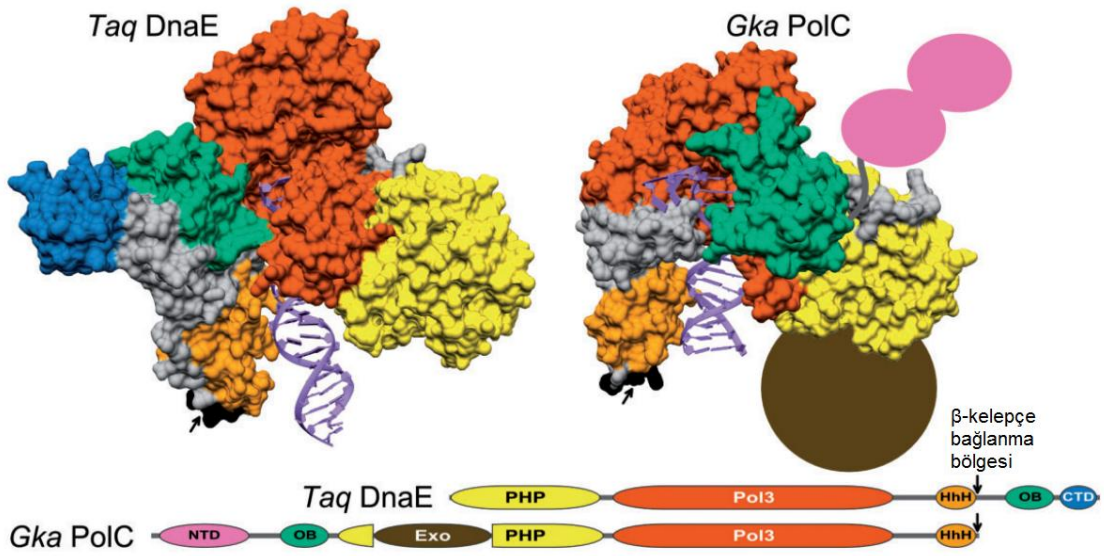
**Şekil 3.** Nükleotit trifosfatın DNA'ya eklenmesinde iki metal iyonlu mekanizma

#### 1.4.2. C Familyası DNA Polimerazlar (PolIII $\alpha$ )

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  $\alpha$ -alt

ünite (PolIII $\alpha$ ) 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 $\alpha$  alt ünitesini (Pol III  $\alpha$ ) veya homologunu 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 (Budak, 2016).

PolIII $\alpha$  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 $\alpha$ 'dır. PolC ise *Bacillus subtilis* gibi düşük GC içeriğine sahip Gram (+) bakteriler için tipik örnektir. Bu iki farklı polIII $\alpha$  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 fosfataz (PHP) domaine, "palm", "thumb" ve "fingers" dan oluşan polimeraz çekirdek,  $\beta$ -clamp bağlanma motifi tarafından takip edilen ardışık heliks-hairpin-heliks (HhH)<sub>2</sub> motiflerine sahiptir ve hepsi aynı sırada düzenlenmiştir (Şekil 4).



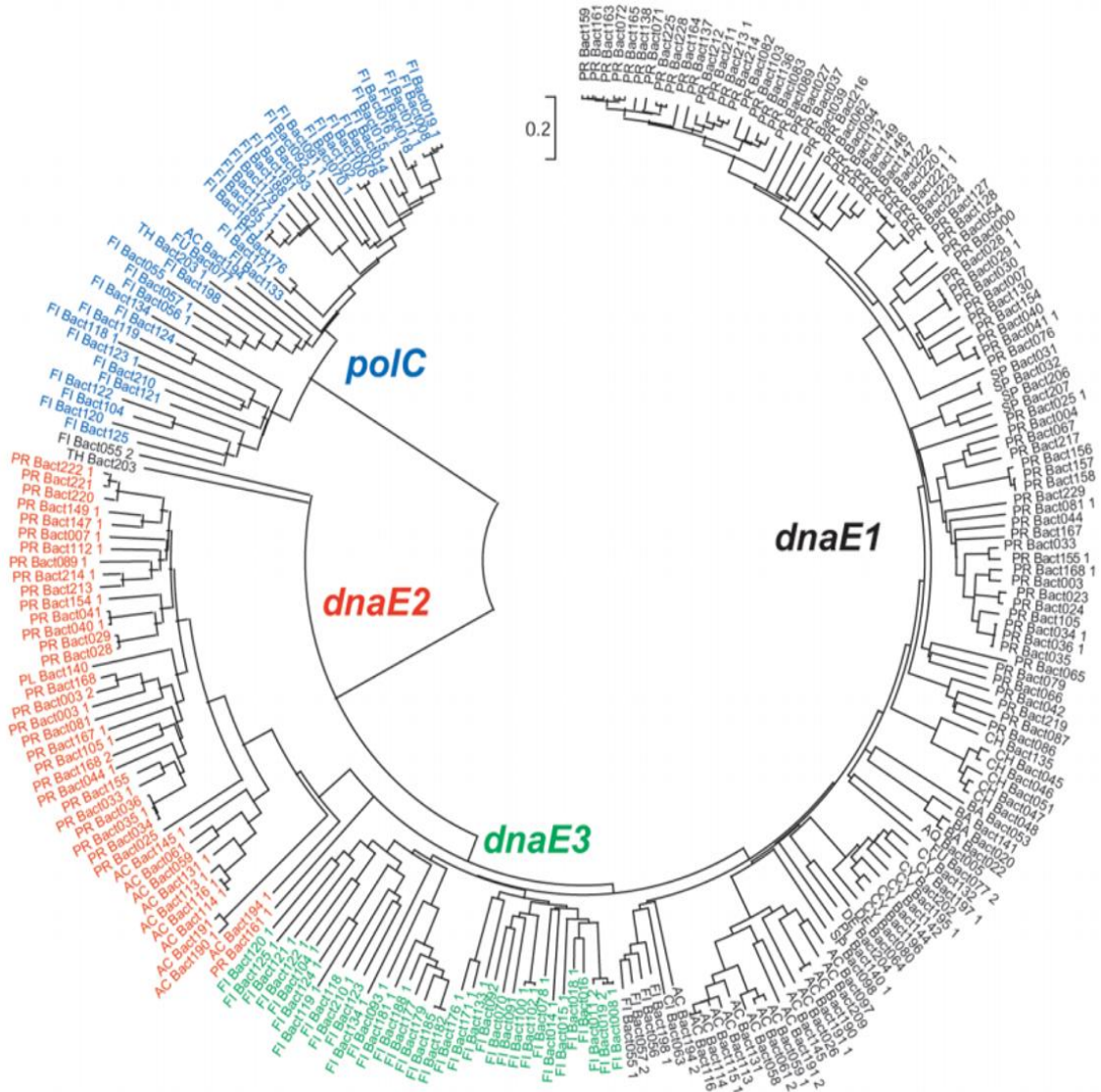
Şekil 4. Domein organizasyonu açısından PolC ve DnaE'nin şematik gösterilmesi (Timinskas vd., 2013).

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  $\epsilon$  tarafından 3'→5' ekzonükleaz fonksiyon (görev) yerine getirilir.

Bakteri hücrelerindeki farklı PolIII $\alpha$  alt ünitelerinin ve rollerinin sayısı düşünülürse, dikkate değer farklılıklar vardır. Yaygın olarak çalışılan *E. coli* tek bir DnaE tipi PolIII  $\alpha$  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 $\alpha$ '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 gerçekleştirdiği ve daha sonra polC görevi alarak uzun DNA zincirinin hızlıca sentezini gerçekleştirdiği bulunmuştur (Sanders vd., 2010). Bu

bağlamda *Bacillus subtilis* DnaE, RNA primerini uzatan ve daha sonra processive (ilerleyen) replikasyon yolunu açan ökaryotik Pol $\alpha$ ' yı hatırlatır (Perera vd., 2013).

Filogenetik analizler, PolC ve DnaE polimeraz grupların birbirinden iyice ayrıldığını ortaya koymaktadır ve farklı derecelerde değişim gösterir (Şekil 5). PolC polimerazlar *Bacillus subtilis*'in iki tane gerekli PolIII  $\alpha$  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 5. C familya DNA polimeraz III $\alpha$ 'ün filogenetik gruplandırılması (Timinskas vd., 2013).



Şu ana kadar yapılan çalışmalarda C familyası polimerazı taşımayan tek bir bakteri genomu bulunamamıştır.

#### **1.4.3. Yeni Antibakteriyal Hedef Sistem Olarak Replikatif DNA PolIIIα**

Bakteriyal DNA polimerazlar bakteri DNA replikasyonunda oynadığı önemli rolü nedeniyle, anti-bakteriyal yeni ilaçlar için önemli hedef haline gelmiştir. Bitkilerden doğal bileşiklerin tanımlanması DNA replikasyonu üzerinde etkili olan anti-bakteriyal ilaçların keşfedilmesinde önemli rol oynayacaktır. 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.

#### **1.5. Yeni Antibakteriyal Moleküllerin Bitkilerde Araştırılması**

Bitkilerin hastalıkları iyileştirme gücüne olan inanç neredeyse insanın var olduğu döneme kadar uzanır. İnsanlık tarihi boyunca bitkilerin farklı formları, açık yaralara lapa haline getirilip sürülerek uygulanmış, kaynatılarak suyundan faydalanılmış veya direk gıda olarak tüketilmiştir. Dünyadaki tüm kıtalarda bitkilerin kullanıldığına dair sayısız tarihi kanıtlara rastlamaktayız. Hatta altmış bin yıl önce yaşamış olan neandertallerin, bugün Irak bölgesinde bulunan “hollyhock” bitkisini kullandıkları keşfedilmiştir (Cowan, 1999).

Dünya geneline baktığımızda tropikal ülkelerde ölümlerin yaklaşık yarısı enfeksiyon kaynaklı ölümlerdir. Afrika’da her yıl 300.000 çocuk *E. coli*, *Shigella* ve *Salmonella* türlerine ilişkin mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlardan ölmektedir. Belki bu durum ülkelerin sosyo-ekonomik durumuna bakıldığında şaşırtıcı değildir, ancak gelişmiş ülkelerde de enfeksiyona bağlı hastalıklar ve ölümler her geçen gün artmaktadır. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri’nde yapılan araştırmalara göre, 1981 yılında enfeksiyona bağlı ölümler 5. sırada iken, 1992 yılında %58 artışla 3. sıraya ulaşmıştır (Karou vd., 2007; Iwu vd., 1999).



