



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**BAKTERİYEL QUORUM-SENSING
İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE
BİYOKİMYASAL OLARAK TANIMLANMASI**

Fatma Elif ÇEPNİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. A. Filiz Gürel


İSTANBUL

Bu çalışma 05/03/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



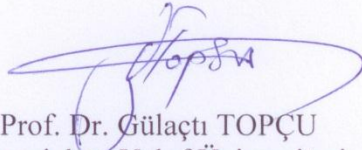
Prof. Dr. A. Filiz GÜREL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



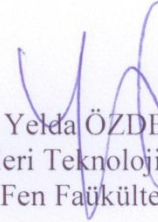
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayşegül TOPAL
SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen - Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ
Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 4114 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bana yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Filiz GÜREL'e;

Tezimde kullandığım bazı mikroorganizma kültürlerinin temini için bana yardımcı olan Doç. Dr. Gülgün TINAZ ve Araş. Gör. Murat Kemal AVCI'ya;

Bitki materyalinin toplanması, teşhisi ve biyokimyasal analizlerinde bilgilerinden faydalandığım Yard. Doç. Dr. Pınar ÇAKIR-HATIR, Dr. Ecz.Tuba ŞERBETÇİ ve Dr. Mehmet BONA'ya;

İ.Ü. Orman Fakültesi, Atatürk Arboretumu; İ.Ü. Fen Fakültesi, Alfred Heilbornn Botanik Bahçesi ve İ.Ü. Fen Fakültesi Herbaryumu'na;

Tez kapsamında deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün Başkanı Sayın Prof. Dr. Nazlı ARDA başta olmak üzere tüm değerli hocalarına ve çalışma arkadaşlarıma;

Doktora eğitimim boyunca maddi, manevi desteklerini esirgmeden sabır ve sevgileriyle beni yüreklendiren AİLEME çok teşekkür ederim.

Mart, 2014

Fatma Elif ÇEPNİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. QUORUM SENSING (QS) MEKANİZMASI	4
2.1.1. QS Mekanizmasını Kullanan Mikroorganizmalar	5
2.1.2. QS Mekanizmasının Sinyal Molekülleri.....	6
2.1.3. QS Sistemleri	9
2.1.3.1. <i>LuxI/LuxR Sistemi</i>	9
2.1.3.2. <i>Oligopeptid Sistemi</i>	10
2.1.3.3. <i>Hibrit Sistem</i>	11
2.2. QS MEKANİZMASININ İNHİBİSYONU	12
2.2.1. QS mekanizmasını İnhibe Edebilen Doğal Bileşikler.....	14
2.2.2. QS Mekanizmasını İnhibe Edebilen Sentetik Bileşikler.....	16
2.3. ANTİBAKTERİYEL ETKİ MEKANİZMALARINA ALTERNATİF OLARAK QS MEKANİZMASININ ÖNEMİ	17
2.4. ANTİ-QS AKTİVİTE BAKIMINDAN TÜRKİYE FLORASININ ÖNEMİ	18
2.5. ANTİ-QS AKTİVİTENİN SAPTANMASI İÇİN KULLANILAN BAKTERİ IRKLARI	23
2.6. <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> 'DE NİSİN ÜRETİMİ VE QS İLE İLİŞKİSİ	24
3. MALZEME VE YÖNTEM	28
3.1. BİTKİ MATERYALİ	28
3.2. BİTKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI	29
3.2.1. Biyoaktivite ile Yönlendirilen Fraksiyonlandırma	30

3.3. ANALİZLER İÇİN KULLANILAN BAKTERİ İRKLARI VE ÜRETİM KOŞULLARI.....	31
3.4. ANTİ-QS AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	31
3.4.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV12472 ve CV026 ile Sıvı İnkübasyon Yöntemi.....	31
3.4.1.1. <i>Viyolasin Üretiminin Kantitatif Analizi</i>	32
3.4.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV12472 ile Disk Difüzyon Yöntemi.....	32
3.5. AKTİF FRAKSİYONLARDA BAKTERİ ÜREMESİ VE VİYOLASİN ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ.....	34
3.6. NİSİN ÜRETİMİNE BAĞLI BİYODİFÜZYON BELİRLEMESİ.....	34
3.6.1. Nisin Üretiminin Ters Transkriptaz-PCR (RT-PCR) ile Analizi.....	36
3.6.1.1. <i>cDNA Sentezi</i>	36
3.6.1.2. <i>RT-PCR Koşulları</i>	37
3.7. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	38
3.7.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	38
3.7.2. Biyootografik İTK.....	38
3.7.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	39
3.7.3.1. <i>Standart Hazırlanması</i>	39
3.7.3.2. <i>Örnek Hazırlanması</i>	39
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. HAM EKSTRELERDE ANTİ-QS AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	40
4.2. BİYOAKTİVİTE İLE YÖNLENDİRİLMİŞ BİTKİ FRAKSİYONLARINDA ANTİ-QS AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	46
4.2.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV12472 ile Sıvı İnkübasyon Yöntemi.....	46
4.2.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 ile Sıvı İnkübasyon Yöntemi.....	54
4.2.3. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV12472 ile Disk Difüzyon Yöntemi.....	62
4.3. AKTİF FRAKSİYONLARDA BAKTERİ ÜREMESİ VE VİYOLASİN ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ.....	64
4.4. NİSİN ÜRETİMİNE BAĞLI BİYODİFÜZYON BELİRLEMESİ.....	64
4.4.1. Nisin İnhibisyonunun RT-PCR ile Analizi.....	69
4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	70
4.5.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	70
4.5.2. Biyootografik İTK.....	71
4.5.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	72
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	74

KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ.....	93

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Açillenmiş homoserin lakton (AHL) biyosentezi (Whitehead ve diğ., 2001'den alınmıştır).....7
- Şekil 2.2:** Farklı bakteri türlerine özgü AHL sinyal molekülleri (Schauder ve Bassler, 2001'den alınmıştır).....7
- Şekil 2.3:** Bazı Gram (+) bakteriler tarafından kullanılan AIP'lerin yapısı (Schauder ve Bassler, 2001'den alınmıştır).....8
- Şekil 2.4:** Furanosil borat diester (AI-2) yapısı (Uva, 2011'den alınmıştır).....9
- Şekil 2.5:** LuxI/LuxR sisteminin şematik gösterimi (Xavier ve Bassler, 2003).....10
- Şekil 2.6:** Oligopeptid sisteminin şematik gösterimi (Xavier ve Bassler, 2003).....11
- Şekil 2.7:** Hibrit sistemin şematik gösterimi (Xavier ve Bassler, 2003).....12
- Şekil 2.8:** Bakterilerde düşük ve yüksek hücre yoğunluğunda QS'in engellenmesi amacıyla kullanılan olası mekanizmalar.13
- Şekil 2.9:** Nisin A peptidinin yapısı. Dha: dehidroalanin, Dhb: dehidrobutirine, Abu: amino butirik asit, Abu-S-Ala: β -metil lantiyonin, Ala-S-Ala: lantiyonin, S: tyoeter köprülerini göstermektedir (Kleerebezem, 2004'den alınmıştır).....26
- Şekil 2.10:** Nisin genine ait operonunun şematik gösterimi (Kleerebezem, 2004'den alınmıştır).....26
- Şekil 2.11:** Nisin biyosentezi ve düzenlenmesi modeli. B,C ve T faktörlerinden oluşan zara sabitlenmiş multimerik kompleks (*nisBCT* genleri tarafından kodlanır) öncül nisinin modifikasyonu ve taşınması için gereklidir. Nisinin modifikasyonu nisP tarafından kodlanan özel bir proteaz (P) tarafından gerçekleştirilir. AMP olarak rol oynayan bu peptidleri üreten hücreler I ve FEG faktörlerinden (*nisIFEG* tarafından kodlanır) oluşan bir bağışıklık sistemi aracılığıyla korunurlar. Bu modelde, nisinin ikinci bir rolü peptid feromon (sinyal) olarak sensör kinaz (K_I) üzerinde karşılık gelen domeni algılayarak sensör kinaz üzerindeki fosfat verici alandan (K_T) yanıt düzenleyici üzerindeki (R_R) alıcı domene fosfatın transferini aktive eder. Aktifleşen cevap düzenleyici protein (R_O) biyosentetik gen kümesinin içinde yer alan promotörlerdeki özel hedef kutularına (*lan*-kutusu) bağlanır ve transkripsiyon aktivasyonu ile nisin üretimi artar (Kleerebezem, 2004'den alınmıştır).27
- Şekil 3.1:** Sıvı inkübasyon yönteminin şematik gösterimi.32
- Şekil 3.2:** Disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi.33

- Şekil 3.3:** *Chromobacterium violaceum* (CV12472)'un anti-QS belirlemede biyomonitör olarak kullanımı. (A) Anti-QS aktivitenin olmadığı durumda *C. violaceum* üretilmiş petride ekstrelerin yüklendiği disklerin çevresinde viyolasin üretiminden kaynaklanan mor renklenme, (B) 4-NPO (4- nitropiridin oksit)'in farklı konsantrasyonlarının uygulandığı disklerin çevresinde anti-QS aktivite sonucu oluşan opak zonlar ve (C) Gentamisin uygulaması sonucu disk çevresinde oluşan berrak zonlar (anti-bakteriyel etki) (Çepni ve Gürel, 2011'den alınmıştır).....33
- Şekil 3.4:** Nisin üretimine bağlı biyodifüzyon belirlemede şematik gösterimi.35
- Şekil 4.1:** *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides* (Schultz Bip.) Grierson'un %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 ve ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.41
- Şekil 4.2:** *Epilobium angustifolium* L.'nin %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 olarak ifade edilmektedir.42
- Şekil 4.3:** *Quercus frainetto* Ten. ekstresinin farklı miktarları için CV12472 ile yapılan mikropilaka yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.42
- Şekil 4.4:** *Quercus robur* L. ekstresinin farklı miktarları için CV12472 ile yapılan mikropilaka yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.43
- Şekil 4.5:** *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* (L.) Hudson'ın %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.44
- Şekil 4.6:** *Trifolium aureum* Poll.'ün %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.44
- Şekil 4.7:** *Salvia verticillata* subsp. *verticillata* L. Miller'ın %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.45

- Şekil 4.8:** *Hypericum orientale* L.'nin %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A) ve OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 μ g, 2: 500 μ g; 3: 1000 μ g; 4: 2000 μ g ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak ifade edilmektedir.46
- Şekil 4.9:** *Quercus robur* L. petrol eteri farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). PE: Petrol eteri içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g; 3: 500 μ g; 4: 1000 μ g ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p<0.05$ olarak ifade edilmektedir.47
- Şekil 4.10:** *Quercus robur* L. CH_2Cl_2 fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g; 3: 500 μ g; 4: 1000 μ g ekstre.48
- Şekil 4.11:** *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g; 3: 500 μ g; 4: 1000 μ g ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p<0.05$ olarak ifade edilmektedir.49
- Şekil 4.12:** *Quercus robur* L. n-butanol farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g; 3: 500 μ g; 4: 1000 μ g ekstre.50
- Şekil 4.13:** *Quercus frainetto* Ten. petrol eteri farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). PE: Petro eteri içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g; 3: 500 μ g; 4: 1000 μ g ekstre.51
- Şekil 4.14:** *Quercus frainetto* Ten. CH_2Cl_2 fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g; 3: 500 μ g; 4: 1000 μ g ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p<0.05$ olarak ifade edilmektedir.52
- Şekil 4.15:** *Quercus frainetto* Ten. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g; 3: 500 μ g; 4: 1000 μ g ekstre.53
- Şekil 4.16:** *Quercus frainetto* Ten. n-butanol fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol

- (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.54
- Şekil 4.17:** *Quercus robur* L. petrol eteri fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); PE: Petrol eteri içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.55
- Şekil 4.18:** *Quercus robur* L. CH₂Cl₂ fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.56
- Şekil 4.19:** *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.57
- Şekil 4.20:** *Quercus robur* L. n-butanol fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.58
- Şekil 4.21:** *Quercus frainetto* Ten. petrol eteri fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); PE: Petrol eteri içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.59
- Şekil 4.22:** *Quercus frainetto* Ten. CH₂Cl₂ fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.60
- Şekil 4.23:** *Quercus frainetto* Ten. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 ve ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.61
- Şekil 4.24:** *Quercus frainetto* Ten. n-butanol fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.62

- Şekil 4.25:** *Chromobacterium violaceum* (CV12472) bakterisi ile yapılan disk difüzyon yöntemine göre *Q. frainetto* Ten. (A) ve *Q. robur* L.'nin EtOAc fraksiyonlarında anti-QS aktivite analizleri (B). K1: %75 MeOH içeren kontrol; K2: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.63
- Şekil 4.26:** *Quercus robur* L. EtOAc ekstresi uygulanan CV12472 sıvı kültürlerinde 24 sa.'lik üreme (A) ve viyolasin üretimini (B) gösteren grafikler.64
- Şekil 4.27:** Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirleme yöntemine göre %1 (A) ve %2 Rosmarinik asitin etkisi (B). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; 3: saf madde (rosmarinik asit); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.65
- Şekil 4.28:** Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirleme yöntemine göre %1 (A) ve %2 ferulik asitin etkisi (B). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; 3: saf madde (ferulik asit); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.66
- Şekil 4.29:** Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirleme yöntemine göre %1 (A), %2 (B) ve %4 *Q. robur* L. diklormetan ekstresinin etkisi (C). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; D: DMSO (Çözücü) içeren kontrol grubu; 3: Ekstre (*Q. robur* L. diklormetan); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.67
- Şekil 4.30:** Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirleme yöntemine göre %1 (A), %2 (B) ve %4 *Q. frainetto* L. diklormetan ekstresinin etkisi (C). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; D: DMSO (Çözücü) içeren kontrol grubu; 3: Ekstre (*Q. frainetto* L. diklormetan); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.68
- Şekil 4.31:** Rosmarinik asit ve ferulik asit uygulanmış *L. lactis* bakterisi kültürlerinin 18. saat OD₆₀₀ değerleri değerlerini gösteren grafikler. RA: Rosmarinik asit; FA: Ferulik asit; M: %75 Metanol.68
- Şekil 4.32:** *Quercus frainetto* L. ve *Quercus robur* L. diklormetan fraksiyonları uygulanan *L.lactis* bakterisi kültürlerinin 18. saat OD₆₀₀ değerleri değerlerini gösteren grafikler. QF: *Quercus frainetto* L.; QR: *Quercus robur* L.; D: %4 DMSO.69
- Şekil 4.33:** Saf madde ve ekstrelerin uygulandığı kültürlerde nisin anlatım düzeyini gösteren RT-PCR sonuçları. M: DNA markır; RA: %2 Rosmarinik asit; FA: %2 Ferulik asit; M: Metanol; QF: %4 *Quercus frainetto* Ten. diklormetan ekstresi; QR: %4 *Quercus robur* L. diklormetan ekstresi; D: DMSO; içeren *L.lactis* kültürleri ve L: *L. lactis* kültürünü ifade etmektedir.70
- Şekil 4.34:** *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonu ile referans madde olarak gallik asidin (A) ve *Quercus robur* L. n-butanol fraksiyonunun (B) İTK plakalarının görüntüsü. Oklar Rf değerleri aynı olan bantları ve referans maddeleri göstermektedir.71
- Şekil 4.35:** *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun biyootografi analizinde ekstreye ait biyootografi plağı (A) ve İTK plağı (B) ile gallik asitin yürütüldüğü plakaya (C) ait görüntüler. Oklar Rf değerleri aynı olan bantları ile referans maddeleri ve inhibisyon zonunun oluştuğu bölgeyi göstermektedir.71

- Şekil 4.36:** *Quercus robur* L. n-butanol fraksiyonunun biyootografi analizinde ekstreye ait biyootografi plağı (A) ve İTK plağı (B) ile gallik asitin yürütüldüğü plakaya (C) ait görüntüler. Oklar Rf değerleri aynı olan bantları ile referans maddeleri ve inhibisyon zonunun oluştuğu bölgeyi göstermektedir.72
- Şekil 4.37:** *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun HPLC analizi.72
- Şekil 4.38:** *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonu (pembe) ve gallik asit (siyah) HPLC analizlerinin birlikte gösterimi. 1: Fraksiyon içindeki gallik asit piki, GA: referans madde olarak gallik asit (GA) piki.73
- Şekil 4.39:** Gallik asit için HPLC analizi ve alıkonma zamanı.73

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Bazı bakteri türlerinde bilinen QS sistemleri.....	5
Tablo 3.1: Anti-QS aktivite çalışmaları için kullanılan bitkiler ve kullanılan kısımları.	28
Tablo 3.2: Hazırlanan fraksiyonların stok konsantrasyonları ve kullanılan çözücüler.	30
Tablo 3.3: Kullanılan bakteriler ve üretim koşulları.....	31
Tablo 3.4: Nisin üretiminin inhibisyonuna dayalı anti-QS aktivite analizinde kullanılan saf maddeler ve bitki ekstraları.	35
Tablo 3.5: cDNA sentezi için kullanılan primer ve RNA karışımı.....	36
Tablo 3.6: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.	37
Tablo 3.7: RT-PCR bileşenleri ve miktarları.....	37
Tablo 4.1: <i>Quercus frainetto</i> Ten. ve <i>Quercus robur</i> L.'nin EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarının CV12472 irki ile yapılan disk difüzyon analizi sonuçları.....	63
Tablo 4.2: <i>L.lactis</i> kültürüne eklenen bitki ekstraları ve saf maddelerin nisin inhibisyonunu gösteren zon çapı değerleri.	66
Tablo 4.3: <i>Quercus robur</i> L. EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarında belirlenen aktif bantların ve referans maddelerin Rf değerleri.....	70
Tablo 4.4: Gallik asit için HPLC analizi.....	73

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
gr	: Gram
sa	: Saat
dk	: Dakika
rpm	: Devir/dakika
bç	: Baz çifti
kb	: Kilobaz

Kısaltmalar	Açıklama
CH₂Cl₂	: Diklormetan
EtOAc	: Etil asetat
MeOH	: Metanol
DMSO	: Dimetil sülfoksit
4-NPO	: 4-nitropridin- <i>N</i> - oksit
PE	: Petrol eteri

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BAKTERİYEL QUORUM-SENSING İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL OLARAK TANIMLANMASI

Fatma Elif ÇEPNİ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL

“Quorum sensing” (QS), moleküler sinyallere dayanan bakteriler arası bir iletişim mekanizmasıdır. Bu mekanizma patojenite gibi birçok bakteriyel fonksiyonu düzenler. Patojeniteyi baskılamak amacıyla bu mekanizmayı inhibe edebilen bileşikler bazı alglerden ve bitkilerden izole edilmiştir. Ancak Türkiye’de yetişen bitki türleri anti-QS aktivite açısından yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmada, Rize ve İstanbul’da yetişen 26 bitki türünün anti-QS aktiviteleri Gram (-) bir bakteri olan *Chromobacterium violaceum* ‘a dayalı biyomonitör sistemler aracılığıyla test edilmiştir. Sonuç olarak, 22 bitkide anti-QS aktivite bulunmazken, *Quercus robur* L., *Quercus frainetto* Ten., *Epilobium angustifolium* L. ve *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides*’in metanolik ekstralarında % 31-62 arasında anti-QS aktivite bulunmuştur. Yüksek aktivite gösteren *Quercus robur* L.’nin etil asetat fraksiyonunda, viyolasin üretimi %92 oranında baskılanmıştır. İnce tabaka kromatografisi (İTK) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) analizlerine göre fraksiyondaki aktivitenin gallik asitten ileri geldiği düşünülmektedir.