Bu durum enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejiler geliştirmeyi zorunlu kılmıştır. Bu nedenle farmakologların ve özellikle mikrobiyologların antimikrobiyal ajan arayışında bitkilere başvurmaları oldukça doğaldır. Zamanla, mikroorganizmalar ilaçlara karşı direnç kazanmakta ve bunları yeni üyelerine aktarmaktadır. Bu durum ise ilaçların kullanım ömrünü sınırlamakta ve antimikrobiyal ihtiyacını sürekli kılmaktadır. Böylece bitkiler yeni antimikrobiyal arayışlarda klinik mikrobiyologlar için kaçınılmaz alt yapıyı oluşturmaktadır. Ayrıca, tarih boyunca bitkilerin tecrübe edilmiş olması avantajından yola çıkılarak, araştırılan bitki içeriği ve kullanımı ile ilgili edinilmiş bilgiler, laboratuvarlarda bilimsel olarak da araştırılmış olur. Sonuçta, kullanılan bitkilerin mikroorganizmalar üzerine etkilerinin ortaya çıkarılması bu bitkilerin tıbbi amaçla kullanımının önünü açacak aynı zamanda halkın yanlış kullanımlarının da önüne geçebilecektir (Cowan, 1999).

Bu çalışmada *D. kaki* bitkisine ait yaprak ve meyve organları değerlendirilmiştir. Bitkinin genel özellikleri aşağıda özetlendiği şekildedir.

### ***Diospyros kaki***

Trabzon üzerinden diğer bölgelere dağıldığı için yaygın olarak Trabzon hurması adı ile bilinen *D. kaki* anavatanı olarak kabul edilen Çin'den; önce Japonya'ya, sonrasında ise diğer ülkelere yayılmıştır (Özcan, 2005).

Trabzon hurmasının, Türkiye'de bir çok bölgede yetiştiriciliğinin rahatlıkla yapılabileceği ve 74 farklı kültür varyasyonunun bulunduğu bildirilmektedir (Bayazit vd., 2012).

Meyve iriliği, rengi ve şekli bakımından çeşitler arasında büyük farklılıklar bulunur. Meyve ağırlığı 50 – 300 g arasında değişir. Genelde meyve şekli çeşitlere göre konik, uzun konik, yuvarlak ve basık arasında değişim göstermektedir. Bazı çeşitlerin meyvelerinde köşelilik, bazılarında meyve etrafında bir bilezik bulunmaktadır. Derim oluşumunda meyve kabuğu rengi yeşilimsi-sarı, turuncu-sarı, turuncu, turuncu-kırmızı; fi zyojik olgunlukta ise turuncu, koyu turuncu, kırmızı-turuncu, kırmızı olabilmektedir (Şekil 6). Trabzon hurması meyveleri askorbik asit ve fenolik bileşikler açısından çok

zengin olması, bu meyvenin antioksidan aktivitesinin yüksek olmasını sağlamaktadır. Özellikle A ve E vitaminleri yanında zengin karbonhidrat ve tanen içeriğine sahiptir (Parseker vd., 2008).

Trabzon hurması meyveleri, taze tüketim yanında, kurutulularak da tüketilebilmektedir. Özellikle Uzakdoğu ülkelerinde, kuru maddesi yüksek olan ve taze tüketim için uygun olmayan çok buruk çeşitlerin meyveleri, bütün olarak veya iki ya da dörde bölünerek ipe dizilmekte ve güneşte yaklaşık olarak 1 ay süreyle kurutulmaktadır. Ayrıca özel kurutma dolaplarında (60°C'de 12 saat) da kurutma işlemi yapılmaktadır (Tuzcu ve Yıldırım, 2000).

Yapraklanma çeşit ve bölgeye bağlı olarak mart ayı ortası veya nisan başında olur. Sürgünler uzamaya başlar ve 4-6 hafta sonra durarak pişkinleşmeye başlarlar (Şekil 6). Basit yapraklı bir türdür ve yaprak şekli oval ya da sivri olmaktadır. Yapraklar genellikle 5- 15 cm uzunluğunda ve 5 – 10 cm genişliğindedir. Yaprak kenarları düzdür. Yapraklar ve orta damar kalın, yaprak sapı kısadır. Trabzon hurması kışın yapraklarını dökmektedir. Çeşide bağlı olarak Trabzon Hurması yaprakları sonbaharda yeşilden sarıya, bazı zamanda kırmızıya kadar değişim gösterir. Yapraklar ne kadar uzun süre yeşil kalırsa ertesi yılın meyve verimi için o kadar iyidir. Don, rüzgar veya hastalıklar nedeniyle meydana gelecek erken yaprak dökümü mevcut meyvelerin küçük kalmasına neden olduğu gibi; ertesi yılda küçük çiçeklerin oluşmasına dolayısıyla meyvelerin irileşmemesine ve düşük meyve verimine neden olur (Kitagawa ve Glucina, 1984).



**Şekil 6.** Çalışmada kullanılan bitki kısımları (URL-7).

## 1.6. Çalışmanın Amacı

Günümüzde bakteri DNA polimerazlarına yönelik herhangi bir antibiyotik bilinmemektedir. Buna karşın farklı DNA polimeraz ailelerine yönelik inhibitör etkinin çeşitli bitki kısımları kullanılarak araştırılması çalışmaları yoğunlukla devam etmektedir. Çok sayıda endemik bitkiye ev sahipliği eden Rize ili zengin bitki çeşitliliğiyle bu çalışmada kullanılan bitki de dahil olmak üzere birçok bitkiyi bünyesinde barındırmaktadır. Planlanan bu tezin amacı, bölge florasında yer alan ve yukarıda özelliklerinden bahsedilen *D. kaki* bitkisinin yaprak ve meyve kısımlarından hazırlanan özütlerde Gram pozitif bakteriler için model olarak kullanılan *B. subtilis* bakteriyal replikatif polimeraz III $\alpha$  (PolC)'ye yönelik inhibitör etkinin var olup olmadığı ve inhibitör etki gösteren bitki organlarındaki major bitki bileşenlerinin belirlenmesidir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar, Besiyeri, Enzimler ve Vektörler

Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar

<u>Kimyasallar</u>	<u>Firma Bilgileri</u>
Dikloro Difenil Trikloroethan (DTT)	Fisher scientific
β-merkaptoetanol	Sigma
Agaroz	Sigma
Bovine serum albümin (BSA)	Sigma
Akrilamid	Merck
Bisakrilamid	Amresco
Amonyum persülfat	Sigma
Asetik asit	Sigma
Gliserol	Sigma
Glisin	Merck
Glukoz	Merck
dNTP	Fermentas
Brom fenol mavisi	BioRad
Coomassie brillant blue R 250	BioRad
Etidyum bromür	BioRad
Ampisillin	Sigma
İzopropanol	J.T. Baker
Metanol	J.T. Baker
Etanol	Merck
TEMED	BioRad
Üre	Merck
Borik asit	Merck
Nonidet P40	Sigma
SDS	Merck
NaCl	Fluka
KCl	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Merck
Tris	Merck
EDTA	Merck
Agar	Merck

Çalışmada Maniatis ve arkadaşlarına göre (1989) hazırlanan LB (Lauria-Bertain) besiyeri 5 g maya özütü, 10 g tripton ve 5 g NaCl’nin 1 litre suda çözülmesiyle hazırlandı. LBA ise 1 litre LB besiyerine 15 g agar ilave edilerek hazırlandı. Son olarak 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve kullanıldı.

Çalışma esnasında; Lizozim (Fermentas), RNaseA (Fermentas), High Fidelity *Taq* DNA polimeraz (Fermentas) ve T4 DNA ligaz (Fermentas) enzimleri kullanıldı. Çalışmalarda vektör olarak ise Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit (İnvitrogen) kullanıldı.

## **2.2. *B. subtilis* Replikatif DNA Polimeraz III $\alpha$ proteininin (PolC) Rekombinant Olarak Üretilmesi**

### **2.2.1. Genomik DNA İzolasyonu**

-80°C’de gliserol stoktan alınan *B. subtilis* hücreleri 3 mL LB sıvı besiyerine eklenerek gece kültürü yapıldı. 16 saatlik inkübasyon süresi sonrasında ise 13.000 rpm’de 2 dakika santifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürmenin ardından üst faz atılarak GF-1 Genomik DNA İzolasyon (Vivantis) kiti esas alınarak DNA izolasyonu yapıldı.

### **2.2.2. Replikatif DNA Polimeraz III $\alpha$ (PolC)’nin PZR İle Çoğaltılması**

PZR reaksiyonu toplam 50  $\mu$ L hacimde 1X *Taq* polimeraz tampon, 300 ng her bir primer, 0,2 mM her bir dNTP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ L *B. subtilis* genomik DNA ve 2 ünite High Fidelity *Taq* polimeraz kullanılarak yapıldı.

*B. subtilis* PolC-F\_5’-ATGGAACAGTTATCAG-3’ ve *B. subtilis* PolC-R\_5’-GAACAGTGACAATTGG-3’ primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun şartları aşağıda verilmiştir.

1. Ön denatürasyon 94°C’de 2 dakika
2. Ayrılma 94°C’de 45 saniye
3. Primer bağlanma 47°C’de 1 dakika
4. Sentez 72°C’de 9 dakika
5. Son sentez 72°C’de 20 dakika

2-4. basamaklar 30 kez tekrar edildi. PZR ürünü %1’lik agaroz jelde yürütüldü.

### 2.2.3. *B. subtilis* Polimeraz III $\alpha$ (PolC) Geninin pET100/D-TOPO Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

GF-1 Clean-up kiti kullanılarak temizlenen PZR ürünü İnvitrogen pET100/D-TOPO kitine göre şartlar belirlenip gece boyu 16°C’de ligasyon yapıldı. *E. coli* DH5 $\alpha$ ’ya transforme edilen ligasyon ürünü Ampisilin içeren LBA besiyerinde 37°C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petride oluşan kolonilerden üçer adet seçilerek 3 mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerlerine ekim yapılarak 37°C’de 16 saat boyunca gece kültürü yapıldı. Kültürler 13000 rpm’ de 1 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Ardından plazmit izolasyonu yapıldı.

Plazmit izolasyonu manuel yöntemle yapıldı. İzolasyonda Solusyon I ve günlük olarak hazırlanan Solusyon II adı verilen çözeltiler kullanıldı.

1. Solusyon I: 25 mM Tris-HCl (pH:8,0), 50 mM glukoz, 10 mM EDTA (pH:8,0), 4 mg lizozim
2. Solusyon II: 0,2 NaOH, %1 SDS

Transformasyon işlemi sonucunda seçilip büyütülen saf koloni mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 13.000 rpm’de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Ardından solusyon I’den 200  $\mu$ L eklenerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Süre sonunda solusyon II’den 400  $\mu$ L eklendi, hafifçe alt üst edildi. 5 dk buzda bekletildi. Buzda bekletme işlemi sonrasında 300  $\mu$ L amonyum asetat eklendi, alt üst edildi. 10 dk buzda bekletildi. Ardından 11000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. İçerisinde 100-700  $\mu$ L izopropanol bulunan mikrosantrifüj tüpüne santrifüj işlemi yapılmış tüpün süpernatantından 600  $\mu$ L eklenerek 1-2 dk da bir alt üst edilmek üzere 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin ardından 13.000 rpm’de 15 dk çöktürülerek üst faz döküldü. Mikrosantrifüj tüpünde kalan pellet üzerine 500  $\mu$ L %70’lik soğuk EtOH ilave edilerek çözüldü ve 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen üst faz iyice dökülerek 37°C de kurutma işlemine tabi tutularak dipteki sıvının tamamen uçması sağlandı. Kurutma işleminden sonra pellet 60  $\mu$ L RNase içeren TE tamponda çözüldü. Elde edilen plazmit %1’lik agaroz jelde gen içermeyen TOPO® vektörü kontrol olarak kullanılarak yürütüldü ve klonların doğruluğu belirlendi.

#### **2.2.4. Klonlanan *B. subtilis* Polimeraz IIIa (PolC) Geninin Sekanslanması ve Sekans Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

%1'lik agaroz jelde yürütülerek doğruluğu belirlenen klonların tekrar gece kültürü yapıldı ve 13000 rpm' de 2 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü. Çöktürme sonucunda elde edilen pelletler Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kiti (ABD) kullanılarak plazmit DNA purifikasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi tamamlanan plazmitler MacroGen-Europe (Hollanda) şirketine gönderilerek sekans analizleri yaptırıldı. DNA baz dizin analizi için MacroGene gönderilen örneklerin sonuçları ExPasy (<http://web.expasy.org/translate/>) ve Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programları kullanılarak değerlendirildi.

#### **2.2.5. *E. coli* BL21 Hücrelerinde PolC Ekspresyonunun Gösterilmesi**

Plazmitlerden rekombinant olduğu belirlenenler ekspresyon için *E. coli* BL21 (DE3)Lys hücrelerine transforme edildi. Petrilere birer koloni seçilerek ekspresyon için kullanıldı. Ekspresyon için seçilen tek bir koloni, 5 mL 50 µg/ml Ampisilin içeren LB besiyerine ekilerek 37°C'de gece kültürü yapıldı ve daha sonra Optik Dansite (OD)'si 0,1 olacak şekilde ampisilin içeren 200 mL' lik LB besiyerine yeniden ekildi. 37 °C'de hücre yoğunluğu 0,6 OD'ye ulaşana kadar yaklaşık 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre yoğunluğu 0,6 OD'ye ulaştığında, son hacim 0.1 mM olacak şekilde IPTG (izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozit) ile indükleme yapıldı ve 18°C sıcaklıkta yeniden gece boyu indüklemeye devam edildi. İnkübasyonun tamamlanması sonrası hücre kültürünün 5 dakika buz üzerinde bekletilmesinin ardından, 7000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant iyice uzaklaştırıldı. Tüpte kalan pellet üzerine; 50 mM Tris (pH: 7,4), 500 mM NaCl, 2 mM DTT ile hazırlanan tampon eklendi ve pipetleme yapılarak çözülmesi sağlandı. Daha sonra 20 mg/mL lizozim eklendi ve 30 dk buzda bekletildi. Süre sonunda ise sonikatör yardımıyla 30 saniye çalışma 45 saniye aralık vermek üzere 30 dakika boyunca hücrelerin patlatılması sağlandı. Sonikatörde hücre patlatılması işlemi sonrasında 20 dk 8000 rpm'de 4 °C'de santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı alındı. Proteinin büyüklüğünün doğrulanması amacıyla, hazırlanan %8' lik SDS-PAGE' de yürütüldü.

### 2.2.6. SDS – PAGE Hazırlanması

Ekspresyonun tamamlanmasından sonra elde edilen süpernatanttan proteini görebilmek için SDS içeren jel hazırlandı. Süpernatanttan 30 µL, yürütme boyasından 10 µL alınarak mikrosantrifüj tüpüne konuldu. İyice pipetlenerek hazırlanan örnek 95°C’ de 5 dk boyunca ısı işlemine tabi tutuldu. Ardından Tablo 3’ te belirtilen 10X yürütme tamponu 1X olacak şekilde sulandırılarak hazırlanarak yürütme tamponu ile yürütme işlemi yapıldı.

**Tablo 3.** SDS – PAGE’ de kullanılan malzemeler.

SDS – PAGE Jel Boyası	10X SDS - PAGE Yürütme Tamponu	SDS – PAGE Yürütme Boyası
<ul style="list-style-type: none"><li>• 250 ml metanol</li><li>• 50 ml asetik asit</li><li>• 0,625 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 72 g glisin</li><li>• 15 g Tris - Base</li><li>• 50 ml SDS</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1 M Tris pH:6,8</li><li>• %10 SDS</li><li>• Gliserol</li><li>• 2-β-Merkaptoetanol</li><li>• Bromofenol Blue</li></ul>

### 2.2.7. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

SDS PAGE’de yürütülerek büyüklüğü doğrulanan proteinin saflaştırma işlemi Nikel Affinite kolon kullanılarak yapıldı. Saflaştırma işlemi 4°C soğuk odada yapıldı. Saflaştırma sırasında kullanılan tamponlar Tablo 4’te verilmiştir.



**Tablo 4.** Safılaştırmada kullanılan tüm çözeltiler.

<b>Kolon Temizleme</b>	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	500 mM İmidazol
<b>Kolon Dengeleme</b>	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
<b>Yıkama 1</b>	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	25 mM İmidazol
<b>Yıkama 2</b>	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	100 mM İmidazol
<b>Elusyon</b>	50 mM Tris (pH:7,4)
	500 mM NaCl
	2 mM DTT
	300 mM İmidazol

Safılaştırma işleminde ilk olarak kolon 500 mM imidazol içeren kolon temizleme çözeltisi ile iyice yıkanarak temizlendi ve ardından pellet çözme tamponu ile dengeye getirildi. Dengeye getirilen kolondan ilk olarak elde edilen proteinin supernatantı geçirilerek elde edilen fraksiyon toplandı. Sonrasında kolonu temizleme amacıyla tekrar pellet çözme tamponu kolondan geçirildi ve fraksiyon toplandı. İşleme sırasıyla yıkama 1 tamponu olan 25 mM imidazollü tamponun kolondan geçirilerek buna ait fraksiyonun toplanması ve 100 mM imidazol içeren ikinci yıkama tamponunun kolondan geçirilmesi ve fraksiyonunun toplanmasıyla devam edildi. Son olarak saf proteini almak için 300 mM imidazollü tamponla kolon ard arda 3 kez yıkanarak her bir yıkamada ayrı ayrı fraksiyon toplanılarak safılaştırma işlemi sonlandırıldı. Safılaştırma işleminin her bir basamağında ayrı ayrı elde edilen fraksiyonlar marker ile birlikte %8' lik SDS-PAGE' de yürütülerek proteinin saflığı tespit edildi.

### **2.2.8. Saf Proteine Diyaliz Uygulanması**

300 mM imidazollü çözeltinin kolondan geçirilmesiyle elde edilen saf protein SDS-PAGE'de marker ile yürütme işlemi sonrası diyaliz tüpüne alındı. Diyaliz çözeltisinde (50 mM Tris (pH:7,4), 50 mM NaCl, 1 mM DTT) hareket etmesi sağlanarak gece boyu bekletilerek diyaliz edildi. Diyaliz işleminin ardından %10 gliserol eklenerek protein -20°C' de saklandı.

### **2.3. Rekombinant Enzimin Aktivitesinin Gösterilmesi**

#### **2.3.1. Enzim Aktivite Deneylerinde Kullanılan Tamponlar**

Diyaliz sonrasında elde edilen proteinin aktivitesini görmek için; jelin hazırlanması, deneyin yapımı ve deneyin sonlandırılmasında kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

#### **5X TBE Tamponu (1 L)**

54 g Tris-Base

27,5g Borik Asit

3,36 g Na<sub>2</sub>.EDTA

#### **10X Annealing Tamponu**

500mM Tris-HCl (pH:7,8)

1M KCl

#### **20X Polimeraz Aktivite Tamponu**

10µL HEPES (pH:7,5) (1,5 M)

2 µL Nonident P40

2 µL BSA (100X)

2 µL DTT (1 M)

4 µL dH<sub>2</sub>O

### **%40 Akrilamid**

38g Akrilamid

2g Bisakrilamid

### **2X Sonlandırma Boyası**

% 95 formamide,

% 0,05 bromophenolblue,

% 0,05 xylene cyanol,

20 mM EDTA pH:8,0

### **2.3.2. Sentetik DNA Substratının Hazırlanması**

Çift zincir DNA substratları 1X annealing tamponu varlığında (10X Annealing Tampon: 500 mM Tris-HCl /pH: 7,8 ve 1000 mM KCl) 3 (kalıp DNA): 1 (primer DNA) oranlarında karıştırılarak hazırlandı. Her bir reaksiyon karışımı 5 dakika 95°C ısıtıcıda bekletilerek var olan tüm spesifik olmayan eşleşmelerin erimesi sağlandı. Ardından oda sıcaklığına kadar yavaş yavaş soğutulularak kalıp zincir ile primerin hibridize olması sağlandı.

DNA polimeraz aktivite deneyleri için sentetik DNA kullanıldı (Şekil 7). 5'-ucundan Cy5 ile işaretli primerin hibridize olduğu sentetik çift zincir DNA substrat olarak kullanıldı (sentez ürünlerinin takibi için primer 5'-ucundan floresan 5'-Cy5 ile işaretli olarak temin edildi).

#### **45/20-mer sentetik DNA kalıbı**

3' – GCAATCGGTGAGGCTCACACTCGACTGAAGTACGACAGCCACTAG – 5'

5' – CGTTAGCCACTCCGAGTGTG – 3'

**Şekil 7.** DNA polimeraz aktivite deneylerinde kullanılan primer 5'-ucundan Cy5 ile floresan işaretli çift zincir sentetik DNA substratı.