Çalışmada ek olarak, bileşiklerin Gram (+) bakterideki QS sistemi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla *Lactococcus lactis*’e dayalı bir agar biyodifüzyon belirlemesi test edilmiştir. Rosmarinik asit, ferulik asit, *Quercus robur* L. ve *Quercus frainetto* Ten. ekstralarının *L. lactis*’deki QS’e bağlı nisin üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Bu

hücrelerde ayrıca nisin sentezinden sorumlu *nisA* geninin anlatımı azalmıştır. Çalışmada *L. lactis* agar biyodifüzyon belirlemesinin Gram (+) bakterilerde anti-QS analizleri için etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, *Q. robur* L. ve *Q. frainetto* Ten. türlerinin Gram (-) ve Gram (+) bakterilerde QS'i baskıladığı saptanmıştır. Böylece, elde edilen bulgular yeni anti-QS bileşiklerin bulunmasına katkı sağlayacaktır.

Mart, 2014, 110

Anahtar kelimeler: *Quercus* sp., anti-QS, quorum sensing, nisin, agar biyodifüzyon belirlemesi.

SUMMARY

PHD. THESIS

SEARCHING BACTERIAL QUORUM –SENSING INHIBITORS AND THEIR CHARACTERIZATION BY BIOCHEMICAL METHODS

Fatma Elif ÇEPNİ

Istanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Ayşe Filiz GÜREL

Quorum-sensing (QS) is cell-cell communication mechanism based on molecular signaling. This mechanism regulates various function such as pathogenicity. In order to suppression of pathogenicity, compounds that inhibit this mechanism were isolated from some algae and plant species. However, plant species grown in Turkey was not investigated for anti-QS activity sufficiently. In this study, anti-QS activity was analysed in 26 plants originated from Rize and Istanbul by biomonitor systems depend on *Chromobacterium violaceum* as a Gram- negative bacterium. Twenty two plants did not show anti-QS activity while methanolic extract of *Quercus robur* L., *Quercus frainetto* Ten., *Epilobium angustifolium* L. and *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides* showed anti-QS activity between 31-62%. Violacein production was suppressed in a ratio of 92% in the fraction of ethyl acetate of *Quercus robur* L. which was highly active. The activity in the fraction could be depend on gallic acid according to thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) analyses.

In addition, an agar difussion bioassay based on *Lactococcus lactis* was tested to investigate effects of compounds on the QS system in Gram–positive bacteria. Suppression of QS-based nisin production in *L. lactis* was demonstrated by using rosmarinic acid, ferullic acid, *Quercus robur* L. and *Quercus frainetto* Ten. extracts. Expression of *nisA* gene which is responsible for nisin production was also decreased in these cells. Our study showed that *L. lactis* agar difussion bioassay is efficient to monitor anti-QS activity in Gram (+) bacteria. As a result, *Q. robur* L. and *Q. frainetto* Ten. have been found to suppress QS in both Gram (-) and Gram (+) bacteria. Thus, the obtained findings will contribute to isolate new anti-QS compounds.

March, 2014, 110

Keywords: *Quercus* sp., anti-QS, quorum sensing, nisin, agar diffusion bioassay.

1. GİRİŞ

Bakterilerin çoğu hücreler arası iletişimi sağlamak için “quorum–sensing” (QS) adı verilen mekanizmayı kullanır. Bu mekanizma bir bakteri popülasyonundaki hücre yoğunluğuna bağlı olarak artan sinyal moleküllerin varlığında gen anlatımının düzenlenmesini sağlar. Bu sayede bakteri popülasyonu çevresel değişimlere karşı davranışsal tepki geliştirme kabiliyeti kazanır. Bu iletişim bakteri hücreleri tarafından sentezlenip ortama salınan ve otoindükleyici adı verilen sinyal molekülleri aracılığıyla olur. Bu moleküller bakterilerin sahip olduğu reseptörler tarafından algılanarak transkripsiyonel düzenlenmeyi sağlarlar.

“Quorum-sensing” sadece aynı tür bakteriler arasındaki iletişimi sağlamakla sınırlı kalmayıp farklı türden mikroorganizmaların da iletişim kurabilmesini sağlar. Bakteri kültürlerinde biyofilm oluşumu, çeşitli virulens genlerin anlatımı, antibiyotik üretimi, sporulasyon gibi birçok bakteriyel davranışın QS kontrolünde gerçekleştiği bilinmektedir. QS sistemi tüm mikroorganizmalarda genel olarak sinyal molekülünün sentezlenmesi, salgılanması ve algılanması olarak üç aşamadan oluşur (de Kievit ve Iglewski, 2000). Ancak sentezlenen sinyal molekülünün yapısı, salgılanma ve algılanma mekanizmaları türlere göre farklılık gösterir. Gram (-) bakterilerde sinyal molekülü *N*-açil-homoserin lakton (AHL) yapısındadır ve hücre zarından difüzyon yoluyla salgılanır. Gram (+) bakteriler ise peptid yapıda sinyal molekülleri kullanırlar ve hücre zarındaki özel bir sistem aracılığıyla ortama salınırlar. Bu sinyal moleküllerinin algılanması doğrudan hücre içerisine alınması ya da hücre içine alınmadan zarda bulunan reseptörler aracılığıyla gerekli proteinlerin aktivasyonu şeklinde gerçekleşir (Schauder ve Bassler, 2001).

İlk olarak 1970’lerde *Vibrio* cinsi deniz bakterilerinde keşfedilen QS mekanizmasının (Nealson ve diğ.,1970; Eberhard, 1972) günümüzde birçok bakteri tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Bunlar arasında AHL aracılı QS sistemini kullandığı bilinen bir bakteri de *Chromobacterium violaceum*’dur. *C. violaceum* ırkları sinyal molekülü olarak *N*-hekzanoil-HSL (C6-HSL) kullandıkları QS sistemleri aracılığıyla viyolasin

(mor pigment) sentezini gerçekleştirirler (McClellan ve diğ.,1997). Bu bakterinin mutanti olan CV026 ırkı ise sinyal üretimini kendi gerçekleştiremediği için dışarıdan eklenecek sinyal molekülüne ihtiyaç duyar.

Yapılan çalışmalarda kırmızı deniz algi olan *Delisea pulchura*'dan izole edilen halojenlenmiş furanonların (Manefield ve diğ., 1999; Manefield ve diğ., 2002; Martinelli ve diğ., 2004), patulin ve 4-nitropiridin-*N*- oksit (4-NPO) gibi bileşiklerin (Hentzer ve diğ., 2003, Rasmussen ve diğ., 2005) yanısıra çeşitli bitkisel ekstraktların de (Çepni ve Gürel, 2011) QS sistemini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar yüksek yapılı bitkilerin içerdikleri bileşikler bakımından anti-QS etkiye sahip olabileceklerini gündeme getirmiştir. Diğer yandan, Türkiye'deki bitki sayısının çokluğu, birçok endemik ve tıbbi öneme sahip bitki çeşidini barındırıyor olması yeni ilaç hammaddesi araştırmaları bakımından büyük potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Günümüzde bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin yetersiz kalması yeni hedef mekanizma ve ilaç hammaddesi arayışlarını artırmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında Türkiye florasındaki bazı bitki türleri toplanarak, QS mekanizmasını inhibe eden bileşikler yönünden incelenmiştir.

Bu amaçla tez çalışmasında, Rize ve İstanbul illerinden toplanan *Trifolium aureum* Poll., *T. pratense* var. *pratense* L., *Hypericum hirsutum* L., *H. perforatum* L., *H. bupleuroides* Gris., *H. bithynicum* Boiss., *H. orientale* L., *Linaria genistifolia* subsp. *genistifolia* (L.) Miller, Türkiye endemiği olan *Centaurea lycopifolia* Boiss. & Kotschy, *Centaurea nigrifimbria* (C. Koch) Sosn., *Achillea biebersteinii* Afan., *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides* (Schultz Bip.) Grierson, *Carduus adpresus* C.A. Meyer, *Epilobium angustifolium* L., *Echium vulgare* L., *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* (L.) Hudson, *Salvia verticillata* subsp. *verticillata* L., *Salvia forskahlei* L., *Stachys iberica* subsp. *iberica* var. *iberica* Bieb., *Stachys macrantha* (C. Koch) Stearn., *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile* (C. Koch.) Ietswaart, *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* (Ronniger) Jalas var. *groshemii* (Ronniger) Jalas, *Thymus pseudopulegioides* Klokov & Des.-Shost., *Quercus petraea* (Mattuschka) Lieb., *Q. frainetto* Ten. ve *Q. robur* L. bitki türlerine ait ekstraktlar elde edilmiştir. Daha sonra bu ekstraktlar Gram (-) bir biyomonitör ırk (*C. violaceum*) yardımıyla bakteriyel QS aktivitesini önleyici bileşikler açısından incelenmiştir.

Aynı zamanda QS aracılı nisin üretimi yapan Gram (+) *Lactococcus lactis* bakterisinin kullanıldığı agar biyodifüzyon belirleme yönteminin, anti-QS maddelerin araştırılabilmesi için yeni bir model sistem olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. QUORUM SENSING (QS) MEKANİZMASI

Bakterilerde hücreler arası iletişim sinyal molekülleri aracılığıyla sağlanır. Bakteri sayısı arttıkça hücre dışına salınan bu sinyal moleküllerinin sayısı da artmakta ve bu artış sayesinde bakteri popülasyonunun büyüklüğü diğer hücreler tarafından algılanabilmektedir. Bakterilerin, belli bir yoğunlukta bu sinyalleri algılayarak çeşitli davranışlar sergilemesine “quorum-sensing” (QS) adı verilir. Bu tanım; salt çoğunluk anlamına gelen “quorum” ve algılama anlamına gelen “sensing” sözcüklerinden oluşur.

QS mekanizması ilk olarak 1970’lerde *Vibrio* cinsi deniz bakterilerinde keşfedilmiştir (Nealson ve diğ., 1970; Eberhard, 1972) ve ancak 1983’de tanımlanmıştır (Engebrecht ve diğ., 1983). Bu bakterilerde sinyal molekülleri yeterli konsantrasyon düzeyine ulaştığında biyoluminesans oluşumu için gerekli genlerin aktifleştiği saptanmıştır. Sinyal moleküllerinin konsantrasyonuna bağlı olarak gen anlatımında değişiklikler ve aynı zamanda bakteri popülasyonu içindeki hücrelerin birbirleri ile eşzamanlı bir şekilde hareket etmesi sağlanmaktadır. Sinyal molekülleri bu şekilde düzenleyici etki gösterdikleri için otoindükleyici “autoinducer – AI” olarak tanımlanmışlardır.

Bakteri hücreleri sahip oldukları QS mekanizmaları sayesinde değişen koşullara cevap olarak toplu davranışlar sergileyebilmektedirler. Antibiyotik üretimi, biyoluminesans oluşumu, biofilm oluşumu, virulens faktör üretimi, sporulasyon, konjugasyon bunlara örnek olarak verilebilir.

QS mekanizmasında sinyal molekülünün sentezlenmesi, salgılanması ve diğer bakteri hücreleri tarafından algılanması sonucunda türe özgü davranışlar ortaya çıkar. *Vibrio* türlerinde biyoluminesans oluşumu, *Pseudomonas aeruginosa*’da biyofilm oluşumu, birçok bakteride virulens faktör üretimi, *Bacillus subtilis*’te sporulasyon, *Agrobacterium tumefaciens*’de T₁ plazmidinin taşınması, *Chromobacterium violaceum*’da viyolasin üretimi bunlara örnek olarak verilebilir.

2.1.1. QS Mekanizmasını Kullanan Mikroorganizmalar

Son yıllarda giderek artan çalışmalar QS mekanizmasının bakteri dünyasında oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Günümüzde Gram (-) ve Gram (+) birçok bakteri türünde QS sistemi, sinyal molekülleri ve ortaya çıkan davranış biçimi bilinirken birçok bakteri türü için de benzer çalışmalar devam etmektedir (Tablo 2.1). Bununla birlikte ökaryotik mikroorganizmalarda da bu mekanizmanın var olduğu bilinmektedir. Ökaryotlarda QS mekanizmasına ilk örneklerden biri parazit bir mantar türü olan *Histoplasma capsulatum*'da maya ve filamentli form arasındaki geçişin düzenlenmesidir (Kügler ve diğ., 2000). Bu türde maya formuna geçiş sırasında glukoz seviyesinin arttığı ve bu artışın hücre yoğunluğuna bağlı olarak ortama salınan bir faktöre bağlı olduğu bilinmektedir. Yine benzer bir durumun *Ceratocystis ulmi* türündeki form geçişinde rol oynadığı bilinmektedir (Hornby ve diğ., 2004). Dimorfik fungal bir insan patojeni olan *Candida albicans* 'da da maya ve filamentli forma geçişin iki QS molekülüne dayalı olarak kontrol edildiği bilinmektedir. Bu moleküller yüksek hücre yoğunluğunda filamentli forma geçişi engelleyen farnesol (Hornby ve diğ., 2001) ve düşük hücre yoğunluğunda hücre büyümesi ve germ tüpü oluşumunu indükleyerek maya formdan filamentöz forma dönüşü hızlandıran tirosoldür (Chen ve diğ., 2004). QS mekanizması aynı türe ait bakteriler, farklı bakteri türleri, prokaryotik ve ökaryotik türler arasında iletişimin sağlanmasında rol oynamaktadır.

Tablo 2.1: Bazı bakteri türlerinde bilinen QS sistemleri.

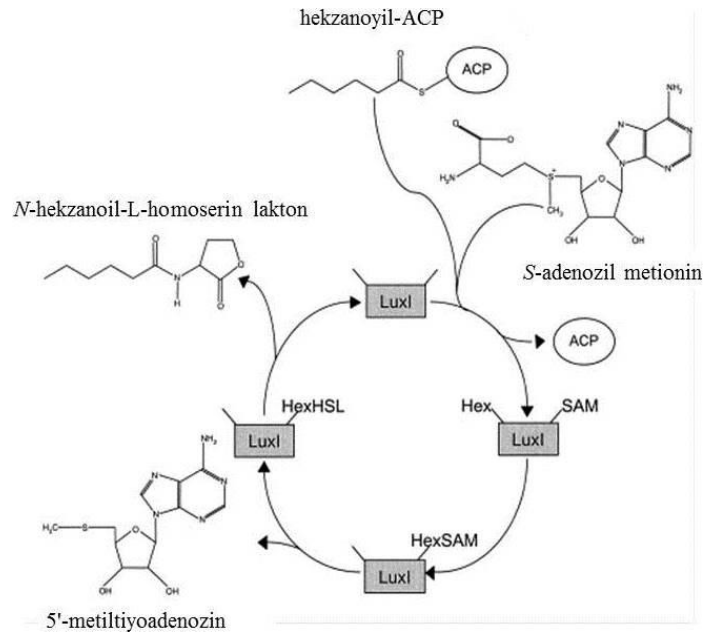
Organizma	QS'den sorumlu genler	Otoindükleyici Molekül	Fonksiyonlar	Kaynaklar
<i>Vibrio fischeri</i>	<i>LuxI / LuxR</i>	<i>N</i> -(3oksoheksanoil)-HSL	Biyoluminesans	Engebrecht ve diğ., 1983 Eberhard ve diğ., 1981
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>TraI / TraR</i>	<i>N</i> -(3oksooktanoil)-HSL	T-DNA transferi	Piper ve diğ., 1993 Zhang ve diğ., 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>LasI / LasR</i> <i>RhII / RhIR</i>	<i>N</i> -(3oksododekanoil)-HSL <i>N</i> -Butiril-HSL	Virülens faktör üretimi	de Kievit ve Iglewski, 2000 Pearson ve diğ., 1994
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>SwrI / SwrR</i>	<i>N</i> -Butanoil-HSL	Hücre genişlemesi, flagella oluşumu	Eberl ve diğ., 1996 Givskov ve diğ., 1997

<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	<i>CerI / Cer R</i>	7,8- <i>cis</i> - <i>N</i> -tetradekanoil-HSL	Hücre toplanması	Puskas ve diğ.,1997
--------------------------------	---------------------	---	------------------	---------------------

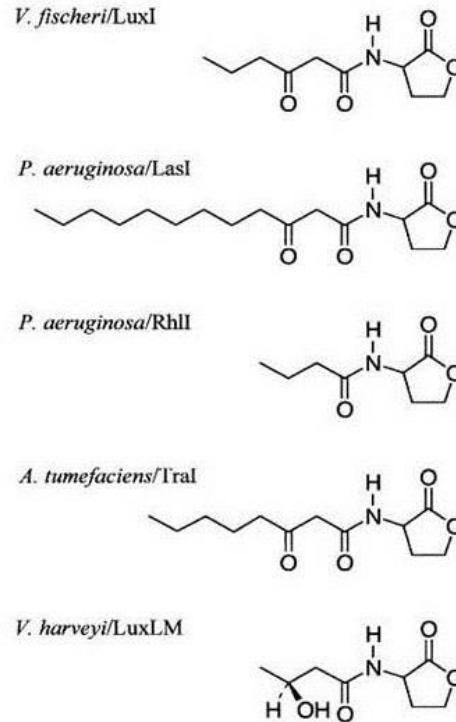
2.1.2. QS Mekanizmasının Sinyal Molekülleri

QS mekanizmalarında rol oynayan sinyal molekülleri türlere göre değişmekle birlikte üç ana gruba ayrılır.