### 2.3.3. Primer Uzatma Deneyi ile Enzim Aktivitesinin Gösterilmesi

DNA polimeraz aktivite deneyinde Mix1 ve Mix2 adı verilen iki ayrı reaksiyon bileşeni kullanıldı. Mix1’de kullanılan polimeraz aktivite tamponu (PAB) günlük olarak hazırlandı. Mix1 hazırlanarak her tüpe 6,25 µL koyuldu. Ardından 1µL PolC enzimi eklendi. Daha sonra hazırlanan Mix2’den 2,75 µL eklenerek deney başlatıldı. Başlatılan deney tüpleri 30°C su banyosunda 10 dk bekletildi ve süre sonunda sırasıyla 10 µL 2X sonlandırma boyası ile deneyler sonlandırıldı. Sonlandırılan örnekler 95°C’de 5 dk ısı muamelesine tabi tutuldu ve örnekler 4°C’de yürütme işlemi yapılana kadar saklandı.

Mix1: 1µL PAB; 0,5 µL DNA (1 P:2 K); 1 µL PolC; 4,75 dH<sub>2</sub>O

Mix2: 2 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,75 µL dNTP (4mM)

### 2.3.4. Üre-PAGE Jelinin Hazırlanması

24 g üre tartılarak üzerine 10 mL 5X TBE tamponundan ve 22 mL %40’lık akrilamid eklenerek 96°C ısıtıcıda karıştırılarak çözüldü. Ardından filtre kağıdı ile süzme işlemi sağlandıktan sonra eksiklik varsa distile su ile son hacim 50 mL’ye tamamlandı. 150 µL %10 APS eklenerek iyice karıştırıldı ve son olarak 15 µL TEMED eklenerek jelin hazırlanması tamamlandı. Donması beklenildi.

### 2.3.5. Üre-PAGE’ de Örneklerin Yürütülmesi

Donan ve hazır hale gelen jel yürütme sistemine yerleştirilerek 5X TBE, 1X olacak şekilde sulandırıldı ve sisteme ilave edildi. 10 µL örnek alabilecek büyüklükte elde edilen kuyucuklar enjektör yardımıyla akrilamid kalıntılarından temizlendi. Her bir örnekten 6 µl jele yüklendi ve 1250 V’da 3 saat yürütme yapıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler Typhoon FLA9500 cihazıyla görüntülendi.

## 2.4. Metanolün *B. subtilis* PolC Aktivitesine Etkisinin Araştırılması

Metanol çözücü olarak kullanılacağından PolC aktivitesine etkisinin araştırılması işleminde yukarıda anlatıldığı gibi deney karışımları ve deneyi yürütme işlemi için

ÜRE-PAGE hazırlandı. Metanol %20 ve %35 oranlarında olacak şekilde iki ayrı konsantrasyonda hazırlandı. Metanolün aktiviteye etkisi bakılacağından Mix1'de özüt yerine %20 metanol konsantrasyonu için 2 µL, %35 metanol konsantrasyonu için ise 3,5 µL metanol kullanıldı ve Mix2 eklenerek deneyler başlatıldı. 30°C sıcaklıkta 1dk ve 10 dk olmak üzere iki farklı sürede deney tamamlandıktan sonra 2X sonlandırma boyası ile deneyler tamamlandı ve Typhoon FLA9500 cihazında görüntülendi.

## **2.5. Bitkilerin Yaprak ve Meyve Özütlerinde DNA Polimeraz İnhibisyonunun Araştırılması**

### **2.5.1. Bitkilerin Toplanması**

Bu çalışmada kullanılan *D. kaki* bitkisinin meyve ve yaprak örnekleri Rize Merkez Çamlıbel Mahallesi'nden 04/06/2014 tarihinde temin edilmiştir. Bitki 300m rakımda ve çayırılık alanda yetişmiştir.

### **2.5.2. Özütlerin Hazırlanması**

*D. kaki* bitkisinin meyve ve yapraklarından alınan taze örnekler blender yardımıyla toz haline getirildi. Oda şartlarında 5 g bitki dokusu 20 mL metanol içerisinde 2 saat süre ile ultrasonik banyoda ekstre edildi. Oluşan ilk özütün tamamı 50 mL falkon tüpe aktararak, 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst faz yeni bir falkon tüpe aktarıldı. Özütleme işleminin ardından elde edilen pellet iki kez 5 mL metanol ile aynı koşullarda özütlemeye tabi tutuldu. Son olarak tüm metanol özütleri birleştirilerek toplam özüt, hız vakum konsantratöründe 5 mL hacme konsantre edildi. 5 mL özüt yarıya bölünerek iki tüpe alındı ve bir yarısı kullanılmak üzere 4 °C'de ve diğer yarısı stok olarak -20 °C'de saklandı. Özütlerin 1 µL' si polimeraz aktivite deneylerinde kullanılarak inhibisyon özelliğine bakıldı.

### **2.5.3. Bitki Özütlerinde İnhibisyonun Araştırılması**

İnhibisyon deneyleri sırasında Mix1 ve Mix2 adı verilen iki ayrı bileşen kullanıldı. Öncelikle Mix1 hazırlandı ve 6,25 µL olacak şekilde tüplere aktarıldı. Üzerine 1 µL inhibitör etkisi bakılacak olan özüt örneklerinden ilave edildi. Daha sonra

hazırlanan Mix2'den 2,75 µL eklenerek deney başlatıldı. 30°C su banyosunda deney süresi olan 10 dk. bekletilerek sırasıyla 10 µL 2X sonlandırma boyası ile deneyler sonlandırıldı. Son olarak 95°C'de 5 dk ısı muamelesi yapılarak Üre-PAGE' de yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Mix1: 1 µL PAB; 0,5 µL DNA (25/40); 1 µL PolC Pol III; 3,75 dH<sub>2</sub>O.

Mix2: 2 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,75 µL dNTP (4mM).

## 2.6. Antimikrobiyal Aktivite

Agar kuyucuk difüzyon metodu ile özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri olup olmadığı belirlendi. Antimikrobiyal aktivite bakılırken özütlerin DMSO' da hazırlanmış çözeltileri kullanıldı (Perez vd., 1990; Ahmad vd., 1998).

### 2.6.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

Bir gecelik kültürlerinden Mueller-Hinton sıvı besiyeri içinde (MH) (Difco, Detroit, MI), yaklaşık McFarland 0.5 bulanıklıkta olacak şekilde (10<sup>6</sup>-7 koloni oluşturan birim (kob/mL)) sulandırmaları hazırlanan bakteriler, önceden hazırlanmış Mueller Hinton Agar besiyeri üzerine steril pamuklu çubuk yardımıyla yayma ekimleri yapıldı.

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

Ekim işlemi tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda ve 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Bitki stok özütlerinden 50 µL her bir kuyucuğa damlatılarak, bakteri içeren petripler 24 saat, maya içeren petripler 48 saat 36 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında inhibisyon zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçüldü. Standart çözücü kontrolü olarak DMSO, standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), mayalar için flukonazol (5 µg) kullanıldı.

## 2.7. *Diospyrus kaki* Bitkisi Yapraklarının Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD İle Aydınlatılması

Çalışmada bakteriyal replikatif DNA polimeraz inhibitör etkisi gösteren *Diospyros kaki* bitkisi yapraklarının fenolik bileşikleri HPLC-DAD ile aydınlatıldı.

Bitkinin taze yaprakları blender ile öğütüldü ve 92 g hurma yaprağı tartılarak 450 mL metanol ile 25°C' de karıştırıcıda 2 saatte elde edilen özüt mavi bant süzgeç kağıdı ile süzüldü. Özütün 10 ml'si evaporatörde kurutularak direkt metanol özütlerinin HPLC-DAD analizleri ve DNA polimeraz inhibisyonu için 2 ml metanolde çözüldü (39,8 mg/mL). Geri kalan özüt evaporatörde kurutularak sıvı-sıvı özütlemeye için 100 ml suda çözüldü. 20 ml Hekzan ile 3 kez sıvı sıvı ekstrasyonu yapıldı. Bu kısım istenmeyen apolar kısmın uzaklaştırılması için yapıldığından kullanılmadı. Kalan sulu kısım 20 ml Dietyl eter ile 3 kez sıvı sıvı ekstrasyonuna tabi tutuldu. Elde edilen eter fraksiyonu evaporatörde kurutuldu. 1843,6 mg eter özütü elde edildi. Bu özüt 8 ml metanolde çözüldü (230,45 mg/ml) ve HPLC-DAD ile analiz edildi.

HPLC-DAD analizleri 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.

Çalışma kapsamında 19 adet fenolik bileşik standardı kullanıldı. Bunlar; sirincik asit, kaemferol, timol, p-hidroksi benzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, ellagik asit, rutin, gallik asit, kuersetin, fisetin, mirisetin, apigenin, protokatekuik asit ve isoramnetin, klorojenik asit ve paenol'dür. Metanolde hazırlanan stok çözeltilerin 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 yurütuldu.

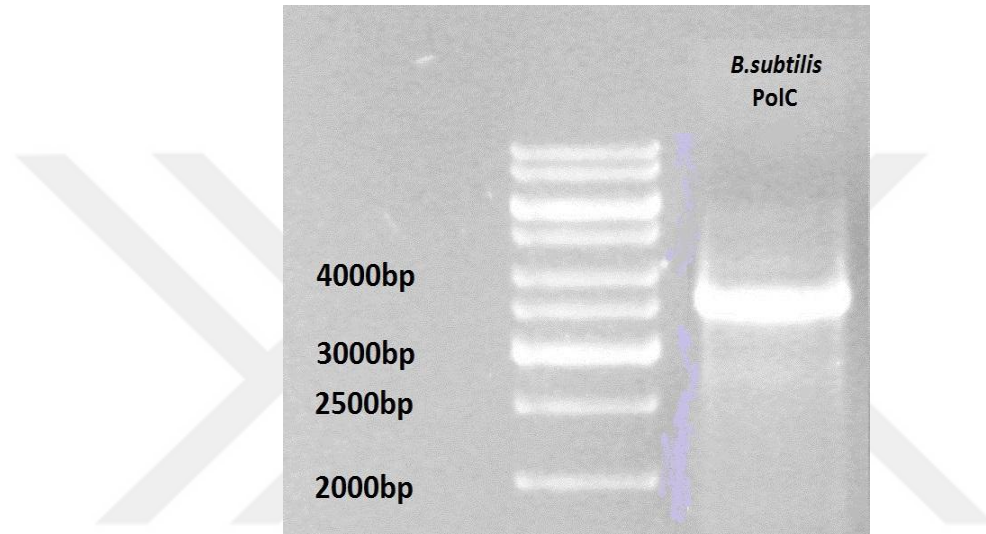




### 3. BULGULAR

#### 3.1. *B. subtilis* PolC Geninin oğaltılması

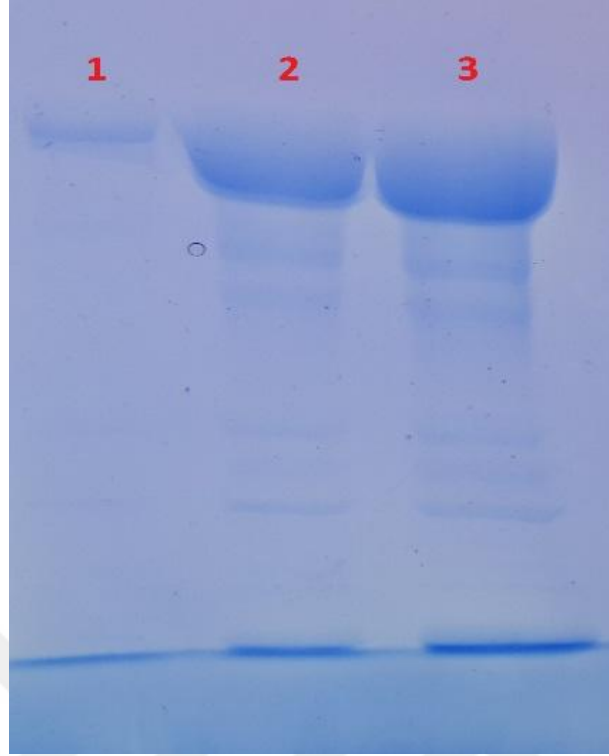
*B. subtilis* PolC geni iki kontrollü olarak çoğaltıldığı PZR sonrası %1'lik agaroz jel hazırlanıp Marker (Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder) ile birlikte yürütüldü (Şekil 8).



Şekil 8. PZR sonrası *B. subtilis* PolC geninin markerla agaroz jelde yürütülmesi.

#### 3.2. Protein İndüklenmesi

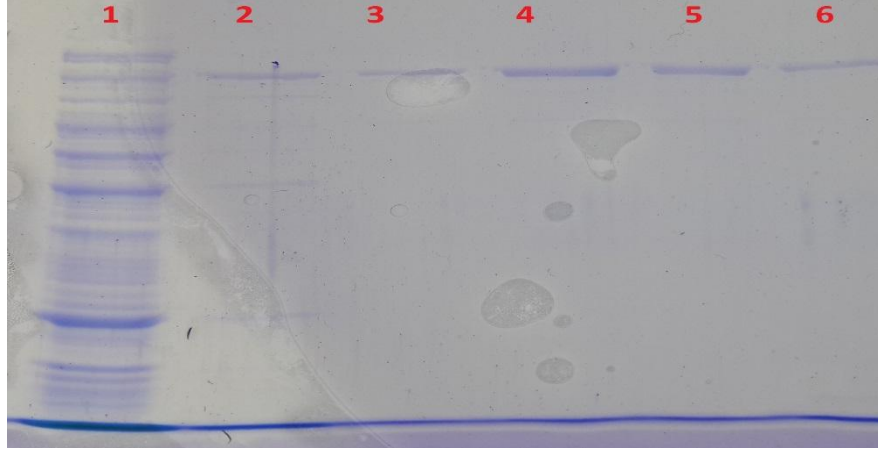
0,1 M IPTG eklenerek gece boyu indüklenen proteinler doğrulanmak üzere %8'lik SDS – PAGE' de yürütüldü. Hücrelerin sonikatör aracılığıyla patlatılmasının ardından yapılan soğutmali santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant ve pellet kontrol protein ile birlikte yürütüldü. Şekil 9'da 1 ile numaralandırılan örnek *B. subtilis* PolC proteininin kontrol enzimi olup sırasıyla pellet ve süpernatant kısımları gösterilmiştir.



**Şekil 9.** *B.subtilis* PolC proteinine ait pellet ve süpernatantın SDS-PAGE’de gösterilmesi

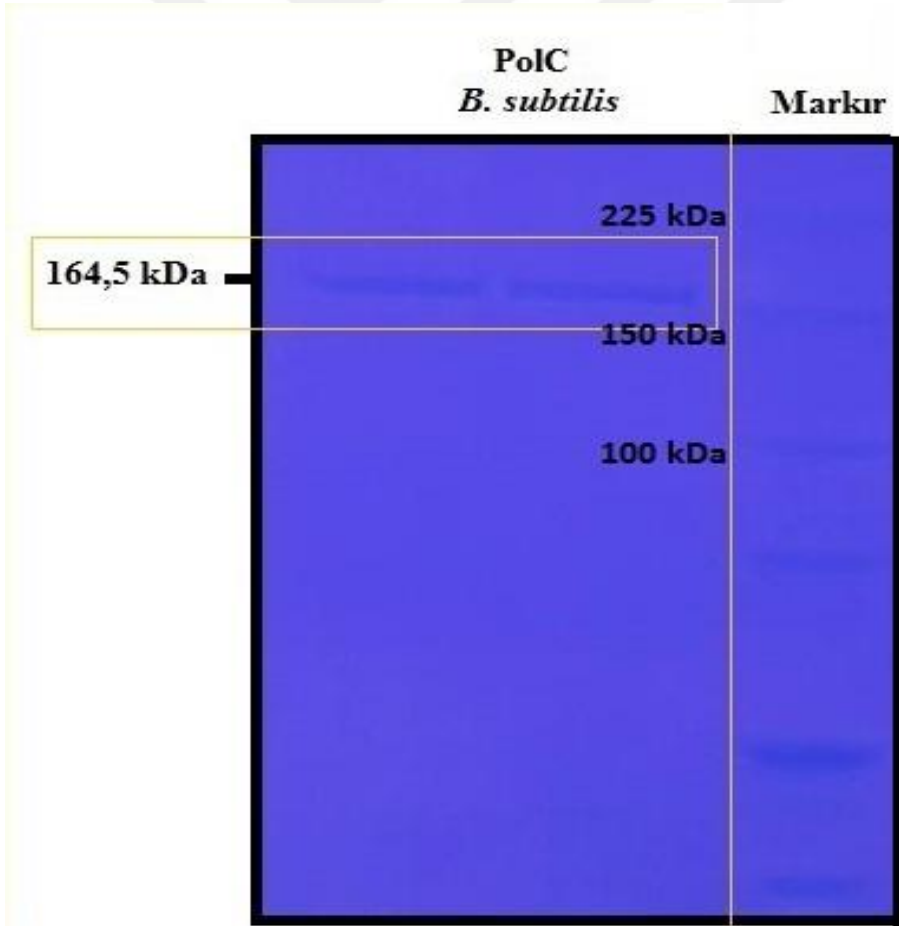
### 3.3. Protein Saflaştırılması

İndükleme işleminin ardından varlığı belirlenen proteinin saflaştırılması sonucunda toplanan her bir fraksiyon %8’ lik SDS-PAGE’ de yürütüldü. 1 numara olarak adlandırılan örnek PolC’ nin süpernatantının kolondan geçirilmesinin ardından yıkama solüsyonuyla elde edildi. 2 numara 25 mM imidazollü tampondan sonra elde edilen fraksiyondur. 3 numaralı örnek 100 mM imidazollü tamponun kolondan geçirilmesiyle toplanan fraksiyon olup 4, 5 ve 6 numaralarla adlandırılan örnekler 300 mM imidazol içeren tamponun kolondan geçirilmesiyle elde edilmiş olup *B. subtilis* PolC proteinini gösterir. Şekil 10’ da görüldüğü üzere konsantrasyon ve saflığa göre 4 ve 5 numaralı örneklerin diyalizi yapıldı.



**Şekil 10.** *B.subtilis* PolC enziminin her bir fraksiyonun ayrı ayrı gösterilmesi.

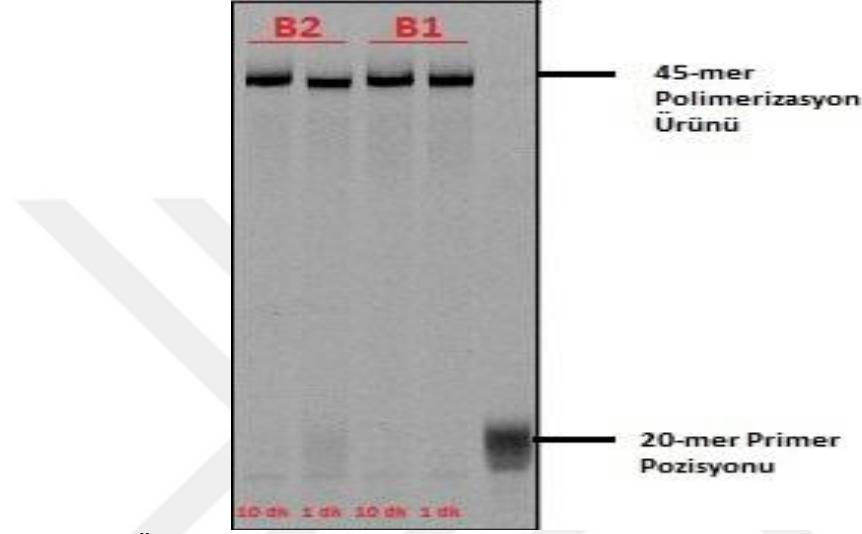
164,5 kDa olan *B.subtilis* PolC proteini 225 kDa'luk marker (New England Biolabs) ile yürütülüp doğruluğu gösterildi (Şekil 11).



**Şekil 11.** *B.subtilis* PolC proteinin Markırla SDS-PAGE' de gösterilmesi.

### 3.4. Saflaştırılan PolC Proteinin Aktivitesinin Gösterilmesi

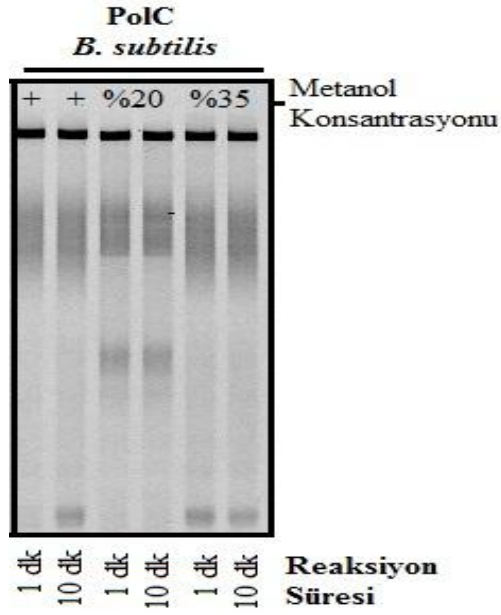
Saflaştırma işlemi yapılarak elde edilen *B. subtilis* PolC proteininden 1'er µL kullanılarak yapılan aktivite deneyleri sonucunda 20-mer primer pozisyonundan 45-mer pozisyonuna ürün oluşturması sonucunda saflaştırılan iki ayrı enzimin de aktif oldukları gösterildi (Şekil 12).