Açıl-homoserin lakton (AHL veya HSL) türevleri Gram (-) bakteriler tarafından kullanılırlar ve hücre zarı boyunca difüzyonla taşınırlar. Bu grupta tanımlanan ilk sinyal molekülü *N*-(3-oksoheksanoil)-homoserin lakton (3-okso-C6-HSL)'dir (Eberhard ve diğ., 1981). Açıl homoserin laktonların sentezi LuxI benzeri enzimler aracılığıyla *S*-adenozil metionin (SAM) ve açıl-açıl taşıyıcı protein (açıl-ACP) substratları üzerinden gerçekleşir. LuxI, açıl grubu taşıyan proteinden (açıl-ACP) kopardığı açıl yan grubu ile SAM arasında bir amid bağı oluşumunu sağlar. Bu bağ oluşumu sırasında bir yan ürün olarak 5'-metiltiyoadenozin (MTA) ve açillenmiş-HSL molekülü oluşur (Şekil 2.1). Sinyal moleküllerinin özgülüğü açıl yan zincirlerin uzunluğu ve modifikasyonlarından kaynaklanır (Şekil 2.2).

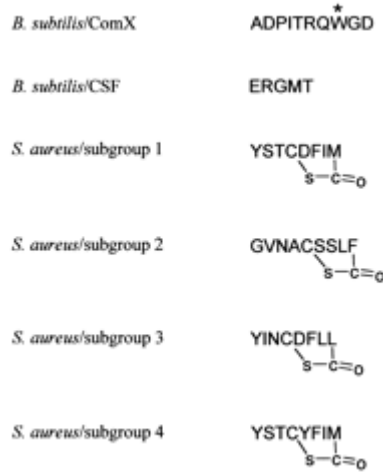


Şekil 2.1: Açillenmiş homoserin lakton (AHL) biyosentezi (Whitehead ve diğ., 2001'den alınmıştır).



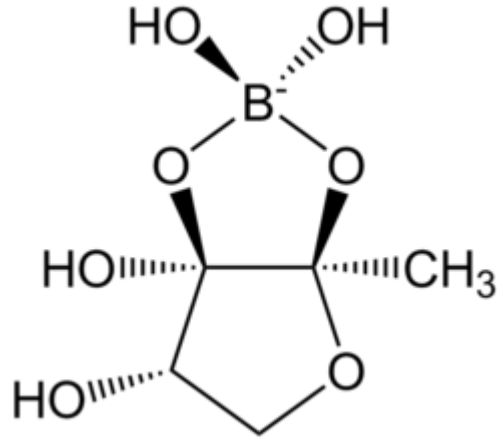
Şekil 2.2: Farklı bakteri türlerine özgü AHL sinyal molekülleri (Schauder ve Bassler, 2001'den alınmıştır).

Gram (+) bakteriler tarafından kullanılan QS sinyal molekülleri otoindükleyici oligopeptidler (AIP) olarak adlandırılan küçük peptidlerdir. Hücre zarına bağlı histidin kinaz reseptörleri ile tanınırlar ve iki bileşenli fosforlama zinciri kullanırlar. AIP'lerin sentezi daha uzun bir öncül peptidin parçalanmasıyla olur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Bazı Gram (+) bakteriler tarafından kullanılan AIP'lerin yapısı (Schauder ve Bassler, 2001'den alınmıştır).

Otoindükleyici-2 (AI-2) olarak adlandırılan diğer sinyal grubu ise hem Gram (-) hem de Gram (+) bakteriler tarafından kullanılır. Furanosil borat diester türevleri olan bu moleküller (Şekil 2.4) diğer sinyal molekül gruplarının tersine türe özgü olmayan yani türler arası iletişimi sağlarlar. Bakteri türlerinde yüksek seviyede homoloji gösteren korunmuş bir gen olan *luxS*, AI-2 moleküllerinin üretimi için gereklidir.



Şekil 2.4: Furanosil borat diester (AI-2) yapısı (Uva, 2011'den alınmıştır).

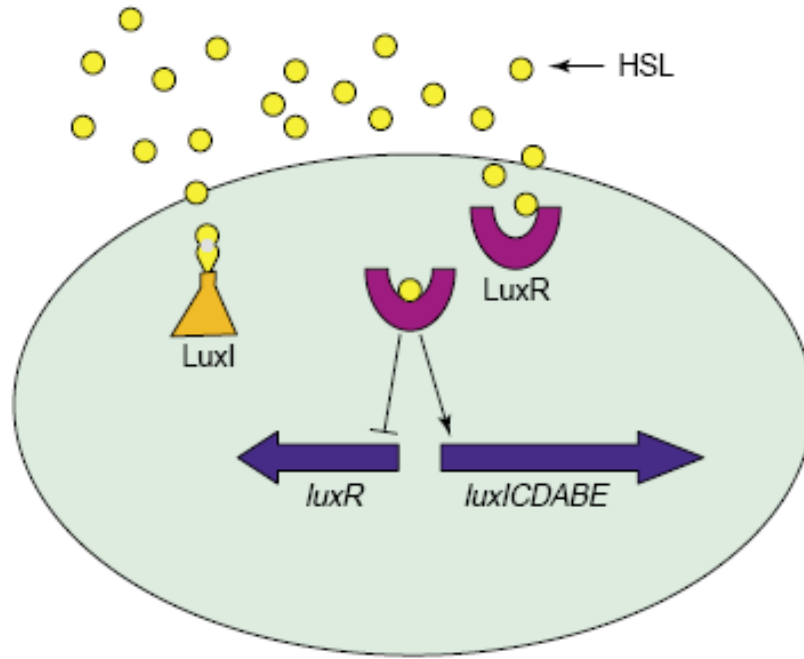
2.1.3. QS Sistemleri

Salgılanan molekül ve algılama mekanizmasına göre QS mekanizmaları üç gruba ayrılır.

2.1.3.1. *LuxI/LuxR Sistemi*

Egland ve Greenberg, 1999' un QS mekanizması için gerekli genlerin analizi ile ilgili yaptığı çalışmalar bugün diğer QS sistemlerine örnek olan, *V. fischeri*' deki QS mekanizmasının esas modelini ortaya çıkartmıştır. *LuxI/LuxR* sistemi olarak adlandırılan bu sistemde *V. fischeri*'nin populasyon yoğunluğu yaklaşık 10^{11} hücre/ml üzerine çıktığında QS'e bağlı olarak ışımaya (biyoluminesans) özelliği ortaya çıkar. Bu sistemde *LuxI* geni bir otoindükleyici olan *N*-(3-oksoheksanoil)-homoserin lakton'un sentezinde görevli bir enzimi kodlamaktadır. *LuxR* ise otoindükleyiciye bağlanabilen bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Oluşan bu kompleks daha sonra *luxICDABE* operonunun önüne bağlanarak lusiferaz sentezi ile ilgili çeşitli genlerin anlatımının yapılmasını sağlar. Eş zamanlı olarak *LuxI* gen ürününün de sentezi uyarılır (Şekil 2.5).

Gram (-) bakterilerdeki QS mekanizmaları *LuxI/LuxR* sisteminin homologlarıdır. Bunlara örnek olarak *Pseudomonas aeruginosa*'nın *LasI/LasR* ve *RhlI/RhlR* sistemleri, *Agrobacterium tumefaciens*'in *TraI/TraR* sistemi, *Erwinia carotovora*'nın *ExpI/ExpR* sistemi verilebilir.

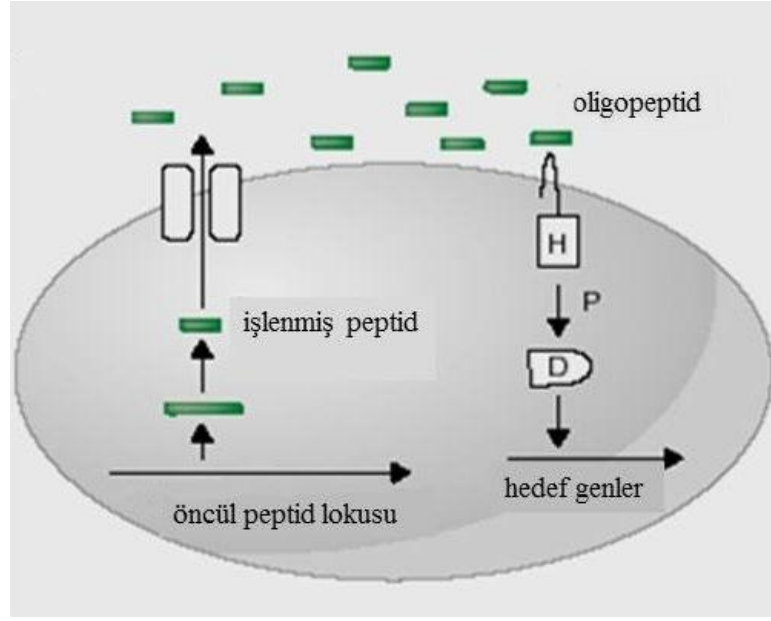


Şekil 2.5: LuxI/LuxR sisteminin şematik gösterimi (Xavier ve Bassler, 2003).

2.1.3.2. Oligopeptid Sistemi

Gram (+) bakteriler tarafından kullanılan bu sistemde sinyal moleküller oligopeptid yapıdadır ve hücre zarında bulunan bir ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı protein aracılığıyla hücre dışına geçer. Hücreler arasında biriken sinyal peptidler iki bileşenli sistemle etkileşince histidin kinaz reseptörü otofosforillenir ve bu reaksiyon sonucunda düzenleyici protein de fosforillenerek aktif hale geçer. Böylece AIP'ler hedef genler üzerinde düzenleyici etkilerini gösterirler (Şekil 2.6).

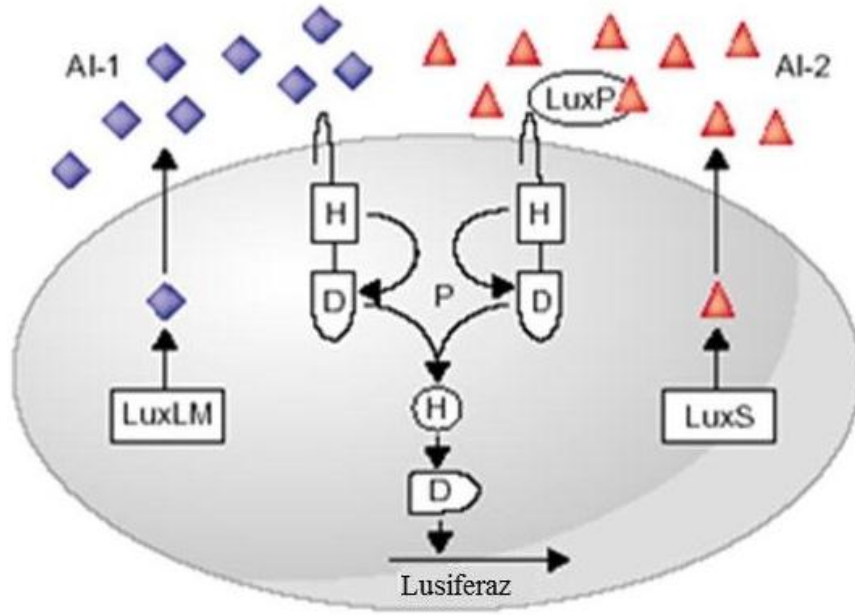
Staphylococcus aureus'un virulens genleri, *B. subtilis*'in kompetans ve sporulasyonla ilgili genleri, *Enterococcus faecalis*'in konjugatif plazmid transferinden sorumlu genleri, *Lactococcus lactis*'in nisin üretiminden sorumlu genler bu sistem ile kontrol edilmektedir.



Şekil 2.6: Oligopeptid sisteminin şematik gösterimi (Xavier ve Bassler, 2003).

2.1.3.3. Hibrit Sistem

İlk olarak *V. harveyi*'de bulunan bu sistemde bakteri AHL benzeri sinyal molekülleri sentezleyip difüzyon yoluyla hücrelerarası ortama salgımlarken bu sinyal moleküllerinin algılanması ve hücre içine taşınması iki bileşenli sistem aracılığıyla gerçekleşmektedir (Bassler ve Miller, 2006). Bu sinyal molekülleri otoindükleyici-2 (AI-2) olarak adlandırılmaktadır ve AHL'lerden farklı olarak QS sisteminde türler arası iletişimi sağlamaktadırlar (Şekil 2.7). AI-2'nin üretiminden sorumlu olan *luxS* gen homologlarının *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* gibi bakterilerinde içerisinde yer aldığı otuzdan fazla bakteri türünde bulunduğu bilinmektedir (Bassler ve Miller, 2006).



Şekil 2.7: Hibrit sistemin şematik gösterimi (Xavier ve Bassler, 2003).

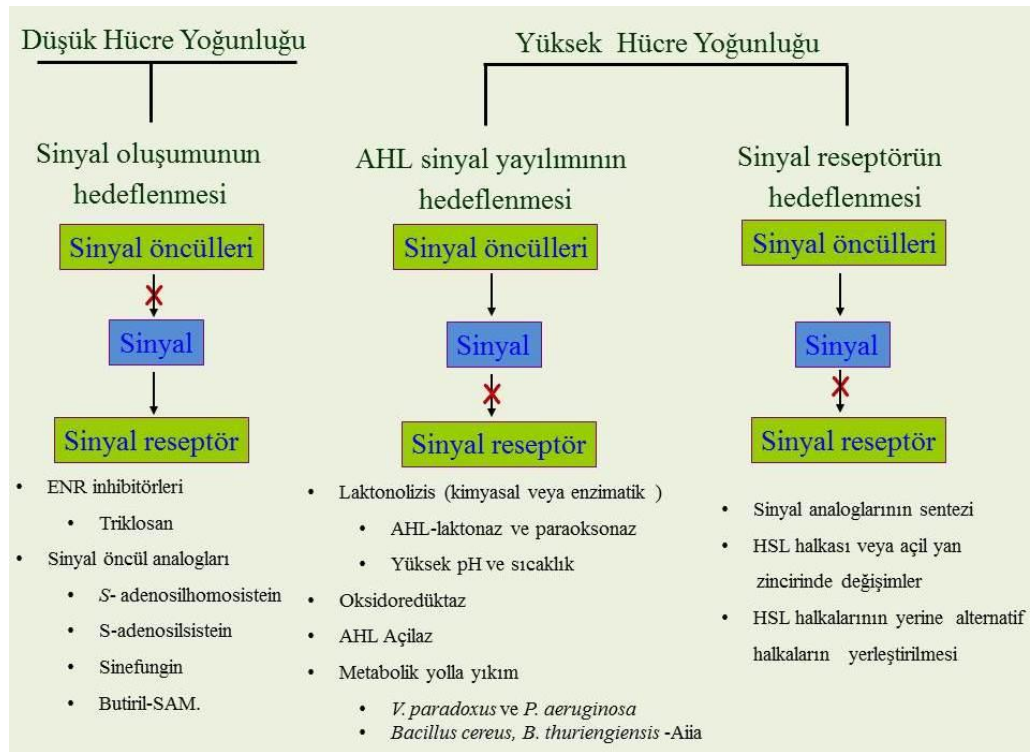
2.2. QS MEKANİZMASININ İNHİBİSYONU

Farklı inhibisyon mekanizmaları QS sisteminde farklı adımları engelleyerek çalışır (Şekil 2.8). Düşük hücre yoğunluğunda yağ asidi biyosentezinin ve sinyal öncüllerinin inhibisyonu yoluyla sinyal oluşumunun engellenmesi sağlanırken, yüksek hücre yoğunluğunda ise LuxR tipi proteinlerin inhibisyonu ve AHL sinyalinin enzimatik yada kimyasal bozunması yoluyla sağlanır (Dong ve diğ., 2007).

AHL tipi sinyal sentezinin engellenmesi için iki büyük potansiyel hedef enoil-ACP redüktaz (ENR) ve bu enzimin substratı olan S-adenozil metionin (SAM)'dır (Zhang, 2003; Dong ve diğ., 2007). Örneğin, biyosid olarak yaygın kullanılan triklosan, enoil-ACP redüktaz inhibitörüdür ve AHL üretimini de indirgemektedir (Hoang ve Schweizer, 1999). Bunun dışında holo-ACP, L / D-S-adenozilhomosistein, sinefungin ve butiril-S-adenozilmetionin (butiril-SAM) gibi sinyal öncül analoglarının *in vitro* koşullarda AHL üretimini engellediği tespit edilmiştir (Şekil 2.8) (Parsek ve diğ., 1999).

Aktif sinyal moleküllerinin engellenmesi metabolik, kimyasal ve enzimatik olarak gerçekleşebilir. *Variovorax paradoxus* ve *P. aeruginosa* PAI-A gibi bazı bakteriler AHL molekülünü metabolize etme yeteneği sayesinde QS mekanizması inhibe

edilebilmektedir (Leadbetter ve Greenberg 2000; Huang ve diğ., 2003). AHL moleküllerinin kimyasal bozunması ise ilk olarak Yates ve diğ., 2002 tarafından rapor edilmiştir. Buna göre alkalın pH'da lakton halkasının açılarak sinyal molekülünün inaktifleştiği bilinmektedir. Asidik pH'da ise halka yapısı yeniden oluşarak sinyal molekülü aktivitesini geri kazanır. QS sinyal moleküllerinin enzimatik yolla yıkımı prokaryotlarda (Dong ve diğ., 2000; Zhang ve diğ., 2002a; Uroz ve diğ., 2009; Chen ve diğ., 2009) yaygın olmakla beraber birkaç ökaryotta da (Draganov ve diğ., 2000; Chun ve diğ., 2004; Hastings, 2004; Uroz ve Heinon, 2008) gözlenmiştir. Bu enzimler AHL-açılaz, AHL-laktonaz, laktonaz benzeri enzimler (paraoksonazlar) ve oksidoredüktazlar olup sinyal molekülündeki amid bağlarını ya da lakton halkasını hidroliz ederler (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Bakterilerde düşük ve yüksek hücre yoğunluğunda QS'in engellenmesi amacıyla kullanılan olası mekanizmalar.

Sinyal reseptörünü hedefleyen inhibisyon mekanizmalarında ise antagonist moleküller rol oynarlar. Bu moleküller doğal AHL sinyal molekülü ile rekabet halinde Lux R tipi reseptör moleküle bağlanarak QS'i engelleyebilirler. Sinyal analoglarının varlığı, HSL halkası veya açıl yan zincirinde yapılacak değişimler ve HSL halkalarının yerine

alternatif halkaların yerleştirilmesi ile QS inhibisyonu sağlanabilir (Şekil 2.8). Buna ilişkin örnekler sonraki bölümlerde (2.2.1 ve 2.2.2) ayrıntılı olarak verilmektedir.

2.2.1. QS mekanizmasını İnhibe Edebilen Doğal Bileşikler

Furanon türevleri QS inhibisyonuna neden olduğu bilinen ilk doğal bileşiklerdendir. Yapısal olarak HSL moleküllerine benzerler ve LuxR proteinine bağlanarak sinyal molekülünün bağlanmasını engellerler.