Şekil 12. Üre-PAGE’de *B. subtilis* PolC saflaştırılan proteininin aktivitesinin gösterilmesi

#### 3.4.1. Metanolün PolC Proteinini Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

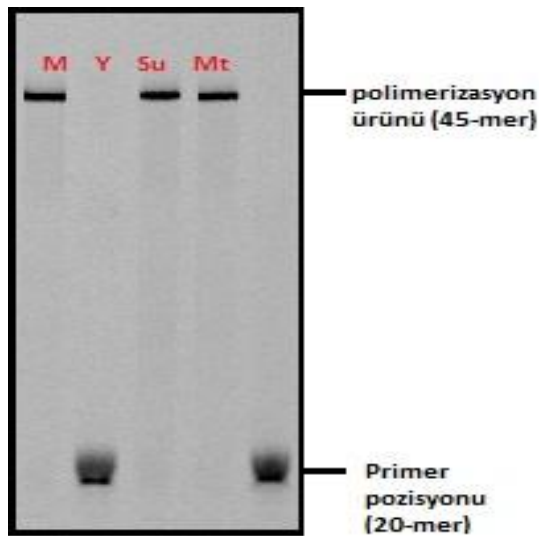
Metanolün çözücü olarak kullanıldığı özütleme işleminde *B. subtilis* PolC proteininin aktivitesine herhangi bir etkisinin olup olmadığı tespit edilmek üzere %20 ve %35’ lik metanol hazırlandı. Deney 1 dk ve 10 dk olmak üzere iki farklı süreli olarak yapıldı. Deney sonucu Typhoon FLA9500 cihazında görüntülendi. 20-mer pozisyonundan 45-mer pozisyonuna ürün oluşturmada %35’lik metanol konsantrasyonuna kadar metanolün herhangi bir inhibitör etkiye sahip olmadığı tespit edildi (Şekil 13).



Şekil 13. *B. subtilis* PolC proteinine metanol etkisinin gösterilmesi.

### 3.5. *Diospyros kaki* Bitkisinin Yaprak ve Meyve Özütlerinin PolC Üzerine İnhibisyon Etkileri

*D. kaki* bitkisine ait yaprak ve meyve özütlerinden 1  $\mu$ L kullanılarak yapılan inhibisyon deneylerinin sonuçlarına göre *D. kaki* yaprak özütlerinin PolC üzerinde güçlü inhibisyon gösterdiği, *D. kaki* meyve özütlerinin ise inhibisyon göstermediği sonucuna varıldı (Şekil 14).



Şekil 14. *Diospyrus kaki* yaprak ve meyve özütlerinin *B. sub* PolC üzerine etkisi.  
M: Meyve özütü, Y: Yaprak özütü, Mt: Metanol

### 3.6. Antimikrobiyal Aktivite

Agar kuyucuk difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktivite *Diospyrus kaki* yaprak özütü üzerinde yapıldı. Petrilerdeki inhibisyon zon çapları cetvel yardımıyla ölçüldü.

Test edilen *D. kaki* yaprak (*D.kakiY*) özütünün tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Gram (+) ve Gram (-) organizmalarda benzer antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlemlenirken mayalarda en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptandı (Tablo 5).

**Tablo 5.** Agar kuyucuk metoduyla bitki özütünün antimikrobiyal aktivitesi.

Özüt	Stok Kon. (mg/mL)	Mikroorganizmalar ve İnhibisyon Çapı (mm)						
		<i>Ec</i>	<i>Yp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Bc</i>	<i>Ca</i>
<i>D.kakiY</i>	100mg/mL	6	7	12	11	6	8	15

*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, *Ca*: *C. albicans* ATCC 60193.

### 3.7. *Diospyros kaki* Yaprak Fenolik Bileşiklerinin HPLC-DAD ile Aydınlatılması

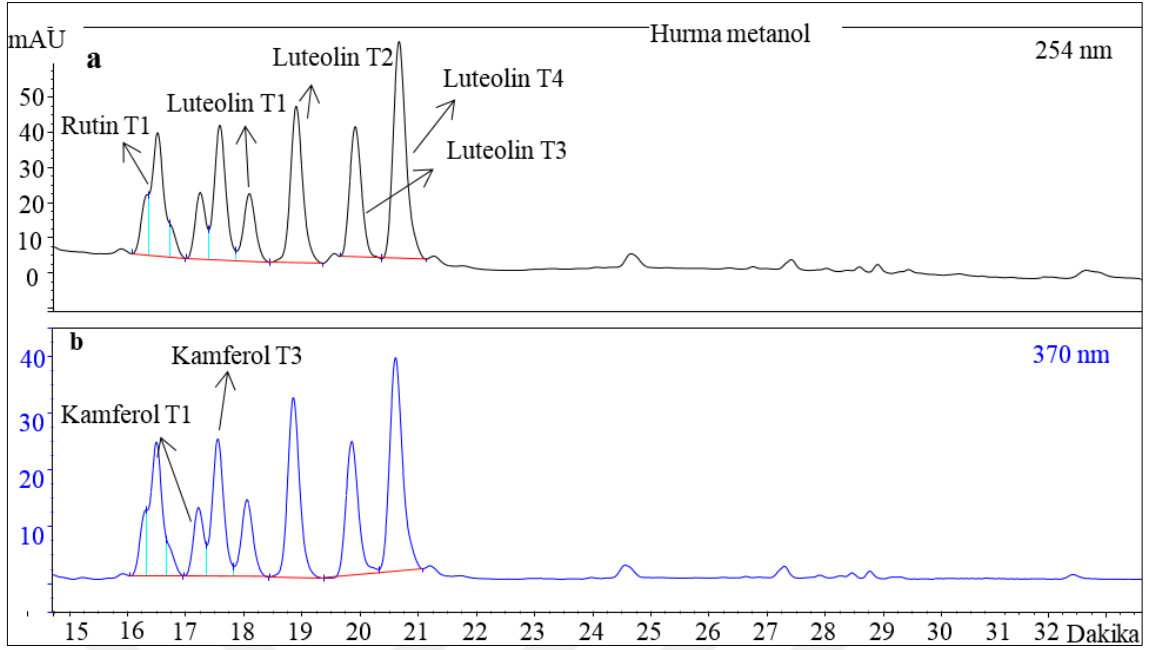
Elde edilen kalibrasyon ve validasyon değerleri Tablo 6' da verilmiştir. Lineer kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir ( $R^2 \approx 1$ ). Dedeksiyon limitleri bitki örneğinden doğal bileşikler için yeterli seviyededir (Tablo 6). Bu standartlar *Diospyrus kaki* bitkisinin yaprak özütlerinde bakılmıştır.

**Tablo 6.** HPLC-DAD analizlerinin kalibrasyon ve validasyon değerleri.

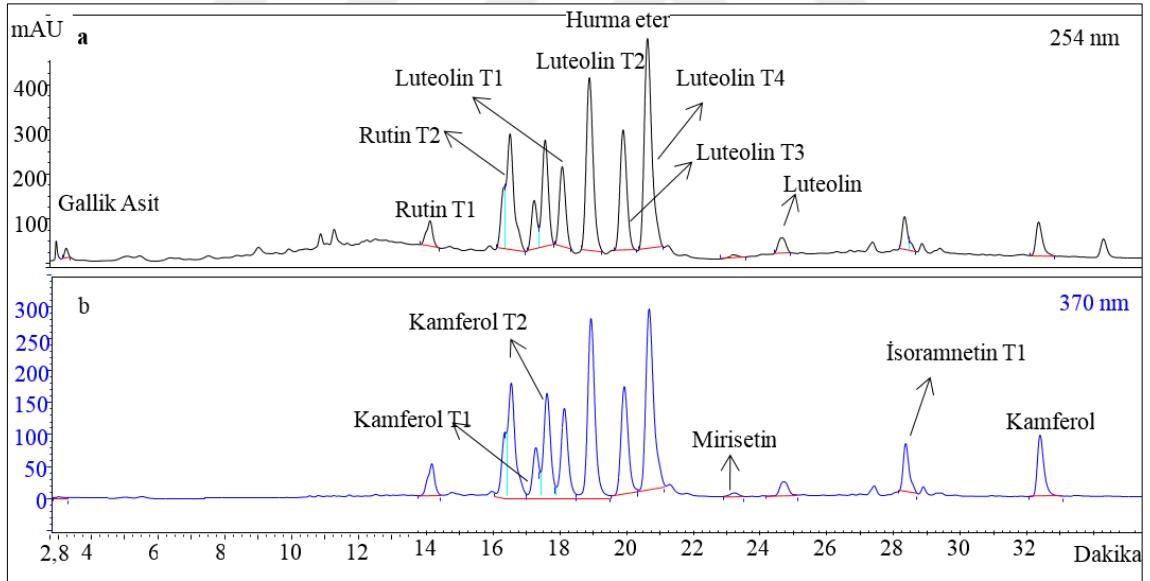
Standartlar	RT	%BSS (RT)	%BSS (Alan)	*LOD	*LOQ	R <sup>2</sup>	Kesim noktası	Eğim
1 Gallik asit	2,98	3,96	7,26	0,10	0,30	0,999	0,03	0,47
2 Protokatekuik asit	7,19	3,65	4,44	0,06	0,18	0,999	0,06	0,56
3 Klorojenik asit	11,02	0,50	1,79	0,02	0,07	0,999	-0,01	0,47
4 <i>p</i> -OH Benzoik asit	11,37	0,76	1,67	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 Kamferol	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<sup>-1</sup>

Hurma yaprak özütlerinde mevcut olan fenolik bileşiklerin HPLC-DAD sistemi ile elde edilen UV spektrumları incelendiğinde yoğun bir flavonoid içeriğine sahip oldukları tespit edildi. Uygulanan metotta kullanılan flavonoid standartları ile alıkonma zamanı açısından örtüşen piklerin eter fraksiyonundaki mirisetin ve kamferol olduğu görüldü (Şekil 16, Tablo 7). Hurma yaprağının metanol özütleri ve eter fraksiyonunda Tablo 7 ve Şekil 15'te görüldüğü gibi ağırlıklı olarak luteolin türevleri bulunmaktadır. Luteolin standardı kalibrasyonu yapılan sistemimizde bulunmadığından bu piklerin sadece kalitatif değerlendirilmesi yapılmış ancak miktar tayinine geçilmedi. Kromatogramdaki pikleri birbirlerine çok benzer bileşen olmasından yola çıkarak pik büyüklüklerini miktar olarak karşılaştırmalarda kullanmamız mümkündür. Öte yandan rutin, kamferol ve isorhamnetinin kalibrasyonu sistemimizde mevcut olmasına rağmen özütlerde gözlenen piklerin alıkonma zamanları farklılığından dolayı bu bileşenler türevleri şeklinde değerlendirildi ve ilgili standardın kalibrasyon denklemi kullanılarak yaklaşık miktarları Şekil 15'te verildi. Kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi özütlerde başlıca luteolin türevleri ve onu takiben rutin, kamferol ve isorhamnetin türevleri mevcuttur.



Şekil 15. Hurma metanol özütlerinin 254 nm (a) ve 370 nm'de (b) HPLC-DAD kromatogramları



Şekil 16. Hurma eter özütlerinin 254 nm (a) ve 370 nm'de (b) HPLC-DAD kromatogramları

Hurma yaprağının eter fraksiyonunda tespit edilen fenolik bileşikler gallik asit, rutin türevleri, kamferol ve türevleri, luteolin türevleri, mirisetin ve isoramnetin türevidir. Luteolin kantitatif olarak göz ardı edildiğinde miktar olarak ilk sırada 2216,4 mg std/g özüt olarak rutin türevi-2 son sırada ise 14,9 mg std/g özüt olarak mirisetin yer almaktadır.



Hurma yaprağının metanol özütü fenolik bileşiklerce eter fraksiyonu kadar zengin olmadığı görüldü. Buradan eter fraksiyonunun ilgili bileşenleri daha zengin miktarda ekstrakte ettiği sonucuna varılmaktadır. Ayrıca kuru eter fraksiyonu, fenolik olmayan diğer bileşenlerden ayıklanmış olduğu için fenolik bileşenlerin çözünürlüğü artmış ve başlıca fenolik bileşen içeriğine sahip olmuştur. Eter fraksiyonunda görülen gallik asit, rutin türevi-1, mirisetin, isoramnetin türevi ve kamferol metanol özütünde görülmedi. Luteolin türevleri kalitatif olarak gözlenirken, kantitatif olarak belirlenen fenolik bileşik türevleri sırasıyla; rutin türevi-2 (1891,2 mg std/g özüt), kamferol türevi-2 ( 626,0 mg std/g özüt) ve Kamferol türevi-1 (274,1 mg std/g özüt ) dir (Tablo 7).

**Tablo 7.** HPLC-DAD ile hurma metanol ve eter özütlerinde tanımlanan fenolik bileşenler

RT (dk)	Standartlar	Hurma metanol*	Hurma eter*
3,21	Gallik asit	G	104,4
14,15	Rutin türevi 1	G	441,2
16,54	Rutin türevi 2	1891,2	2216,4
17,27	Kamferol türevi 1	274,1	259,3
17,61	Kamferol türevi 2	626,0	620,5
18,12	Luteolin türevi 1	K	K
18,92	Luteolin türevi 2	K	K
19,93	Luteolin türevi 3	K	K
20,67	Luteolin türevi 4	K	K
23,23	Mirisetin	G	14,9
24,69	Luteolin türevi 5	K	K
28,37	İsoramnetin türevi	G	450,1
32,41	Kamferol	G	265, 7

\*mg std/g özüt; G: Gözlenmedi K: Kalitatif olarak gözlendi fakat miktarı hesaplanmadı

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Çalışmada *D. kaki* bitkisinin yaprak ve meyve kısımları çalışıldı. Yaprak ve meyve örneklerinden elde edilen özütlerin *B. subtilis* PolC enzimi üzerindeki inhibisyon çalışmalarının sonucu Tablo 8’de verildi.

*D. kaki* bitkisinin yaprak kısmı güçlü inhibisyon gösterirken, meyve kısmının inhibisyon etkisi göstermediği sonucuna varıldı.

**Tablo 8.** *B. subtilis* DNA polimeraz III (PolC) proteinine *D. kaki* meyve ve yaprak metanol özütlerinin inhibisyon etkisi gösterip göstermediğinin değerlendirilmesi.

Bitki adı	Bitki dokusu	<i>B. subtilis</i> PolC PolIII	
		Etkili	Etkisiz
<i>Diospyrus kaki</i>	Meyve		+
<i>Diospyrus kaki</i>	Yaprak	+	

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).

Trabzon hurması, kızılıçık ve kuşburnunda bulunan polifenol grubu bileşikler (proantosiyandinler, kateşin ve izokversitinler) antioksidan, antidiyabetik, antienflematuar ve kanser önleyici etkiye sahiptirler. Antioksidan aktivite yanında kabızlık giderici, bağışıklık sistemini geliştirici, kilo verici ve kolesterolü düşürücü etkiye de sahiptirler (Koca, 2007; Doğan vd., 2006).

Gıdalarda bulunan bazı fenolik bileşikler dilin tüm yüzeyinde ve yanak mukozasında bir buruşturma ve kurutma duyusuna neden olabilmektedir. Bu duyu burukluk olarak değerlendirilmektedir. Burukluğu sağlayan fenolik bileşikler gıdaların

kabul edilebilirliğini etkileyebilmektedir. Trabzon hurması, dağ eriği, kızılılık ve şarap ağzıda buruk tadı veren gıdalara örnek olarak verilebilir (Shahidi ve Naczki, 1995).

Ebenaceae familyasına ait olan Trabzon hurması (*Diospyros kaki*), içeriğindeki yüksek orandaki askorbik asit ile beslenme açısından önemli bir meyvedir. Ham meyvede ve olgun meyvenin yenmeyen kabuk çevresinde meyve etine oranla daha fazla askorbik asit bulunmaktadır. Askorbik asit içeriği tüm çeşitler için 14.9-15.8 mg/100 g arasında değişmektedir (Baltacıoğlu ve Artık, 2011).

Trabzon hurmasını güneşte 1 ay, 60 °C'de 12 saat kurutarak diyet lifi, mineral madde, iz element, polifenol ve toplam radikal süpürme aktivitesindeki değişimi araştırmıştır. Diyet lifi, mineral madde ve iz element miktarında değişim olmadığı; kurutmaya polifenol içeriğinde ve antiradikal süpürme aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Azalmanın güneşte kurutmada daha az olduğu tespit edilmiştir (Park vd., 2006).

Bu meyvenin 100 gramında 14-20 gram arasında vitamin bulunmaktadır. 100 gramında 90 kalori ihtiva etmektedir. Yine 100 gramda 0,7 gram protein ve 0,4 gram yağ da içermektedir. 100 gramda 20-25 miligram arasında C vitamini ile riboflavin, niasin ve tiamin gibi bazı B vitamini çeşitleri de bulunmaktadır. 0,3 miligram demir içermektedir. Ayrıca mineral madde içeriği bakımından zengin olduğu, özellikle potasyum, kalsiyum ve fosforu en yüksek oranlarda ihtiva ettiği yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur (Parseker vd., 2008).

Meyvenin yüksek düzeyde içerdiği askorbik asit ve fenolik bileşikler bu meyveye antioksidan özellik sağlamaktadır. Trabzon hurmasının (*Diospyros kaki*) Hachiya çeşidinin kimyasal bileşimi ayrıntılı olarak saptanmış, olgunlaşma periyodundaki şekerler, organik asitler, L-askorbik asit, karotenoid bileşikler ve fenolik bileşikler HPLC metodu ile belirlenmiştir. Ayrıca değişik formülasyonlarda üretilen nektarların bazı özellikleri ve duyuşal değerleri saptanmıştır. Hachiya çeşidinde sırasıyla %9,3 glukoz; %7,5 fruktoz; %0,3 sakaroz; %0,2 maltoz; %0,01 galaktoz; %0,03 riboz; %0,02 ksiloz; %0,00 arabinoz; %17,6 toplam şeker; 0,17 g/kg okzalik asit; 0,42 g/kg süksinik asit; 0,41 g/kg malik asit; 0,06 g/kg quinik asit, 0,15 g/kg sitrik asit;

1,20 g/kg toplam asit; 15,9 mg/100g L-askorbik asit; 28,0 mg/kg ksantofil; 45,5 mg/kg 0-karoten;5-73,5 mg/kg toplam karotenoid bileşik; 132,0 mg/kg kateşin; 326,9 mg/kg kuersetin ve 132,0 mg/kg toplam fenolik bileşik bulunduğu saptanmıştır (Karkacier, 1998).

Çalışmada *Diospyrus kaki* eter ve metanol yaprak özütlerinin HPLC-DAD analizleri sonucu; eter fraksiyonunda gallik asit, rutin türevleri, kamferol ve türevleri, luteolin türevleri, mirisetin ve isoramnetin türevi tespit edildi. Metanol fraksiyonunda ise Luteolin türevleri kalitatif olarak gözlenirken, rutin türevi-2 (1891,2 mg std/g özüt), kamferol türevi-2 (626,0 mg std/g özüt) ve kamferol türevi-1 (274,1 mg std/g özüt) kantitatif olarak belirlendi.

## 5. ÖNERİLER

Günümüzde antibiyotiklere karşı direnç önemli bir problem olmakta ve buna karşı alternatif tedavilere ihtiyaç gittikçe artmaktadır. Bütün patojenlerin çoğalmasa için gerekli bir işlem olan kromozomal DNA replikasyonunun inhibisyonu hızlı bir şekilde mikroorganizmaların ölümüne neden olmaktadır. Bu yönden bakıldığında bakteri replikasyon sistemleri yeni ilaçların geliştirilmesi için hedef sistemler olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışma ile *D. kaki* türünden elde edilen özütlerin C familyası DNA polimeraz inhibisyonuna bakılmıştır. Ayrıca inhibisyon gösteren özütlerin fenolik bileşikleri HPLC-DAD ile aydınlatılmıştır. Ülkemizin bitki örtüsü açısından çeşitliliği düşünüldüğünde inhibisyon ve karakterizasyon çalışmaları daha fazla bitki çeşidi üzerinden devam edilebilir.