Kırmızı deniz algı *Delisea pulchra* çok sayıda farklı halojenlenmiş furanon bileşiği üretmektedir ve bu organizmadan izole edilen bromür grubuna sahip furanon yapıda bir maddenin QS sinyal sistemini etkileyerek mekanizmayı inhibe ettiği bilinmektedir (Manefield ve diğ.,1999; Ren ve diğ., 2004). Yine *Laminaria digitata*'nın ürettiği oksitlenmiş halojenler özellikle 3-okso-AHL'ler ile reaksiyona girerek sinyalleşme yeteneğini bozar (Borchardt ve diğ., 2001). Ancak furanonların yüksek toksisiteye neden olması bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaları açısından sakıncalıdır. Tek hücreli yeşil alglerden *Chlamydomonas reinhardtii* de taklit bakteriyel molekülleri üreterek QS'i engelleyebilme yeteneğine sahiptir (Teplitski ve diğ., 2004).

Medicago truncatula ve *Pisum sativum* bitkilerinin salgıladıkları taklit AHL sinyalleri aracılığı ile bakterilerde AHL ile düzenlenen bazı yanıtları uyardıkları ve bazılarını inhibe ettikleri gösterilmiştir (Teplitski ve diğ., 2000; Gao ve diğ., 2003; Mathesius ve diğ., 2003). Benzer şekilde laktonaz anlatımı yapan rekombinant tütün ve patates bitkileri de AHL sinyal moleküllerini bozarak QS'e dayalı bakteriyel enfeksiyonlara direnç kazanmıştır (Dong ve diğ., 2000, Dong ve diğ., 2001). *Lotus corniculatus* fidelerinin çimlenme sürecinde salınan bir maddenin de bakteriyel AHL sinyallerini inaktive edebileceği gösterilmiştir (Delalande ve diğ., 2005).

Güney Florida orijinli tıbbi bitkilerde yapılan tarama sonucunda 50 bitkinin altısında anti-QS aktivitesi saptanmıştır (Adonizio ve diğ., 2006). Ayrıca, vanilya, sarımsak, ülkemiz kökenli *Scorzonera sandrasica*, *Ananas comosus*, *Musa paradisiaca*, *Manilkara zapota* ve *Ocimum sanctum*, *Sonchus oleraceus* ve *Laurus nobilis*'de QS'i baskıladığı belirlenmiştir (Choo ve diğ., 2006; Rasmussen ve diğ.,2005; Boşgelmez-Tınaz ve diğ., 2007; Al-Hussaini ve diğ., 2009; Musthafa ve diğ., 2010). Epigallokateşin galat bakımından zengin yeşil çay (*Camellia sinensis* L.) preparatında (Taganna ve diğ.,

2008) ve akasya ağacından (*Acacia nilotica*) elde edilen bazı ekstrelerde (Singh ve diğ., 2009a) de anti-QS aktivite belirlenmiştir. Sitrus flavonoidlerinin *V. harveyi*'de, bakteriyel iletişimi engelleyerek biyofilm oluşumunu önlediği bildirilmektedir (Vikram ve diğ., 2011).

Combretum albiflorum kabuğunda bulunan bir flavonoid (flavan-3-ol kateşin) *P. aeruginosa*'da QS'e bağlı piyosyanin, elastaz ve biyofilm oluşumunu engelleyebilmektedir (Vandeputte ve diğ., 2010). *Hamamelis virginiana* kabuğunda doğal olarak bulunan bir hamamelitaninin (2',5-di-O-galloil-D-hamameloz) bir QS inhibitörü gibi davranarak stafilokokal enfeksiyonlarını önlediği saptanmıştır (Kiran ve diğ., 2008).

Terminalia chebula meyvesinden elde edilen elajik asit türevlerinin *P. aeruginosa*'da *lasR* *rhIR* genlerinin anlatımını etkileyerek virulens faktörlerin oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Sarabhai ve diğ., 2013). *Capparis spinosa* (Packiavathy ve diğ., 2011) ve *Kigelia africana* meyvesine ait ekstrelerde de anti-QS aktivitenin varlığı gösterilmiştir (Chenia, 2013).

Bitki ekstrilerinin dışında bitkisel yağların da benzer potansiyele sahip oldukları söylenebilir. Dokuz tıbbi bitkinin esansiyel yağları ile yapılan bir çalışmada gül (*Rosa damascena* L.), lavanta (*Lavandula angustifolia* L.), turnagagası (*Geranium robertianum* L.) ve biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) esansiyel yağlarında (Szabó ve diğ., 2010), Kolombiya florası kökenli *Piper* spp., *Ocotea* sp. ve *Lippia alba*'nın esansiyel yağlarında çeşitli seviyelerde anti-QS aktivitesi gözlenmiştir (Olivero ve diğ., 2011; Jaramillo-Colorado ve diğ., 2012). *Syzygium aromaticum*'dan elde edilmiş bitkisel yağlarda da (Khan ve diğ., 2009) QS inhibisyon potansiyeli gösterilmiştir. Yine kestane balınında AHL sinyalini inhibe ettiği ve biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Truchado ve diğ., 2009).

S. aureus, *Listeria innocua* ve *E. faecalis*'de siklik peptid sinyalinin biyosentezini inhibe eden ambuik asit ise fungal kökenli diğer doğal QS inhibitörlerindedir (Nakayama ve diğ., 2009).

2.2.2. QS Mekanizmasını İnhibe Edebilen Sentetik Bileşikler

QS inhibitörleri olarak AHL sinyallerinin analoglarının sentezlenmesi için açıl yan zincirinde yer değişimleri, lakton halkasında değişim ya da her iki bileşende de değişimler yapılabilir. Açıl yan zincirinde belirli pozisyonlardaki karbonların sülfid grupları ile yer değiştirmeleri sonucu ortaya çıkan sentetik moleküllerin QS inhibitör aktivitelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Castang ve diğ., 2004; Persson ve diğ., 2005). Özellikle uzun yan zincirde yapılan değişimlerde yada yan zincirin uzatılmasıyla QS inhibisyonunun arttığı rapor edilmiştir (Chhabra ve diğ., 1993; Qazi ve diğ., 2006). Beş ile on karbon uzunluğunda açıl yan zincire sahip *N*-açıl-siklopentilamid moleküllerinin farklı QS sistemleri üzerinde baskılayıcı etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Ishida ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2008). Yine sülfonilürelere türevlenmiş sentetik HSL'lerin de inhibitör aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir (Frezza ve diğ., 2008). 3-okso-C12-HSL sinyal molekülünün uzun yan zincirinde yapılan varyasyonlar sonucu elde edilen sinyal analoglarının *P. aeruginosa*'da virulens faktör üretimi ve biyofilm oluşumunu azaltarak QS sistemini inhibe ettiği bilinmektedir (Smith ve diğ., 2003). 4-nitropiridin-*N*-oksit (4-NPO), indol, *p*-benzokinon, 2,4,5-tribromoimidazole ve 3-nitrobenzen sülfonamid gibi bileşiklerin QS aracılığı ile düzenlenen *P. aeruginosa* genlerinin anlatımını oldukça azalttığı bilinmektedir (Rasmussen ve diğ., 2005). Azitromisin ve eritromisin gibi makrolidlerin de *P. aeruginosa*'da HSL üretimini etkileyerek virulans faktörlerin üretimini ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir (Molinari ve diğ., 1993; Ichimiya ve diğ., 1996; Sofer ve diğ., 1999; Tateda ve diğ., 2001; Nalca ve diğ., 2006).

Halojenlenmiş furanon türevlerinin *E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* gibi bakterilerde biyofilm oluşumu ve kayma hareketliliği "swarming motility" i inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ren ve diğ., 2001; Ren ve diğ., 2002; Lönn-Stenrud ve diğ., 2009). Hentzer ve diğ., 2002 ve 2003'de yaptıkları çalışmalarda sentetik iki furanon türevinin (C30 ve C56) *P. aeruginosa*'nın QS sistemini inhibe etmede etkili olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda Lönn-Stenrud ve diğ., 2009' da anti-QS etki gösteren iki furanonun [(Z)-5-(bromometilen) furan-2(5H)-one ve (Z)-4-bromo-5-(bromometilen) furan-2(5H)-one] kullanılan konsantrasyonlarda tahriş edici ve genotoksik etki göstermediğini ve bu nedenle *S. epidermidis*' in yüzey kolonizasyonundan korunmak için umut verici ajanlar olabileceklerini rapor etmişlerdir.

Diğerlerinden farklı bir yaklaşım olarak QS aracılı mikrobiyel enfeksiyonların engellenmesi için anti-AHL monoklonal antikorlarının geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (Kaufmann ve diğ., 2006; Kapadnis ve diğ., 2009).

2.3. ANTİBAKTERİYEL ETKİ MEKANİZMALARINA ALTERNATİF OLARAK QS MEKANİZMASININ ÖNEMİ

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerin farklı etki mekanizmaları vardır. Başlıca etki mekanizmaları (i) hücre zarının etkilenmesi,(ii) bakteri hücre duvarı sentezinin, (iii) DNA sentezinin ve (iv) protein metabolizmasının engellenmesi olarak özetlenebilir. Polimiksin türü antibiyotikler hücre zarının fonksiyonel bütünlüğünü bozarak etki ederken, beta laktam antibiyotikler bakteri hücre duvarını oluşturan peptidoglikan yapının sentezi için gerekli enzimleri inaktive ederler. Sulfanamidler ve kinolonlar DNA sentezini farklı yollardan engelleyerek bakterinin üremesini durdururlar. Tetrasiklinler ise ribozomların küçük ve büyük alt ünitelerine bağlanarak onları bloke ederler ve böylece bakterilerin çoğalmasını engellerler. Anlaşılabacağı üzere antibiyotiklerin etki mekanizmaları çoğunlukla bakterilerin ölümüne neden olduğundan bakterilerin bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirme eğilimi yüksek olmaktadır. Bakterilerde direnç gelişimi çok farklı yollarla olmaktadır. Bakteriler antibiyotiğin hedeflediği yapıyı değiştirerek veya fazla üreterek, antibiyotiğin bakteriye girişini engelleyerek, antibiyotiği inaktive edecek enzimler üreterek, farklı metabolik yollar geliştirerek ve antibiyotiğin yapısını modifiye ederek (asetilasyon, fosforilasyon ve adenilasyon) mevcut antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilirler. Günümüzde metisiline dirençli *S. aureus*'un neden olduğu hastane enfeksiyonlarının tedavisinde yaşanan güçlükler bunun en belirgin örneğidir. Bu durum antibiyotiklerin tedavi konusunda yetersiz kalmalarına yol açmakta ve tedavi süreçlerini olumsuz etkilemektedir. Ancak QS mekanizmasının önlenmesi bakterinin üremesini engellemediği ve bakterisidal bir etki göstermediği için bakteri hücreleri üzerinde bir seleksiyon baskısı oluşmamaktadır ve direnç mekanizmalarının gelişimi söz konusu olmamaktadır.

Bununla birlikte virulens faktörlerin üretimi başta olmak üzere patojenite ile alakalı birçok sürecin QS aracılığıyla düzenlenmesi bu sistemi etkin bir hedef haline getirmektedir.

İnsan sağlığı ve tarım üzerindeki etkileri oldukça dikkat çekici olduğundan son yıllarda QS ile ilgili çalışmalar artarak devam etmektedir (Sarabhai ve diğ., 2013; Chenia, 2013). Bu nedenle QS sistemleri çeşitli bakteriyel infeksiyonların tedavisi için yeni terapötik hedefler olarak ortaya çıkmaktadır (Hentzer ve diğ., 2003; Rasmussen ve Givskov, 2006).

2.4. ANTI-QS AKTİVİTE BAKIMINDAN TÜRKİYE FLORASININ ÖNEMİ

Türkiye coğrafik konumu, toprak özellikleri ve iklim koşulları bakımından yüksek çeşitlilik göstermekte ve buna bağlı olarak bitki türleri çok yakın mesafelerde dahi değişebilmektedir. Onbinüçyüzün üzerinde bitki türü ve bu türlerin yaklaşık üçbinüçyüzünün endemik oluşu Türkiye'yi önemli bir flora haline getirmektedir.

Bitkilerin tedavi edici özellikleri yerel halklar tarafından binlerce yıldır bilinmekte ve bu özelliklerinden faydalanılmaktadır. Bununla birlikte, günümüzde ki ilaçların %75'i bitkisel kökenli maddelere ait sentetik türevlerinden oluşmaktadır. Bu da bitkilerin halen çeşitli hastalıkların tedavisi için önemli kaynaklar olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında bitki türlerinin seçiminde iki özelliğe dikkate edilmiştir: (i) halk arasında tıbbi amaçlı kullanımlarının olması, veya (ii) literatürde antimikrobiyel aktivitelerinin tespit edilmiş olması. Mevsim koşulları ve vejetasyona bağlı olarak bulunamayan türlerde ise aynı cinsin farklı türleri toplanmıştır. Bu bitkilerle ilgili literatür çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Trifolium, Leguminosae familyasına ait bir cins olup Türkiye'de 95 türü vardır (Davis, 1988, p.513). Bazı türleri halk arasında idrar yolları ve soğuk algınlığı tedavisinde ayrıca balgam söktürücü, kuvvet verici, romatizma ağrılarını dindirici, kabızlık giderici, antiseptik ve yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır (Tuzlacı, 2006, p. 359-60; Baytop, 1999, p.376). *Trifolium pratense* çözünebilir fenolikler bakımından zengin bir türdür. Yapılan bir çalışmada *T. pratense*'de bulunan bir isoflavanoidin *Clostridium sticklandii* üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu gösterilmiştir (Flythe ve Kagan, 2010). *T. pannonicum* subsp. *elongatum*'un metanol ve etanol ekstraktları balık patojenleri üzerinde geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır (Türker ve diğ., 2009).

Hypericum, Guttiferae ailesinin büyük bir üyesidir ve Türkiye'de 84 türü bulunmaktadır (Davis, 1967; Davis, 1988; Güner ve diğ., 2000). Yurdumuz *Hypericum* türleri

bakımından önemli bir gen merkezidir (Tokur, 1988). Dünyada geleneksel tedavi amacıyla kullanılan bitkiler arasında en iyi bilinen cins *Hypericum* 'dur (Dall'Agnol ve diğ., 2003). Çeşitli türlerinden antibiyotik (Ishiguro ve diğ., 1986), antiviral (Jacobson ve diğ., 2001), antifungal (Dècosterd ve diğ., 1986) ve antikanser (Jayasuriya ve McChesney, 1989) bileşikler izole edilmiştir. Bu bitkiler yüksek seviyede fenolik madde ve floroglisinol biriktirme eğilimindedirler (Dall'Agnol ve diğ., 2003). Bazı *Hypericum* türlerindeki floroglisinol türevlerinin *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *Nocordia gardenen* 'e karşı antimikrobiyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Ishiguro ve diğ., 1986; Dècosterd ve diğ.,1991; Jayasuriya ve diğ., 1991; Rocha ve diğ., 1995; Trifunovic ve diğ., 1998). Benzopiran (Dècosterd ve diğ., 1986), ksanton (Ishiguro ve diğ., 1999), flavonoid (Ishiguro ve diğ., 1993) ve tanin içerikleri bakımından da bazı *Hypericum* türlerinin çeşitli bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyel etki gösterdikleri bilinmektedir. Altı *Hypericum* türünün ham metanol ekstralarının *S. aureus*, *M. luteus* ve *B. subtilis* bakterilerine karşı antimikrobiyel aktivitelerinin olduğu belirtilmiştir (Dall'Agnol ve diğ., 2003). Bu bitki iltihaplı böbrek, kulak–burun-boğaz ve diş eti hastalıkları, ülser de dahil olmak üzere mide rahatsızlıkları, karaciğer ve safra rahatsızlıkları ile özellikle yanık yaralarının (Baytop, 1999, p.166-67) tedavisinde kullanılmaktadır. *H. perforatum* ve *H. hirsutum* türlerini de içeren dokuz *Hypericum* türünün ham metanol ekstralarıyla yapılan antimikrobiyel aktivite çalışmasında tüm ekstralarda güçlü bir antimikrobiyel aktivite bulunmasına karşın *H. hirsutum* standart antibiyotiklere göre oldukça aktif bulunmuştur (Radulović ve diğ., 2007).

Linaria cinsi Scrophulariaceae ailesinin bir üyesidir. Anadolu'da 20 *Linaria* türü vardır (Davis, 1988, p.515). Halk arasında öksürük tedavisinde kullanılan *Linaria* türlerinin yaprak ve çiçekleri flavanoidler, iridoidler, alkaloidler, monoterpenler, diterpenler ve glikozidik bileşikler içerdiği bilinmektedir (Erdemoğlu ve diğ., 1998; Bianco ve diğ., 1996). *L. corifolia*'nın özellikle *S. epidermidis* ve *S. aureus* gibi Gram (+) bakterilere ve *Kluyveromyces fragilis*'e karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Gönüz ve diğ., 2005).

Compositae ailesinden olan *Centaurea* cinsinin gen merkezlerinden biri Türkiye'dir ve 178 tür sayısı (Davis, 1988, p.513) Türkiye'de üçüncü sıradadır (Ekim, 2009).

Centaurea cinsine ait birçok bitki halk arasında göz, mide, karaciğer ve böbrek hastalıkları, nefes darlığı tedavisinde ve ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır (Baytop 1999, p.316; Tuzlacı 2006, p.66-67). *Centaurea* türleri seskiterpen laktonlar, triterpenler, steroidler, hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, antosiyaninler, lignanlar, alkaloidler ve poliasetilenler gibi sekonder metabolitler içerirler. *Centaurea* türü bitkilerle yapılan birçok antimikrobiyel aktivite çalışması vardır. Türkiye’de halk arasında ülser tedavisi için kullanılan bitkiler anti-*H. plori* aktivitesi açısından test edilmiş ve *C. laurifolius*’un baskılayıcı özeliği diğer bitkilere göre belirgin bulunmuştur (Yeşilada ve diğ., 1999). *C. derderiifolia*’nın bitki, besin ve klinik orijinli patojenler ve mayalara karşı antimikrobiyel etkisinin olduğu bildirilmiştir (Güven ve diğ., 2009).