Hurmanın metanol özütünün DNA polimeraz enzimine karşı kuvvetli inhibisyonunun yoğun olarak içerdiği flavonoidlerden kaynaklanması muhtemeldir. Bunun net bir şekilde ortaya konulması için, bu bileşenleri izole edilerek yeniden inhibisyon testlerinin yapılması gerekmektedir. Ayrıca bileşenleri daha ayrıntılı yapı analizlerinin de yapılması burada mevcut oldukları aşikar olan inhibitör ajanların kesin tespitini sağlayacaktır.

Hurma yaprak ve meyvelerinin geleneksel olarak çeşitli hastalıkların tedavisi için direk veya kaynatılarak kullanımı göz önüne alındığında hurma yaprak ve meyvelerinin çeşitli hastalıklara karşı potansiyellerini araştırmak için daha ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir.

## KAYNAKLAR

- Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammed, F., 1998.** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 183-193.
- Bağlan Peren, H., 2003.** Güncel Gastroenteroloji, Bakteri ve Yapısı. 226-227
- 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, 893-904.
- Baltacıoğlu, H., Artık, N., 2011.** Trabzon hurmasının askorbik asit ve şeker kompozisyonunun HPLC ile belirlenmesi, 7. Gıda Mühendisliği Kongresi kitaplar serisi, 26, 246 s.
- Bayazit, S., Tuzcu Ö., Küden, A.B., İmrak, B., 2012.** Bazı Trabzon Hurması (*Diospyrus kaki L.*) Tür ve Çeşitlerinin Soğuklama Gereksinimlerinin Saptanması. *Anadolu Tarım Bilim Dergisi*, 27(3), 127-132.
- Bilgehan, H., 1995.** *Bacillus* Genusu: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, 529-532.
- Bonwart, G. J., 1989.** *Basic Food Microbiology*, Van Nostrand Reinhold, 773 s., New York
- 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.
- Braithwaite, D.K. and Ito, J., 1993.** Compilation, Alignment, and Phylogenetic Relationships of DNA Polymerases, *Nucleic Acids Research*, 21, 787-802.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974.** *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th edition, The Williams and Wilkins Company, 1246 s., Baltimore.
- Budak, E.E., 2016.** *E. coli* replikatif DNA polimeraz III $\alpha$  (DNAE)'ye inhibisyon etkili bitki organ özütlerinde fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile aydınlatılması. RTEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.
- 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, *Proceeding National Academy Sciences*, 95, 1425-14255.
- Cowan M.M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents *Clinical Microbiology Reviews* 12(4), 564 s.

- Delaru, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., Argos, P., 1990.** An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering*, 3, 461 s.
- Demirbağ, Z., 2006.** Genel mikrobiyoloji. Sonhaber Matbaacılık, ISBN: 93278-1-3, 67-72.
- Dervyn, E., C. Suski, R. Daniel, C. Bruand, J. Chapuis, J. Errington, L. Janniere, and S. Ehrlich, 2001.** Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork, 294, 1716–1719.
- Doğan, A., Kazankaya, A., Çelik, F., Uyak, C., 2006.** Kuşburnunun Halk Hekimliğindeki Yeri Ve Bünyesindeki Bileşenler Açısından Yararları II.Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, 299- 303. Tokat.
- 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. *Proceeding National Academy Sciences*, 105, 20695-20700.
- Filee, J., Forterre, P., Sen-Lin, T., Laurent, J., 2002.** Evolution of DNA polymerase families. *Journal Molecular Evolution*. 54, 763 s.
- Georgescu, R.E., Kurth, I. and O'Donnell, M.E. 2012.** Single-molecule studies reveal the function of a third polymerase in the replisome. *National Structure Molecular Biology*, 19, 113-116.
- Güven, S. ve Demirel Zorba, N.N., 2013.** Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu, 6. Basım, 33-34 s.
- Huang, Y.P., Ito, J., 1999.** DNA polymerase C of the *Thermophilic bacterium, Thermus aquaticus*. *Journal Molecular Evolution*, 48, 756 s.
- Inoue, R., Kaito, C., Tanabe, M., Kamura, K., Akimitsu, N., and Sekimizu, K., 2001.** Genetic identification of two distinct DNA polymerases, DnaE and PolC, that are required for chromosomal replication in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Genetic Genomics*, 266, 564–571.
- Ito, J. and Braithwaite, K., 1991.** Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Research*. 19, 4045-4057.
- Iwu, M.M., Duncan, A.R., Okunji, C.O., 1999.** New Antimicrobials of Plant Origin. ASHS Press, 457-462.
- Karkacier, M., 1998.** Trabzon hurmasının Kimyasal Bileşimi Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

- Karou, D., Nadembega, W.M.C., Ouattara, L., Ilboudo, D.P., Canini, A., Nikiema, J.B., Simpo, J., Colizzi, V., Traore, A.S., 2007.** African Ethnopharmacology and New Drug Discovery. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology.
- Kitagawa, H. and Glucina, P.G., 1984.** Persimmon culture in New Zealand. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research, 159, 74 s.
- Koca, İ., 2007.** Kızılılık ve Trabzon Hurması Pekmezlerinin Üretim Teknikleri. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2, 33-37.
- Koonin, E.V. and Bork, P. 1996.** Ancient duplication of DNA polymerase inferred from analysis of complete bacterial genomes. Trends Biochemistry Science, 21, 128-129.
- Kornberg, A. and Baker, T.A. 2005.** DNA Replication. University Science Books, Sausalito, CA.
- Kurth, I. and O'Donnell, M. 2013.** New insights into replisome fluidity during chromosome replication. Trends Biochemistry Science, 38, 195–203.
- 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.
- Liu, R.H., 2004.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention. Mechanism of action, 134, 3479-3485.
- Michel, M.F., and Goessens, W.H.F., 1984.** "Tolerance to antimicrobial agents in *Staphylococcus aureus*." Proceedings of the Kurhaus Workshop on Antibiotics, 19 s.
- McHenry, C.S. 2011a.** DNA replicases from a bacterial perspective. Annual Review Biochemistry, 80, 403–436.
- McHenry, C.S. 2011b.** Bacterial replicases and related polymerases. Current Opinion Chemical Biology, 15, 587–594.
- McHenry, C.S., 2011c.** Breaking the rules: bacteri that use several DNA polymerase IIIs. EMBO Reports, 12, 408 s.
- Ohmori, H, Friedberg, E.C, Fuchs, R.P, Goodman, M.F, Hanaok,a 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.



- Özcan, M., 2005.** Trabzon Hurması Yetiştiriciliği. Hasad Yayınları, ISBN 9758377. 42,6.
- Öztürk, R., 2002.** Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, 31, 83-100
- Park, Y., Jung, S., Kang, S., Delgado-Licon, E., Ayala, A., Tapia, M.S., Martı'n Belloso, O., Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S., 2006.** Drying of persimmons (*Diospyros kaki L.*) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities, 39, 748–755.
- Parseker, Y., Uylaser, S.V., Yonak, S., 2008.** Trabzon Hurmasının Bileşimi ve Besleyici Değeri. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Payne, D.J, Gwynn, M.N, Holmes, D.J. Rosenberg, M. 2004.** Genomic approaches to antibacterial discovery. Methods Molecular Biology, 266, 231 s.
- 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, 2, 482 s.
- Perez, C., Pauli, M., Bazerque, P., 1990.** An antibiotic assay by the well agar method. Acta Biologia et Medicine Experimentalis, 15, 113-115.
- Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J. and Leake, M.C., 2010.** Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in *Escherichia coli*. Science, 328, 498-501.
- Rıchet, 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 s.
- 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.
- Robinson, R. K., 1985.** Dairy Microbiology. 258 s.
- 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.
- Shahidi, F., Nacz, M., 1995.** Food Phenolics. Technomic Publishing Company Book, 199-225. Lanchester, USA
- Taubman, S., 1992.** Genus Bacillus, Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356.

- Thomas, A.K., 2004.** DNA Replication Fidelity. *Journal Biological Chemistry*, 279, 16895 s.
- Timinskas, K., Balvočiūtė, M., Timinskas, A., Venclovas, Č., 2013.** Comprehensive analysis of DNA polymerase III  $\alpha$  subunits and their homologs in bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 1–21
- Trincao, J., Johnson, R.E., Escalente, C.R., Prakash, S., Prakash, L., Aggarwal, A.K., 2001.** Structure of the catalytic core of *S. Cerevisiae* DNA polymerase h implications for translesion synthesis. *Molecular Cell*, 8, 417 s.
- Turnbell, P.C.B. and Kramer. J. M., 1991.** *Bacillus: Manual of clinical Microbiology*, Fifth Edition, Balows, A., Hauster, J. R., Herman, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J., American Society Microbiology, 296-303.
- Tuzcu, Ö. ve Yıldırım, B., 2000.** Trabzon Hurması (*Diospyros kaki*) ve Yetiştiriciliği. TÜBİTAK/TOGTAĞ, 24.
- URL-1.**<http://labvet.biz/dersler/laboratuvar/gram-boyama-nedir-gram-pozitif-ve-gram-negatif-nedir.html> (19 Mart 2016).
- URL-2.**[http://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteri\\_h%C3%BCcre\\_yap%C4%B1s%C4%B1](http://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteri_h%C3%BCcre_yap%C4%B1s%C4%B1) (21 Mart 2016).
- URL-3.**<http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture4.htm> (21 Mart 2016).
- URL-4.**[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus\\_subtilis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis) (28 Mart 2016).
- URL-5.**<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA22666.1.html> (17 Şubat 2016)
- URL-6.**<http://www.clsi.org/> (13 Şubat 2016)
- URL-7.**[https://tr.wikipedia.org/wiki/Trabzon\\_hurmas%C4%B1](https://tr.wikipedia.org/wiki/Trabzon_hurmas%C4%B1) (1 Nisan 2016).
- 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.
- Wright, G.E., Brown, N.C., Xu, W.C., Long, Z.Y., Zhi, C., Gambino, J.J., Barnes, M.H., Butler, M.M., 2005.** Active site directed inhibitors of replication-specific bacterial DNA polymerases. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 15, 729 s.
- Yang, J., Meyers K.J., van der Heide, J., Liu, R.H., 2004.** Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal Agricultur Food Chemistry*, 52, 6787-6793.

**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.



## ÖZGEÇMİŞ

Ahmet MİDİLLİ 1986 yılında Rize’de doğdu. İlkokulu Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulunda liseyi Rize Fen Lisesinde tamamladı. 2006-2007 Eğitim-Öğretim yılında Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2010 yılında tamamladı. 2012 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Lisansüstü eğitimine başladı.