Achillea cinsi Compositae, ailesinin üyesidir. Türkiye’de 40 türü vardır (Davis, 1988, p.513). Bu cinsin çeşitli türleri yara iyileştirici, idrar artırıcı, karın ağrıları, ülser, ishal ve şişkinliğe karşı geleneksel olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999, p.316; Sezik ve Yeşilada, 1999; Sezik ve diğ., 2001). *Achillea biebersteinii* Afan ise ayrıca soğuk algınlığının ve çiçek hastalığının tedavisinde de kullanılmaktadır (Tuzlacı, 2006, p.16-17). *Achillea* türleri çoğunlukla seskiterpen lakton, flavanoid ve fenolik asit bileşikleri içerirler. Sökmen ve diğ., 2004a’ da *Achillea biebersteinii* Afan.’nın metanol ekstresinin kloroform fraksiyonunun *B. cereus*, *C. albicans* ve *Clostridium perfringens*’e karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiğini bildirmiştir. *Achillea biebersteinii* Afan’ının yer aldığı 13 *Achillea* türüyle yapılan bir diğer çalışma da ise bu türün ekstrelerinde *S. aureus*, *E.coli* ve *C. albicans*’a karşı herhangi bir antimikrobiyel aktivite saptanmamıştır. Bu farklılığın antimikrobiyel analiz, ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan mikroorganizma ırklarına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Karaalp ve diğ., 2009).

Tanacetum cinsi Compositae ailesinin üyelerinden biridir. Türkiye’de 44 türü bulunmaktadır (Davis, 1988, p.513). Bazı türleri halk arasında kuvvet verici, idrar artırıcı, gaz söktürücü, ateş düşürücü, mide ve safra kesesi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Baytop, 1999, p.317-18). *Tanaceum* türlerinin içerdikleri flavanoidler nedeniyle antienflamatuvar etki gösterdikleri birçok yayında belirtilmiştir (Abad ve diğ., 1993; Schinella ve diğ., 1998; Williams ve diğ., 1999). *Tanacetum balsamita* subsp. *balsamita*’nın uçucu yağının *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans* ve *Aspergillus niger* gibi mikroorganizmaların da aralarında olduğu onbir izolat için orta

ve yüksek derecede antimikrobiyel aktivite gösterdiği bilinmektedir (Yousefzadi ve diğ., 2009). Aynı zamanda *T. vulgare* ve *T. partheneum* türlerinin *Klebsiella pneumoniae*, *S.aureus* ve *Salmonella gallinarum* bakterilerine karşı antimikrobiyel etki gösterdiği bulunmuştur (Keleş ve diğ., 2001).

Carduus cinsi Compositae ailesinin bir üyesidir. Türkiye'deki tür sayısı 16'dır (Davis, 1988, p. 515). *Carduus* türleri halk arasında ateş düşürücü, romatizma ağrılarını giderici, idrar artırıcı, iştah açıcı ve yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999, p.299). *Carduus* türleri flavanoid (özellikle kersetin), triterpen ve lignan grubu antimikrobiyel bileşikler içerirler (Jordon-Thaden ve Louda, 2003). *Carduus pycnocephalus* L.'nin de antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (El-Lakany ve diğ., 1997).

Epilobium, Onagraceae ailesine ait bir cinistir. Türkiye'de 21 türü vardır (Davis,1988, p. 515). Flavanoid, steroid ve tanin içerikleri nedeniyle geleneksel anlamda antiseptik, yara iyileştirici, kabızlık ve mide rahatsızlıkları tedavisinde kullanılmaktadır (Battinelli ve diğ., 2001; Baytop, 1999, p.372). Bu genus içinde en iyi bilinen türler *E. angustifolium*, *E. hirsutum* ve *E. parviflorum*'dur. *E. angustifolium*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen su ekstresinin analjezik ve antienflamatuvar etkisinin olduğu bilinmektedir (Hiermann ve diğ.,1991). *E. angustifolium* 'un da aralarında bulunduğu beş *Epilobium* türünün etanolik ekstrelerinin Gram (-) ve Gram (+) bakteriler, mayalar ve fungi ile yapılan antimikrobiyel aktivite çalışmasında *E. angustifolium* ve *E. rosmarinifolium* bu mikroorganizmalara karşı en geniş spektrumlu inhibisyon etkisini göstermiştir (Battinelli ve diğ., 2001). *E. angustifolium* 'un yaprak ve çiçeklerinden elde edilen ekstrelerde MRSA gibi önemli klinik izolatlarda dahil olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyel aktivite saptanmıştır (Borchardt ve diğ., 2008; Kosalec ve diğ., 2013).

Boraginaceae ailesinin bir üyesi olan *Echium* generusu Türkiye'de 9 tür ile temsil edilmektedir (Davis, 1988, p. 517). Halk arasında balgam söktürücü ve idrar artırıcı olarak kullanılmaktadır. Bolu ilinden toplanan ve *E. vulgare*'nin de aralarında bulunduğu 16 bitki türünün ekstreleriyle yapılan çalışmada kullanılan Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı inhibisyon aktivitesinin olduğu saptanmıştır (Pehlivan-Karakaş ve diğ., 2012)

Mentha, Labiatae ailesinde yer alır ve Türkiye florasında hibrit türler hariç 8 türü bilinmektedir (Baser ve diğ., 1992; Rasooli ve Rezaei, 2002). Flavanoid içeriği bilinen *Mentha* türleri (Akroum ve diğ., 2009) halk arasında bronşit, astım, mide rahatsızlıklarının tedavisinde ve antienflamatuvar olarak kullanılmaktadır. (Moreno ve diğ., 2002; Tuzlacı, 2006, p.199-200). *Mentha longifolia* 'nın metanol ve etanol ekstreleriyle yapılan bir antimikrobiyel aktivite çalışmasında test edilen bakterilere karşı inhibisyon aktivitesi görülmekle birlikte bu aktivitenin etanol ekstresinde daha fazla olduğu belirtilmiştir (Akroum ve diğ., 2009).

Salvia, Labiatae ailesinde yer alan ve Türkiye'de 90 türü bulunan bir cinstir. Anadolu bu genusun gen merkezlerinden biridir. Diterpenler bakımından zengin olan *Salvia* türleri halk arasında bronşit, iltihaplı diş eti hastalıkları, mide rahatsızlıkları, yanık, yara ve çıban tedavisinde ve antiseptik olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999, p.142; Tuzlacı, 2006, p.308-314). Sökmen ve diğ., 2000' de Sivas'tan toplanan 33 bitkinin metanolik ekstreleriyle yapılan çalışmada *S. verticillata*'da dahil olmak üzere dokuz bitkinin ekstresinde antibakteriyel aktivite tespit edilmiştir. *S. forskahlei* köklerinden elde edilen forskalinon adlı maddenin antibakteriyel aktivitesi bildirilmiştir (Ulubelen ve diğ., 1996).

Stachys, Labiate ailesinin üyesidir. Türkiye'de 76 türü vardır (Davis, 1988, p. 513). Halk arasında larenjit, tonsilit, bronşit, astım, soğuk algınlığı, solunumla ilgili rahatsızlıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (Uysal, 2003; Johnson, 1999). *Stachys* türlerinde flavonoid, fenil etanoid, fenolik asit, iridoid, monoterpen, seskiterpen, diterpen, triterpen ve saponin bileşikleri bulunmaktadır. *S. woronowii*'nin metanol, *S. aleurites*'in etil asetat ve aseton ekstrelerinin antimikrobiyel aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir (Kürşat ve Ecevit, 2009; Güven ve diğ., 2009).

Origanum cinsi Labiatae familyasında yer alır. Türkiye'de 23 türü bulunmaktadır (Davis, 1988, p. 514). Fenolik bileşikler içeren *Origanum* türleri halk arasında da ekspektoran ve gaz giderici olarak ayrıca boğmaca, öksürük ve sindirim hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Sahin ve diğ., 2004). *O. vulgare* L. subsp. *gracile* metanol ekstresinin bazı bakterilere ve cilt mantarlarına karşı antimikrobiyel etki gösterdiği saptanmıştır (Kürşat ve Ecevit, 2009).

Thymus, Labiatae ailesine ait bir cinstir. Türkiye’de 39 tür ile temsil edilir (Öztürk ve Ercisli, 2005). *Thymus* türleri halk arasında soğuk algınlığı, grip, bronşit ve mide hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Tuzlacı, 2006, p.350-54). *T. spathulifolius* türünün metanol ekstresinin polar (su) ve non polar (kloroform) alt fraksiyonlarında orta derecede anti bakteriyel aktivite saptanmıştır (Sökmen ve diğ., 2004b) *T. eigi* türünün non-polar ve polar ekstrelerinin ise sırasıyla orta ve düşük derecelerde antimikrobiyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Tepe ve diğ., 2004). Al-Bayati, 2008’de *T. vulgaris*’in metanol ekstresinin çoğu patojene karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini ve bunun ekstre içeriğindeki fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceğini bildirmiştir. *T. fallax*’ın metanol ekstresinin peynirden izole edilen bakterilere karşı antibakteriyel aktivite potansiyelinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Öztürk ve Ercisli, 2005). *T. daenensis*’in Gram (+) bakterilerin büyümesini inhibe ettiği özellikle metisiline dirençli *S. aureusa* karşı en belirgin etkiyi gösterdiği belirtilmiştir (Mojab ve diğ., 2008).

Quercus, Fagaceae ailesinde yer alan bir cinstir ve 18 tür içermektedir (Davis, 1988, p.515). Halk arasında yara tedavisinde ve antiseptik olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999, p. 294-95; Tuzlacı, 2006, p. 275-77). *Quercus* türlerinin flavanoid ve tanin (Zhentian ve diğ., 1999; Meng ve diğ., 2001; Hideyuki ve diğ., 2002) gibi fenolik bileşikler içerdiği bilinmektedir. *Q. brantii*’nin meyvelerinin etanol ve metanolik ekstrelerinin kullanılan 8 bakteriye karşı farklı derecelerde inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Safary ve diğ., 2009). *Q. ilex*’in ağaç kabuklarının farklı ekstrelerinin antibakteriyel etkisinin olduğu (Berahou ve diğ., 2007) ve yaprak metanol ekstresinin 35 bakteri ırkına karşı inhibisyon etki gösterdiğini bildiren çalışmalar yapılmıştır (Güllüce ve diğ., 2004). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise *Q. robur* L.’nin dört fraksiyonunun antimikrobiyel ve antioksidan aktiviteleri gösterilmiştir (Uddin ve Rauf, 2012).

2.5. ANTI-QS AKTİVİTENİN SAPTANMASI İÇİN KULLANILAN BAKTERİ İRKLARI

Anti-QS aktivitenin saptanması için çeşitli biyomonitör bakteri ırkları kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde en yaygın olarak kullanılan *Chromobacterium violaceum* türüdür (McLean ve diğ., 2004). Bu bakteri *luxI* homologu olan *cviI* geni aracılığı ile mor renkli antibiyotik, viyolasini üretir. AHL üretimine bağlı olarak sentezlenen bu antibiyotik

görsel olarak izlenebilir ve kantitatif olarak ölçülebilir. Aynı amaçla *Chromobacterium*'un CV026 adı verilen mutant ırkı da kullanılabilir. Bu ırkda yönlendirilmiş mutasyon (Tn5 mutasyonu) ile sinyal üretimi inaktif hale getirilmiştir ve bu nedenle antibiyotik üretimi gerçekleşemez. Diğer yandan, uygun sinyal molekülleri (C4-HSL ya da C6-HSL) dışarıdan verilerek viyolasin üretilebilir ve anti-QS belirleme çalışmalarında kullanılabilir.

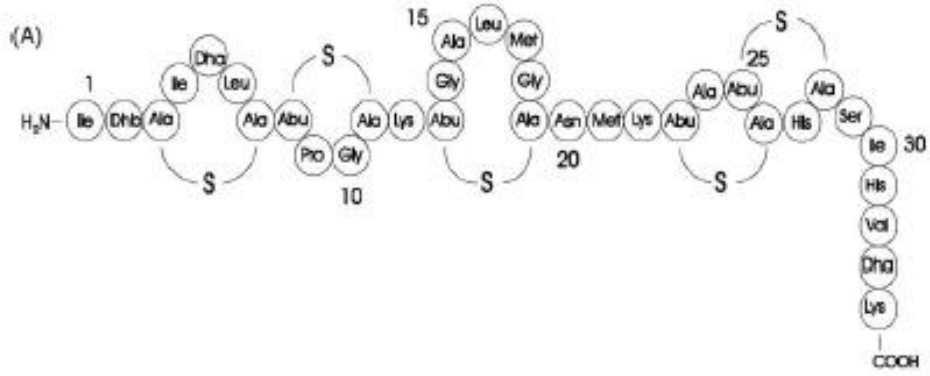
Anti-QS aktiviteyi belirlemek için geliştirilen diğer biyomonitör ırklardan *Agrobacterium tumefaciens*'un NTL4 (pZLR4) (Shaw ve diğ., 1997) ve QSI-1 (Bjarnsholt ve diğ., 2010) ırkları farklı sinyal moleküllerinin inhibisyonunu göstermek amacıyla kullanılırken, QS aracılığıyla olduğu bilinen farklı fenotiplerden yararlanılarak geliştirilmiş diğer biyomonitör ırklarda anti-QS aktivitenin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Çepni ve Gürel, 2011).

2.6. LACTOCOCCUS LACTIS'DE NİSİN ÜRETİMİ VE QS İLE İLİŞKİSİ

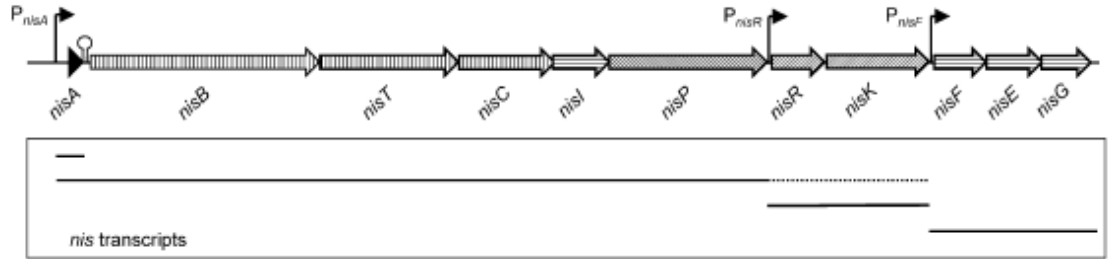
Gram (+) bakteriler ürettikleri antimikrobiyel peptidler (AMP) ile diğer mikroorganizmaların neden olduğu olumsuz koşullara karşı üstünlük sağlarlar. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ısı-stabil AMP'ler tipI ve tipII olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Tip I AMP'ler lantibiyotik olarak da adlandırılırlar ve post- translasyonel modifikasyonlara sahiptirler. Bazı Gram (+) bakterilerde AMP üretimi hücre yoğunluğuna bağlı olarak yapılır (Kleerebezem, 2004). AMP üretimi genel olarak logaritmik büyüme fazının ortalarında başlar ve durağan fazın başlangıcında en yüksek seviyede bulunur. Böyle bir düzenlenme için iletişimi sağlayacak peptid yapıda moleküllere (peptid feromon) gereksinim vardır. Büyüme esnasında çevrede biriken peptid feromonlar belli bir konsantrasyona ulaştığında yüksek seviyede AMP üretimi tetiklenir. Bu tetiklenme peptid feromonun histidin kinaz reseptörü ile etkileşimi aracılığıyla gerçekleşir. Bu da transmembran sinyal transdüksiyonu ile sonuçlanan AMP üretiminin aktivasyonuna yol açar. AMP üretim sistemlerindeki bu düzenlenme mekanizması Gram (+) bakterilerde bulunan peptid sinyal aracılı QS sistemleri arasında yer alır (Kleerebezem ve diğ., 1997; Kleerebezem ve diğ., 1999; Kleerebezem ve Quadri, 2001; Eijsink ve diğ., 2002; Kleerebezem, 2004).

TipI AMP sınıfında yer alan nisin bazı *Lactococcus lactis* türleri tarafından üretilen 34 aa'lık küçük bir polipeptiddir. Bu amino asitlerden 8 tanesi kükürt içerir ve en önemlileri lantiyonin ve 3-metil lantiyonin'dir. Lantibiyotik teriminin nedeni de içerdiği bu amino asitlerdir. Bunlara ek olarak dehidroalanin ve dehidrobutirin gibi diğer amino asit kalıntılarını da içermektedir. Nisin A (Şekil 2.9) (Gross ve Morell, 1971), nisin Z (Mulders ve diğ.,1991), nisin Q (Zendo ve diğ., 2003) ve nisin U (Wirawan ve diğ., 2006) olmak üzere dört doğal nisin varyantı bilinmektedir.

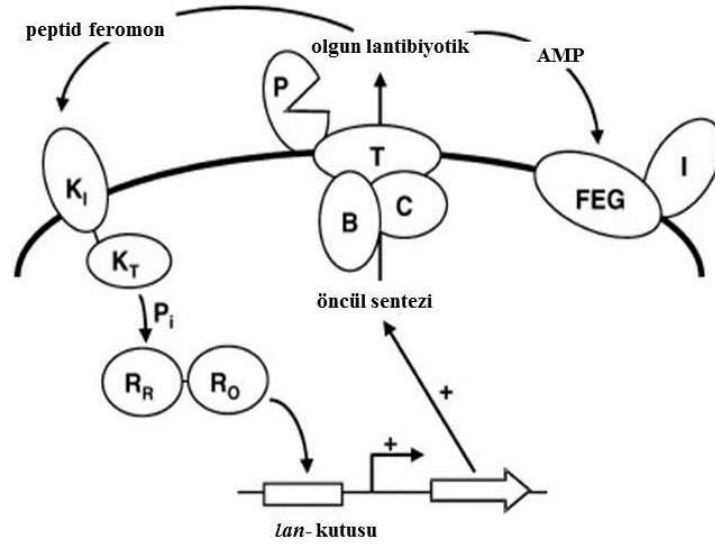
Nisin sentezinden sorumlu gen kümesi nisin öncüllerini kodlayan yapısal genin (*nisA*) yanısıra post- translasyonel modifikasyonlar (*nisB* ve *nisC*), modifiye edilmiş peptidlerin salgılanması (*nisT*) ve *L. lactis*'in nisin bağışıklığını sağlamak için gerekli proteinleri kodlayan genleri (*nisIFEG*) de içermektedir (Şekil 2.10). *NisP* ise öncül nisin molekülünün olgun nisin molekülüne dönüşümünü sağlayan bir ekstraselüler proteaz kodlar. İki bileşenli sistemi kodlayan nisin gen kümesi ise nisin geninin transkripsiyonel düzenlenmesinde rol alan bir sensör kinaz (*nisK*) (Engelke ve diğ., 1994) ve bir yanıt düzenleyici proteini (*nisR*) kodlayan genlerden (Klein ve diğ., 1993) oluşur. Bu genlerin (*nisR* ve *nisK*) ürünleri nisinin düzenlenmesi için esastır (van der Meer ve diğ., 1993; Klein ve diğ., 1993). Nisin gen kümesinde üç tane promotör vardır. *NisA* ve *nisF* promotörleri ile sürdürülen transkripsiyonlar nisin aracılığıyla tetiklenirken (*nisRK* bağımlı sinyal iletimi) *nisR* promotörü nisin-bağımsız olarak çalışmaktadır (Kuipers ve diğ., 1995; de Ruyter ve diğ., 1996; Kleerebezem ve diğ., 1999). Buradan da anlaşılacağı gibi nisin biyosentezinin düzenlenmesinde otodüzenleyici bir zincirin varlığı sözkonusudur (Şekil 2.11) (Klerebezem, 2004). Nisin kendi aktivitesinin yanısıra QS benzeri bir şekilde sinyal iletim sistemini tetikleyerek kendi biyosentezini uyaran bir sinyal peptid olarak da rol oynar (Dunny ve Leonard, 1997; Kleerebezem ve diğ.,1997) .



Şekil 2.9: Nisin A peptidinin yapısı. Dha: dehidroalanin, Dhb: dehidrobutirine, Abu: amino butirik asit, Abu-S-Ala: β -metil lantiyonin, Ala-S-Ala: lantiyonin, S: tiyoeter köprülerini göstermektedir (Kleerebezem, 2004'den alınmıştır).



Şekil 2.10: Nisin genine ait operonunun şematik gösterimi (Kleerebezem, 2004'den alınmıştır).



Şekil 2.11: Nisin biyosentezi ve düzenlenmesi modeli. B,C ve T faktörlerinden oluşan zara sabitlenmiş multimerik kompleks (*nisBCT* genleri tarafından kodlanır) öncül nisin'in modifikasyonu ve taşınması için gereklidir. Nisinin modifikasyonu nisP tarafından kodlanan özel bir proteaz (P) tarafından gerçekleştirilir. AMP olarak rol oynayan bu peptidleri üreten hücreler I ve FEG faktörlerinden (*nisIFEG* tarafından kodlanır) oluşan bir bağışıklık sistemi aracılığıyla korunurlar. Bu modelde, nisin'in ikinci bir rolü peptid feromon (sinyal) olarak sensör kinaz (K_I) üzerinde karşılık gelen domeni algılayarak sensör kinaz üzerindeki fosfat verici alandan (K_T) yanıt düzenleyici üzerindeki (R_R) alıcı domene fosfatın transferini aktive eder. Aktifleşen cevap düzenleyici protein (R_O) biyosentetik gen kümesinin içinde yer alan promotörlerdeki özel hedef kutularına (*lan-kutusu*) bağlanır ve transkripsiyon aktivasyonu ile nisin üretimi artar (Kleerebezem, 2004'den alınmıştır).

Bu tez çalışmasında ekstrelerdeki olası anti-QS aktivitenin Gram (-) bir biyomonitör sistemde araştırılmasının yanı sıra Gram (+) bir biyomonitör olarak *Lactococcus lactis*'in kullanımı araştırılmıştır. Bu amaçla *L. lactis*'de nisin sentezinin baskılanmasına dayalı bir biyodifüzyon belirlemesi (Wolf ve diğ., 1996) kullanılmıştır. Bu belirlemede ekstreler veya saf maddeler bakteri kültürüne eklenerek, nisin üretiminin baskılanması indikatör bir ırk aracılığıyla gösterilmiştir ve sonuçlar ters-transkriptaz (RT) -PCR analizi ile desteklenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALI

Bu çalışmada anti-QS bileşiklerin araştırılması için kullanılacak bitki materyali 19-24.07.2009 tarihleri arasında Doğu Karadeniz Bölgesi, Rize ilinden, 7. 10. 2009 tarihinde İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi Atatürk Arboretumu'ndan ve 10.10.2009 tarihinde İ.Ü. Fen Fakültesi, Alfred Heilbornn Botanik Bahçesi'nden tarafımdan toplanmıştır (Tablo 3.1). Karadeniz bölgesinden toplanan bitkilerin tür tayini Flora of Turkey and The Aegean Islands (Davis, 1965-88)'e göre İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı personeli Dr. Mehmet Bona tarafından yapılmış ve herbaryum numaraları verilmiştir. İ.Ü. Atatürk Arboretumu ve Botanik Bahçesinden alınan bitkilerin künyeleri bilindiği için ayrıca tür tayini yapılmamıştır.

Tablo 3.1: Anti-QS aktivite çalışmaları için kullanılan bitkiler ve kullanılan kısımları.

ISTF Herbaryum No.	Takson	Familya	Türkçe Adı	Kullanılan Kısımlar
40191	<i>Trifolium aureum</i> Poll.	Leguminosae	Altuni üçgül	Toprak üstü
40192	<i>Thymus praecox</i> Opiz subsp. <i>caucasicus</i> (Ronniger) J alas var. <i>groshemii</i> (Ronniger) J alas	Lamiaceae	Dağ kekiği	Toprak üstü
40193	<i>Centaurea nigrifimbria</i> (C. Koch) Sosn.	Asteraceae	Peygamber çiçeği	Toprak üstü
40194	<i>Hypericum hirsutum</i> L.	Guttiferae	Tüylü kantaron	Toprak üstü
40195	<i>Hypericum bupleuroides</i> Gris.	Guttiferae	Tavuk yumurtlamaz	Toprak üstü
40196	<i>Linaria genistifolia</i> subsp. <i>genistifolia</i> (L.) Miller	Scrophulariaceae	Nevruz otu	Toprak üstü
40197	<i>Carduus adpresus</i> C.A. Meyer	Asteraceae	Tomara	Toprak üstü
40198	<i>Salvia verticillata</i> subsp. <i>verticillata</i> L.	Lamiaceae	Dadırak	Toprak üstü
40199	<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>gracile</i> (C. Koch.) Ietswaart	Lamiaceae	Kuş zemulu	Toprak üstü

40201	<i>Stachys iberica</i> subsp. <i>iberica</i> var. <i>iberica</i> Bieb.	Lamiaceae	Tokdeliçay	Toprak üstü
40202	<i>Trifolium pratense</i> var. <i>pratense</i> L.	Leguminosae	Çayır üçgülü	Toprak üstü
40203	<i>Epilobium angustifolium</i> L.	Onagraceae	Yakıotu	Toprak üstü
40205	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Guttiferae	Kantaron	Toprak üstü
40206	<i>Hypericum bithynicum</i> Boiss.	Guttiferae	Uludağ koyunkıranı	Toprak üstü
40208	<i>Achillea biebersteinii</i> Afan.	Asteraceae	Civanperçemi	Toprak üstü
40209	<i>Echium vulgare</i> L.	Boraginacea	Engerek otu	Toprak üstü
40210	<i>Thymus pseudopulegioides</i> Klokov & Des.-Shost.	Lamiaceae	Kekik	Toprak üstü
40211	<i>Tanacetum balsamita</i> L. subsp. <i>balsamitoides</i> (Schultz Bip.) Grierson	Asteraceae	Gümüşdüğme	Toprak üstü
40212	<i>Mentha longifolia</i> subsp. <i>longifolia</i> (L.) Hudson	Lamiaceae	Pünk	Toprak üstü
40213	<i>Stachys macrantha</i> (C. Koch) Stearn.	Lamiaceae	Koca soğulcan	Toprak üstü
40214	<i>Salvia forskahlei</i> L.	Lamiaceae	Dolma yaprağı	Toprak üstü
40215	<i>Hypericum orientale</i> L.	Guttiferae	Sandık çiçeği	Toprak üstü
40030	<i>Centaurea lycopifolia</i> Boiss. & Kotschy	Asteraceae	Cerrahotu	Toprak üstü
	<i>Quercus petraea</i> (Mattuschka) Lieb.	Fagaceae	Sapsız meşe	Yaprak
	<i>Quercus frainetto</i> Ten.	Fagaceae	Macar meşesi	Yaprak
	<i>Quercus robur</i> L.	Fagaceae	Saplı meşe	Yaprak

3.2. BİTKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

Bitki ekstraları maserasyon yöntemiyle elde edildi. Bunun için bitkilerin kullanılacak kısımları (Tablo 3.1) öğütüldü. Daha sonra ayırma hunisinin içine 4 gr. bitki tozu ve 40 ml %75 metanol (MeOH) eklenerek 46 sa. süre ile oda sıcaklığında bırakıldı. Bu aşama iki kez tekrarlandıktan sonra tüm ekstre cam balon içerisinde toplanarak evaporatörde

45⁰C’de 2.5 sa. süreyle uçuruldu. Daha sonra kalan sulu kısım -20⁰C’de dondurulduktan sonra ekstreler 8 sa. süreyle liyofilizatörde (Christ Alpha 1-4 LD plus) kurutuldu.

Bu yöntemle göre elde edilen tüm bitki ekstreleri %75 metanol ile sulandırılarak 100 mg/ml konsantrasyonda stoklar hazırlandı. Stoklar daha sonra 0.45 µm’lik selüloz asetat filtre ile steril edildi.

3.2.1. Biyoaktivite ile Yönlendirilen Fraksiyonlandırma

Anti-QS aktivitenin gözlendiği bitki türleri için biyoaktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama yöntemi kullanılarak yeniden ekstreler hazırlandı. Bitkilerin kullanılan kısımları öğütüldükten sonra 12 gr. tartılarak ayırma hunisine yerleştirildi. Üzerlerine 120 ml %75 MeOH eklendi ve 46 sa. süreyle çeker ocak içerisinde bekletildi. Bu aşama iki kez tekrarlandı. Daha sonra bitkilerden iki tekrarlı olarak elde edilen %75 MeOH ekstreleri ayırma hunisinde toplanarak üzerlerine 50 ml distile su eklendi ve iyice karıştırıldı. Bu aşamadan sonra çözücü polaritesine göre non-polar’dan polara doğru farklı çözücüler kullanılarak fraksiyonlama yapıldı. Buna göre sırasıyla petrol eteri (PE), diklormetan (CH₂Cl₂), etil asetat (EtOAc) ve n-butanol fraksiyonları elde edildi.

Petrol eteri ve diklormetan fraksiyonlarında çözücüler evaporasyon ile 30⁰C’de uçurulurken, etilasetat ve n-butanol fraksiyonlarında evaporatörde 40⁰C’de uçurulduktan sonra kalan kısım -20⁰C’de donduruldu ve liyofilizasyon işlemi ile tüm çözücü uçuruldu.

Bu yöntem ile elde edilen fraksiyonlar yeniden çözündürülerek 20 mg/ml stoklar halinde hazırlandı (Tablo 3.2). Hazırlanan stoklar 0.45 µm’lik membran filtre ile steril edildi ve kullanılmak üzere -20⁰C’de saklandı.

Tablo 3.2: Hazırlanan fraksiyonların stok konsantrasyonları ve kullanılan çözücüler.

Fraksiyon	Kullanılan Çözücü	Stok konsantrasyonu
Petrol eteri	Petrol eteri	20 mg/ml
Diklormetan	%4 DMSO	20 mg/ml
Etil asetat	%75 MeOH	20 mg/ml
n-Butanol	%4 DMSO	20 mg/ml

3.3. ANALİZLER İÇİN KULLANILAN BAKTERİ İRKLARI VE ÜRETİM KOŞULLARI

Anti-QS aktivitenin araştırılması için kullanılan bakteri ırkları ve üretim koşulları Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan bakteriler ve üretim koşulları

Bakteri Irkı	Özelliği	Besiyeri Adı	Besiyeri İçeriği (1L)	Ortam Koşulları
<i>Chromobacterium violaceum</i> 12472	Yabani ırk	Luria Bertani (LB Besiyeri)	10 gr Tripton	30 ⁰ C, 180 rpm
<i>C. violaceum</i> 026	Mutant ırk		5 gr NaCl	30 ⁰ C, 180 rpm
<i>Micrococcus luteus</i> RSKK 1123	İndikatör ırk		5 gr Maya özütü	30 ⁰ C, 160 rpm
<i>Lactococcus lactis</i> ATTC 11454	Nisin üreten ırk	GM17	42,25 gr M17 5 gr D-glukoz	30 ⁰ C, 160 rpm

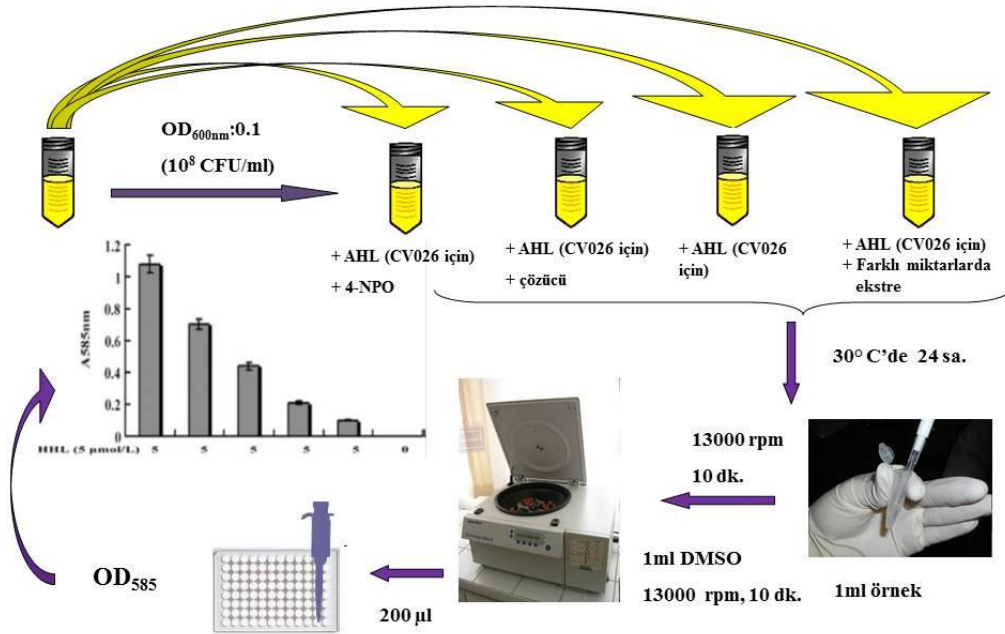
3.4. ANTİ-QS AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

3.4.1. *Chromobacterium violaceum* CV12472 ve CV026 ile Sıvı İnkübasyon Yöntemi

Choo ve diğ., 2006'dan değiştirilerek optimize edilen yönteme göre toplam hacim 4ml/tüp olacak şekilde final konsantrasyonları yaklaşık 10⁸ CFU/ml, 18 sa.'lik bakteri kültürü (CV12472 veya CV026) ve 7.5 µg/ml, C6-HSL sinyal molekülü (sadece CV026 için) LB besiyeri ile karıştırıldı. Ekstre miktarları, ham ekstreler için 250 µg, 500 µg, 1000 µg ve 2000 µg/tüp, fraksiyonlar için 50 µg, 250 µg, 500 µg ve 1000 µg/tüp olarak kullanıldı. Hazırlanan tüpler 30 °C'de 24 sa. üremeye bırakıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen, %75 MeOH (20 µl/tüp) ve anti-QS etkisi bilinen 4-nitropridin *N*-oksit (4-NPO) (300 µg/tüp) içeren sıvı kültürler kullanıldı. Daha sonra tüm kültürlerden viyolasin izolasyonu yapılarak spektrofotometrik ölçümler ile inhibisyon oranları belirlendi (Şekil 3.1).

3.4.1.1. Viyolasin Üretiminin Kantitatif Analizi

Deney ve kontrol gruplarına ait tüplerden 1 ml sıvı kültür alınarak 13.000 rpm’de 10 dk santrifüjleme işlemi yapıldı. Daha sonra üst sıvı uzaklaştırılarak 1ml DMSO eklendi. Tüpler kısa süreli olarak vorteks ve ultrasonik su banyosunda tutularak viyolasinin iyice çözünmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra yeniden 13.000 rpm’de 10 dk santrifüjleme yapıldı. Viyolasin içeren üst sıvıdan 200 µl alınarak mikropılaka okuyucu ile OD₅₈₅ değerleri okundu (Blosser ve Gray, 2000).



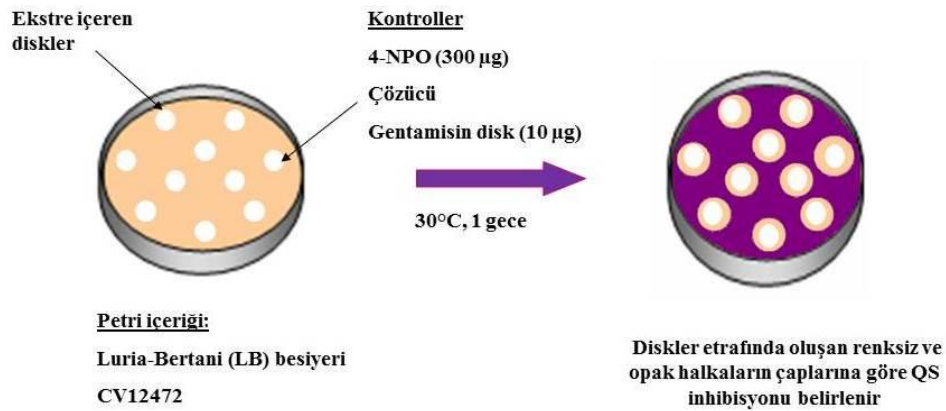
Şekil 3.1: Sıvı inkübasyon yönteminin şematik gösterimi.

3.4.2. *Chromobacterium violaceum* CV12472 ile Disk Difüzyon Yöntemi

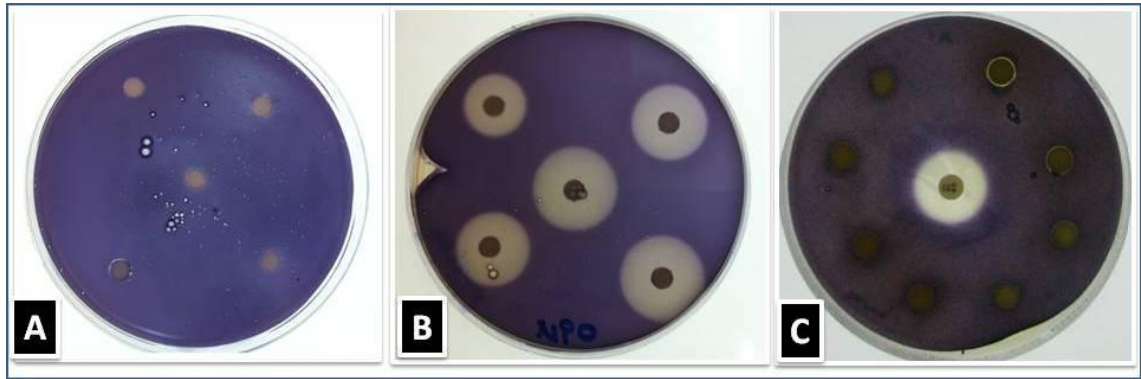
5 ml LB besiyerine (% 0.5 NaCl ve %1 agar) 50 µl 18 sa.'lik *Chromobacterium violaceum* 12472 sıvı kültürü eklendi (Bosgelmez-Tınaz ve diğ., 2007). Bu besiyeri-kültür karışımları daha önce hazırlanarak katılaştırılmış LB besiyeri (% 1.2 agar) üzerine döküldü ve katılaşması beklendi. Farklı konsantrasyondaki ekstre serilerinin her birinden 20 µl steril disklerle yüklendi. Kullanılan çözücünün olası toksik etkisini ortadan kaldırmak amacıyla bir süre beklendi ve hazırlanan bu diskler kuruyan petrilerin üzerine yerleştirildi. Petriler 30⁰C'de 1 gece üremeye bırakıldı. Ertesi gün disklerin

çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının varlığı ve ne tipte olduğu gözlemlendi (Şekil 3.2). AntiQS etkinin olmadığı durumda zon oluşumu görülmezken (Şekil 3.3A), anti-QS etkinin varlığında renksiz opak yapıda zonlar oluşmaktadır (Şekil 3.3B). Antibakteriyel etkinin olduğu durumlarda ise disk etrafında oluşan zonlar şeffaf yapıdadır (Şekil 3.3C).

Çalışmada ayrıca antibakteriyel etkisi olan gentamisin (10 µg), anti-QS etkisi bilinen 4-NPO (300 µg) ve çözücü (%75 MeOH) yüklenmiş disklerde kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 3.2: Disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi.



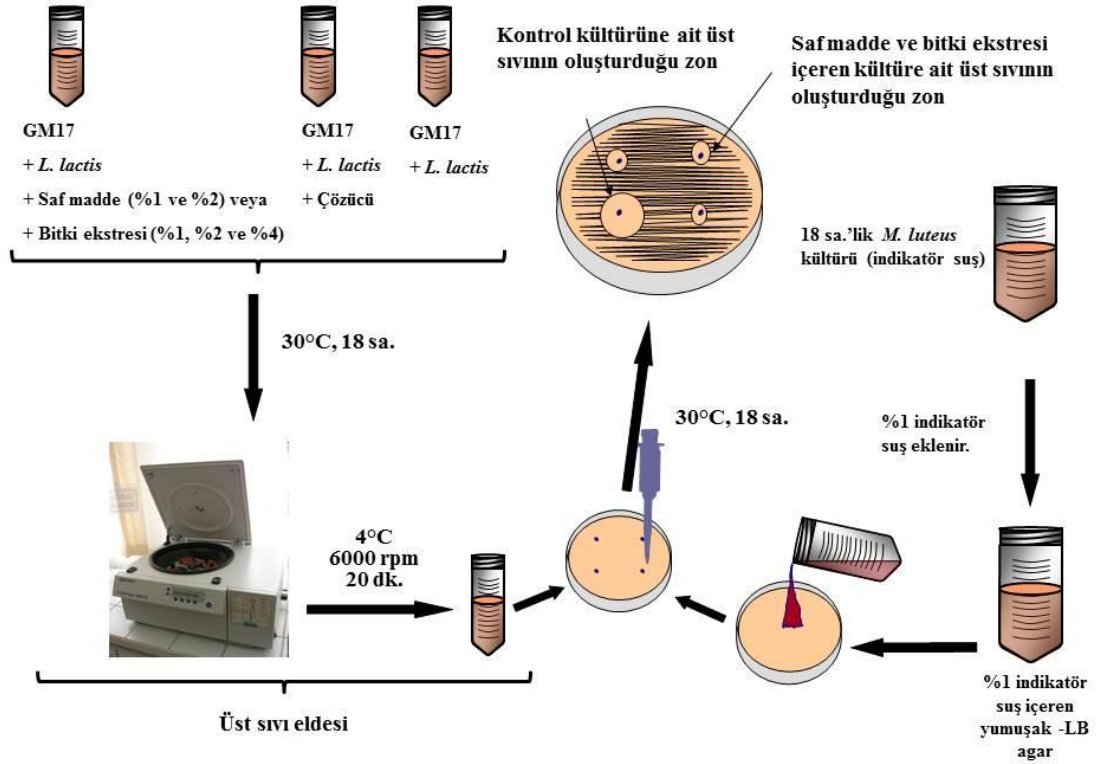
Şekil 3.3: *Chromobacterium violaceum* (CV12472)'un anti-QS belirlemede biyomonitör olarak kullanımı. (A) Anti-QS aktivitenin olmadığı durumda *C. violaceum* üretilmiş petride ekstrelerin yüklendiği disklerin çevresinde viyolasin üretiminden kaynaklanan mor renklenme, (B) 4-NPO (4- nitropiridin oksit)'in farklı konsantrasyonlarının uygulandığı disklerin çevresinde anti-QS aktivite sonucu oluşan opak zonlar ve (C) Gentamisin uygulaması sonucu disk çevresinde oluşan berrak zonlar (anti-bakteriyel etki) (Çepni ve Gürel, 2011'den alınmıştır).

3.5. AKTİF FRAKSİYONLARDA BAKTERİ ÜREMESİ VE VİYOLASİN ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

Seçilen aktif fraksiyonunun üreme durumu ve viyolasin üretimi üzerindeki etkisini gözlemlemek için 24 sa. boyunca aralıklarla OD₆₀₀ ve OD₅₈₅ değerleri ölçüldü. 24 sa.'lik ölçüm için iki başlangıçlı CV12472 bakteri kültürü kullanıldı. Bakteri kültürleri 18 sa.'lik CV12472 sıvı kültürlerinden OD₆₀₀ 0.1 (yaklaşık 10⁸ CFU/ml) olacak şekilde toplamda 8 ml hacimde hazırlandı. Bu bakteri kültürüne daha önce test edilen oranlarda bitki ekstraları eklendi ve kontrollerle birlikte 30°C'de 24 sa. üremeye bırakıldı. Ölçümler iki saat aralıklarla yapıldı.

3.6. NİSİN ÜRETİMİNE BAĞLI BİYODİFÜZYON BELİRLEMESİ

Wolf ve diğ., 1996'dan değiştirilen yöntemle göre, ilk olarak 3 ml GM17 besiyerine 100 µl *Lactococcus lactis* ekimi yapılarak, 30°C'de 18 sa. üretildi. Bu kültürden aynı şekilde başlatılan sıvı kültürler 0. sa.'te %1 ve %2 (v/v) oranında saf maddeler ve %1, %2 ve %4 oranlarında bitki ekstraları (Tablo 3.4) eklendi. Bu kültürler 30°C'de 18 sa. üretildi. Bu süre sonunda kültür tüpleri 4°C'de 6.000 rpm'de 20 dk. santrifüj edilerek bir üst sıvı elde edildi. Daha sonra 30°C'de 18 sa. boyunca üretilmiş indikatör ırk olan *Micrococcus luteus* kültürü yumuşak-LB agar (%0.75 agar) ile karıştırılarak petrilere döküldü ve katılaşması beklendi. Nisin sentezindeki değişimi gözlemlemek için indikatör ırkı içeren petrilere üst sıvıdan 10 µl damlatılarak 30°C'de 18 sa. üremeye bırakıldı. Bu süre sonunda petri üzerinde oluşan zon çapları gözlemlendi ve ölçüldü. Biyodifüzyon belirlenmesine göre, bu zonların büyümesi nisin sentezindeki artışı, küçülmesi ise nisin sentezindeki azalmayı göstermektedir. Kontrol olarak çözücü içeren ve sadece *L. lactis* içeren sıvı kültürler kullanıldı (Şekil 3.4). Ayrıca saf maddelerin bakteri üremesi üzerinde bir etkisinin olup olmadığını kontrol etmek amacıyla 18. sa.'te *L. lactis* sıvı kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri alındı.



Şekil 3.4: Nisin üretimine bağlı biyodifüzyon belirlemesinin şematik gösterimi.

Tablo 3.4: Nisin üretiminin inhibisyonuna dayalı anti-QS aktivite analizinde kullanılan saf maddeler ve bitki ekstraktları.

Saf maddeler ve Ekstreler	Stok konsantrasyonu	Çözücü	Final Konsantrasyonu/ Miktarlar (µg)		
			%1	%2	%4
Rosmarinik asit	6 mg/ml	%75MeOH	180 µg	360 µg	-
Ferulik asit	6 mg/ml	%75MeOH	180 µg	360 µg	-
Klorojenik asit	4 mg/ml	%75MeOH	120 µg	240 µg	-
Kafeik asit	4 mg/ml	%75MeOH	120 µg	240 µg	-
<i>Q. robur</i> L. (Diklormetan)	20 mg/ml	%4 DMSO	600 µg	1200 µg	2400 µg
<i>Q. frainetto</i> L. (Diklormetan)	20 mg/ml	%4 DMSO	600 µg	1200 µg	2400 µg

3.6.1. Nisin Üretimine Bağlı İnhibisyon Bölgelerinin Gözlemlendiği Kültürlerde Nisin Anlatım Düzeyindeki Değişikliklerin Kontrolü İçin İnhibisyon Zonlarının Belirgin Olduğu Konsantrasyonlar Seçilerek “revers transkriptaz” (RT)-PCR Yapıldı.

Nisin üretimine bağlı inhibisyon bölgelerinin gözlemlendiği kültürlerde nisin anlatım düzeyindeki değişikliklerin kontrolü için inhibisyon zonlarının belirgin olduğu konsantrasyonlar seçilerek “revers transkriptaz” (RT)-PCR yapıldı. Nisin inhibisyonuna neden olduğu düşünülen saf madde (%2) ve bitki ekstraktları (%4), kontrol olarak %75 MeOH (%2), %4 DMSO (%2) içeren kültürler ile *L. lactis* kültürlerinden 10. sa. ‘te “Quick- RNA™ MiniPrep” (Zymo Research, CA, USA) kit protokolüne göre total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA’ların miktarları ve saflıkları NanoDrop2000 (Thermo Scientific, USA) ile ölçüldü.

3.6.1.1. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için iki aşamalı ThermoScript RT-PCR Kiti (Invitrogen, Life Technologies, USA) kullanıldı. Buna göre öncelikle RNA stok konsantrasyonları 57 ng/μl olarak ayarlandı. Primer olarak random heksamer kullanıldı. Tablo 3.5’ deki bileşenler her bir örnek için ayrı ayrı olacak şekilde PCR tüpü içerisinde hazırlandıktan sonra 65 °C’de 5 dk denatürasyon yapıldı. Daha sonra tüpler buza alındı.

Tablo 3.5: cDNA sentezi için kullanılan primer ve RNA karışımı

Bileşen	Miktar/reaksiyon
Primer (50 ng/μl)	1 μl
RNA (57 ng/μl)	9 μl
10mM dNTP Mix	2 μl

Ayrı bir tüp içinde cDNA sentezi için gerekli diğer bileşenler Tablo 3.6’daki gibi hazırlandı ve her tüpe 8 μl cDNA sentez karışımı eklendi. Sentez için 25°C’de 10 dk. ön ısıtma, bunu takiben 50°C’de 50 dk. sentez yapıldı. Daha sonra reaksiyonu sonlandırmak için 85°C’de 5 dk. bekletildi. cDNA’lar -20°C’de saklandı.

Tablo 3.6: cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.

Bileşen	Miktar/reaksiyon
5X cDNA sentez tamponu	4 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
DEPC'li su	1 µl
ThermoScript RT (15 U/µl)	1 µl

3.6.1.2. RT-PCR Koşulları

PCR bileşenleri Tablo 3.7' ye göre hazırlandı. PCR koşulları 95⁰C'de 2 dk. ilk denatürasyon, 95⁰C'de 1 dk., 52⁰C'de 1 dk. ve 72⁰C'de 1 dk. toplam 25 döngü, 72⁰C'de 10 dk. son uzatma olacak şekilde ayarlandı. RT-PCR için *nisa* genine özgü 321 bp boyutunda bir bölgeyi çoğaltan SYRTNISAf (5'-CGAGCATAATAAACGGC-3'), SYRTNISAr (5'-GGATAGTATCCATGTCTGAAC-3') primerleri ile kontrol olarak bakterilerde 16S rRNA genine özgü 1.5 kb'lik bir bölgeyi çoğaltan 8bF (5'-ACTGGGATCCACAGGAGTGCAAACGACGA-3') ve 1512R (5'-CTGAAGCTTACGGYTAGCTTGTTACGACTT-3') evrensel primerleri kullanıldı.

Tablo 3.7: RT-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar/Reaksiyon
cDNA kalıbı	1 µl
P1 (10 pmol/µl)	0.5 µl
P2 (10 pmol/µl)	0.5 µl
10 mM dNTP	0.5 µl
50 mM MgCl ₂	0.75 µl
10X Platinum Taq Tamponu	2.5 µl
Platinum Taq polimeraz (1 U/µl)	0.5 µl
Nukleaz içermeyen su	18.75 µl

3.7. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.7.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olarak silika jel 60 F254 (0,25 mm, merck) alüminyum plakalar kullanıldı. Örnekler MeOH ile çözündürülerek 10 mg/ml konsantrasyonda stoklar hazırlandı. Örnek yüklemesi (750 µg) yapılan silika jel plakalar daha sonra n-butanol/asetik asit/su (20:3:2, v/v/v)'den oluşan hareketli fazda yürütüldü (Khurram, 2010). Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra plakalar çeker ocak altında kurumaya bırakıldı. Kuruyan plakalar UV 254 ve 365 nm dalga boyunda incelenerek gözlenen bantlar işaretlendi. Daha sonra plakalara vanilin/ sülfirik asit belirteci [vanilin (3 g); EtOH (50 ml); sülfirik asit (5 ml)] püskürtüldü ve plakalar 100°C'de 15 dk. yakılarak bantların belirginleşmesi sağlandı. İTK için referans madde olarak kersetin, pirogallol, ferulik asit, gentisik asit, klorojenik asit, kafeik asit, salisilik asit, askorbik asit ve gallik asit (100 µg) kullanıldı. Aktif bantların ve referans maddelerin Rf değerleri hesaplandı.

3.7.2. Biyootografik İTK

Aktif bulunan fraksiyonlarda etkili içeriğin belirlenebilmesi için Zhou ve diğ., 2013'den değiştirilerek kullanılan biyootografik İTK yöntemi kullanıldı. Bunun için 3.7.1'de anlatılan şekilde silika jel plakalar hazırlandı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra plakalar çeker ocak altında 5 gün boyunca kurumaya bırakıldı. Aynı örnek için iki plaka yürütüldü. Bunlardan biri biyootografi için kullanılırken diğeri referans plaka olarak kullanıldı. Kuruyan plakalar UV 254 ve 365 nm dalga boyunda incelenerek gözlenen bantlar işaretlendi. Biyootografi için 18 sa.'lik CV12472 sıvı bakteri kültürü OD₆₀₀ 0.1 (yaklaşık 10⁸ CFU/ml) olacak şekilde yumuşak agar-LB besiyeri (%1 agar) ile karıştırıldı. Bu besiyeri bakteri karışımı petriye dökülmeden önce İTK plakalarından biri steril petri içerisine yerleştirilerek yaklaşık 10 dk. steril kabin içinde UV altında bırakıldı. Daha sonra üzerine besiyeri dökülerek 30°C'de 24 sa üremeye bırakıldı. Bu süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan zon bölgesi belirlenerek referans İTK plakası ile karşılaştırıldı. Örneklerin yanısıra aynı işlem referans madde yüklenen plakalar için de yapıldı. Referans plakalar üzerindeki bantlar İTK belirteci (vanilin/sülfirik asit belirteci) püskürtülerek belirginleştirildi.

3.7.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Aktif fraksiyonlarda olası etken bileşiklerin analizi, PDA dedektörlü bir Shimadzu Prominence UFLC (Shimadzu Scientific Instrument, USA) HPLC sistemi ile gerçekleştirildi. Bileşiklerin ayrımı için inertsil ODS-3 (5 μ M, 250 mm x 4.6 mm ID) (GL Sciences, Inc, USA) kolon ve hareketli faz olarak % 0.1'lik asetik asit/ultra saf su (solvent A) ile % 0.1 'lik glasiyal asetik asit/ asetronitril (ACN) (solvent B) kullanıldı. Gradient program Kim ve diğ., 2012'den değiştirilerek, 0 ve 2 dk., %90A:%10 B; 2 ve 27 dk., %70 A: %30 B; 27 ve 50 dk., %10 A: %90 B; 51 ve 60 dk., % 90A: %10B olarak ayarlandı. Toplam yürütme süresi 60 dk., akış hızı 1 ml/dk., injeksiyon hacmi ise 20 μ l olarak ayarlandı. Bileşikler, 280 nm dalga boyunda saptandı. Tüm bileşenler kullanılmadan önce 0.45 μ m nylon membrandan geçirildi. Veriler LC Postrun (Shimadzu Scientific Instrument, USA) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Örnekler içindeki fenolik bileşikler, standartların alıkonma zamanlarına (RT) göre belirlendi.

3.7.3.1. Standart Hazırlanması

Gallik asit, pirogallol, gentisik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kersetin, askorbik asit ve salisilik asit (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) fenolik bileşikleri standart olarak kullanıldı. Standart bileşiklerin konsantrasyonu 50 μ g/ml olacak şekilde HPLC dereceli MeOH kullanılarak hazırlandı ve 0.45 μ m membrandan geçirildi.

3.7.3.2. Örnek Hazırlanması

Bölüm 3.2.1'de anlatılan şekilde elde edilen aktif fraksiyonlardan HPLC dereceli MeOH kullanılarak 1 mg/ml konsantrasyonda numuneler hazırlandı ve 0.45 μ m membrandan geçirildi.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

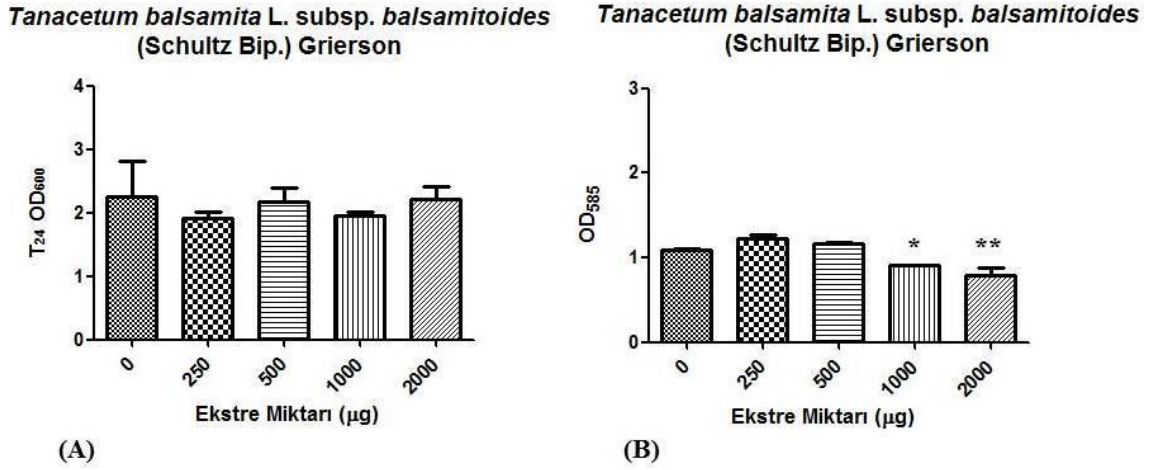
Bakteriyel üreme ve viyolasin baskılanması için elde verilerin anlamlı olduğunu doğrulamak için Graphpad v5.01 programı kullanıldı. Tüm deneyler üç tekrarlı yapılarak deney grupları arasındaki farklar tek yönlü ANOVA ve Tukey testi ile incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HAM EKSTRELERDE ANTI-QS AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

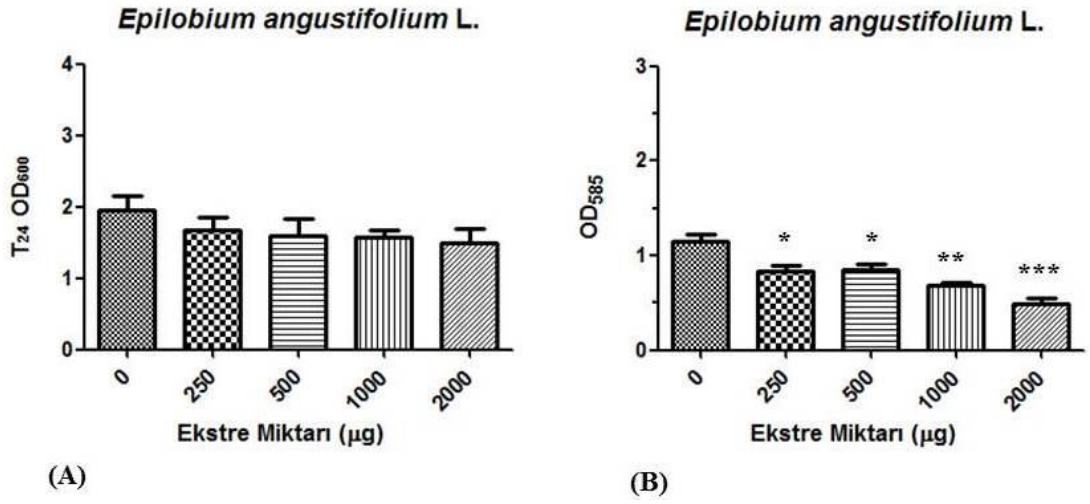
Tez kapsamında öncelikle toplam 26 bitkinin %75'lik MeOH ekstresinin anti-QS aktivitesi *C. violaceum* 12472 ırkı aracılığıyla sıvı inkübasyon yöntemine göre incelenmiştir. Bu türler arasında 18'i (*Centaurea lycopifolia*, *C. nigrifimbria*, *Achillea biebersteinii*, *Hypericum hirsutum*, *H. perforatum*, *H. bupleroides*, *H. bithynicum*, *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile*, *Trifolium pratense* var. *pratense*, *Stachys iberica* subsp. *iberica* var. *iberica*, *S. macrantha*, *Linaria genistifolia* subsp. *genistifolia*, *Carduus adpresus*, *Salvia forskahlei*, *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* (Ronniger) Jalas var. *groshemii*, *T. pseudopulegioides*, *Echium vulgare* ve *Quercus petraea*) için yapılan analizlerde anlamlı bir anti-QS aktivite gözlenmemiştir. Ancak *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides*, *Epilobium angustifolium* L., *Quercus frainetto* Ten. ve *Quercus robur* L. türlerinin ekstreleri bakteri üremesini baskılamazken %31- 62 arasında viyolasin inhibisyonuna neden olmuştur. Bununla birlikte 4 türe ait (*Hypericum orientale* L, *Mentha longifolia* subsp. *longifolia*, *Salvia verticillata* subsp. *verticillata* ve *Trifolium aureum*) ait ekstreler bakteri ırkında %31ve 2.5 kat arasında değişen oranlarda viyolasin artışına neden olmuştur. Anti-QS aktivitesi ve viyolasin artışı gösteren türlere ait sonuçlar aşağıda verilmektedir.

Tanacetum balsamita L. subsp. *balsamitoides* ekstresinin uygulandığı kültürlerde bakteri üremesinin baskılanmadığı (Şekil 4.1A) bununla birlikte 1000 µg ve 2000 µg ekstre uygulanan kültürlerden izole edilen viyolasin miktarlarının kontrole göre %18-31 oranında daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1B).



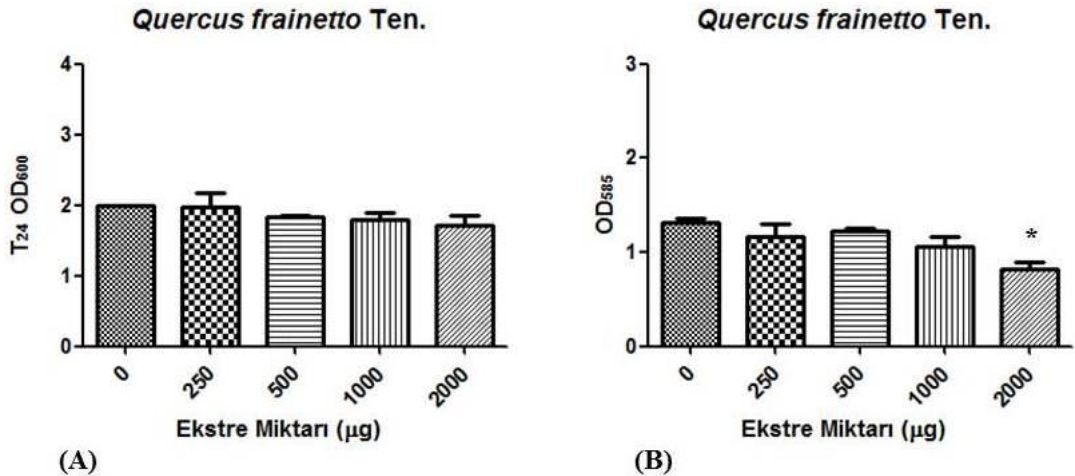
Şekil 4.1: *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides* (Schultz Bip.) Grierson'un %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 ve ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.

Epilobium angustifolium L. ekstresi uygulanan kültürlerde üreme üzerinde anlamlı bir baskılama gözlenmemiştir (Şekil 4.2A). Ancak aynı ekstrenin viyolasin üretimini tüm konsantrasyonlarda inhibe ettiği saptanmış ve bu istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.2B). Özellikle 1000 µg ve 2000 µg miktarlardaki ekstrelerde baskılanma sırasıyla %41 ve %57 oranlarında olmuştur.



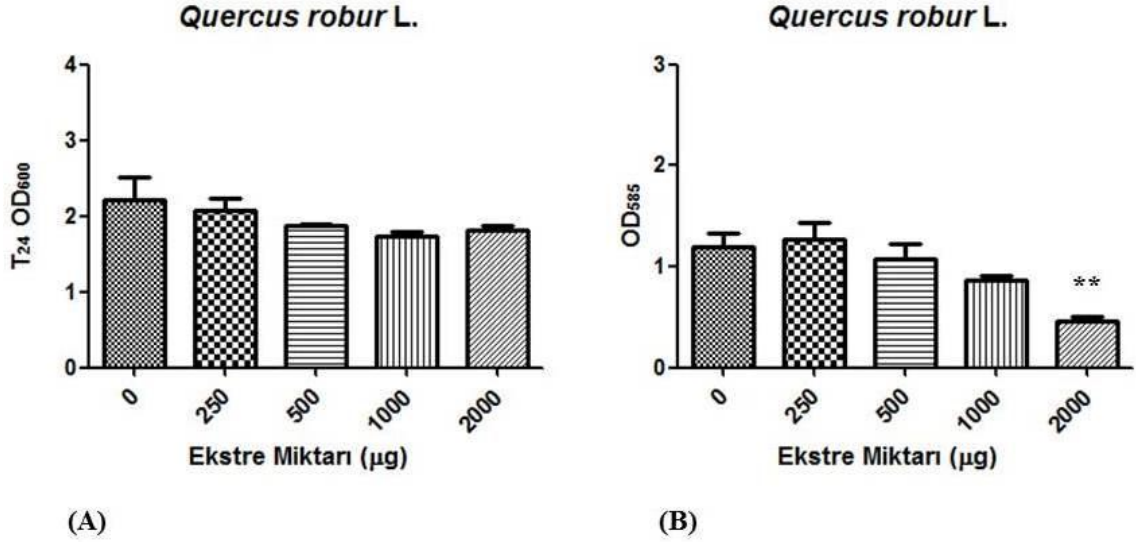
Şekil 4.2: *Epilobium angustifolium* L.'nin %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A) ve OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg; 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmektedir.

Quercus frainetto Ten. ekstresinin uygulandığı bakteri kültürlerinin OD_{600} değerlerinde baskılanma gözlenmezken (Şekil 4.3A), 2000 µg ekstre uygulandığında kültürlerde viyolasin üretiminin anlamlı bir şekilde yaklaşık %33.5 oranında baskılandığı saptanmıştır (Şekil 4.3B).



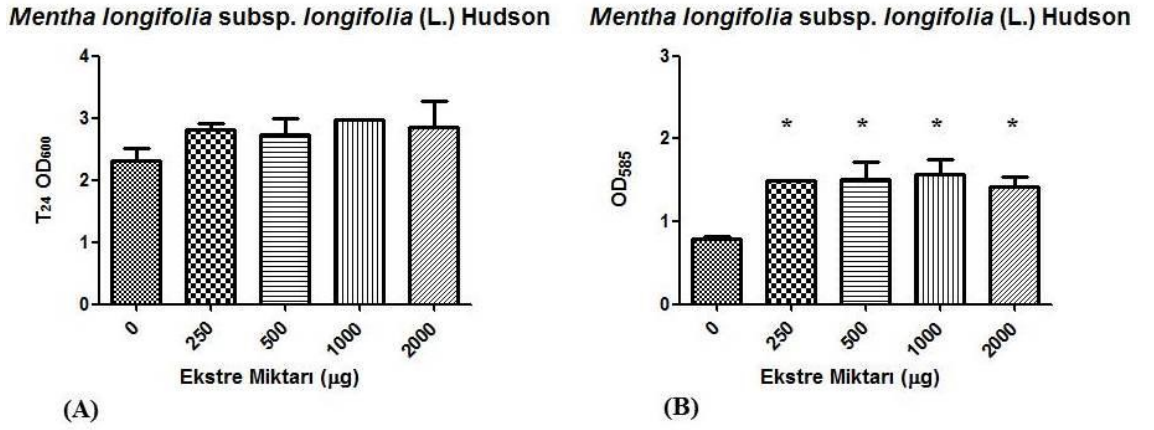
Şekil 4.3: *Quercus frainetto* Ten. ekstresinin farklı miktarları için CV12472 ile yapılan mikropılaka yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A) ve OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg; 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$ olarak ifade edilmektedir.

Quercus robur L. ekstresinin uygulandığı CV12472 sıvı kültürlerinde de bakteri üremesi baskılanmamıştır (Şekil 4.4A). Ancak özellikle 2000 µg ekstre uygulandığında viyolasin üretiminde %62 oranında anlamlı bir baskılanma saptanmıştır (Şekil 4.4B).



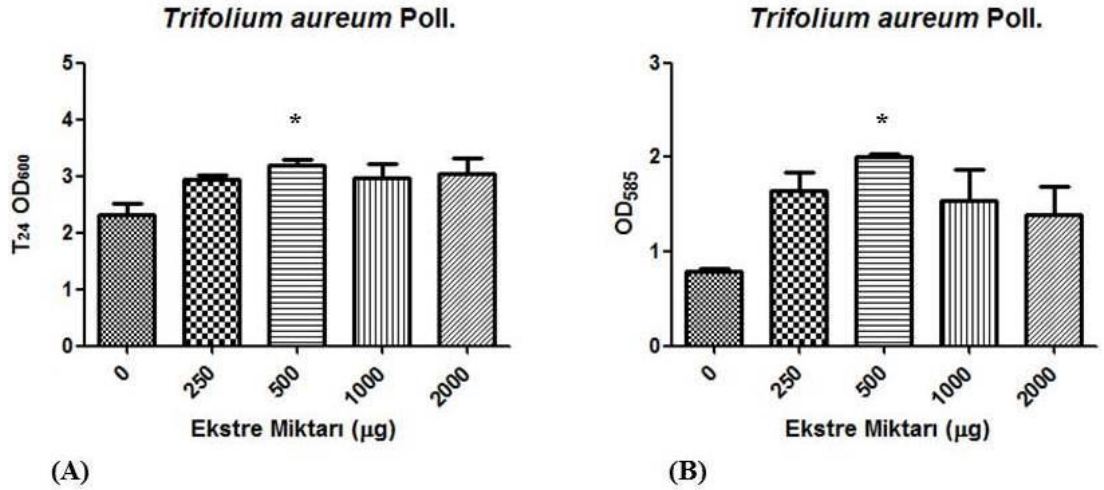
Şekil 4.4: *Quercus robur* L. ekstresinin farklı miktarları için CV12472 ile yapılan mikropilaka yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.

Mentha longifolia subsp. *longifolia* L. ekstresinin uygulanan kültürlerde ise üreme ortalama % 23 oranında artarken bu veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.5A). Bununla birlikte, viyolasin üretimi de ekstre kullanımıyla beraber kontrole göre yaklaşık olarak iki katı düzeyinde anlamlı bir artış olmuştur (Şekil 4.5B).



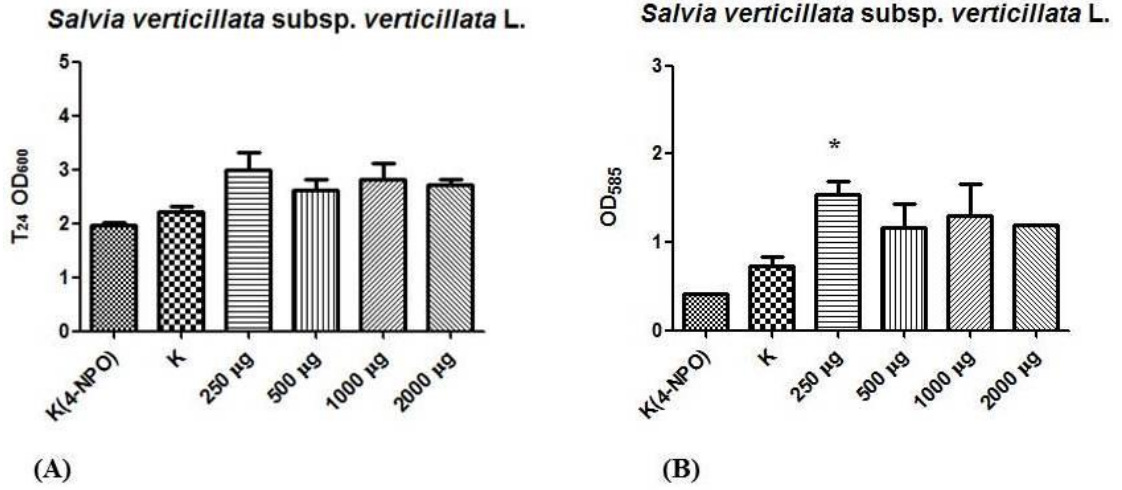
Şekil 4.5: *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* (L.) Hudson'un %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A) ve OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 μg , 2: 500 μg ; 3: 1000 μg ; 4: 2000 μg ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$ olarak ifade edilmektedir.

Trifolium aureum Poll. ekstresinin üreme üzerinde baskılayıcı etkisi olmamakla birlikte, ekstre uygulanan kültürlerde üreme ortalama % 31 oranında artmıştır (Şekil 4.6A). Viyolasin üretiminde de kontrole göre yaklaşık iki katı oranında artış sağlamıştır (Şekil 4.6B).



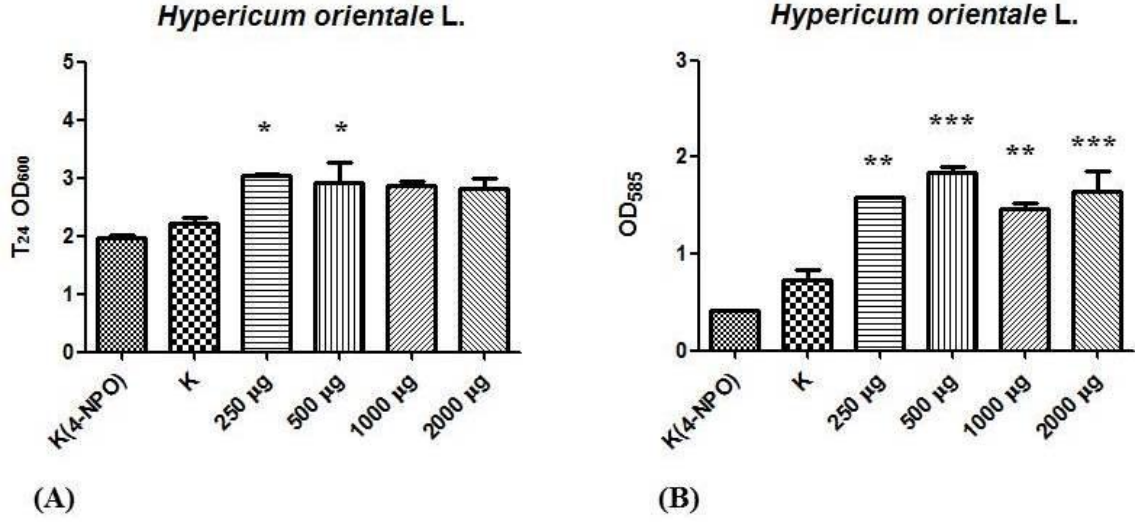
Şekil 4.6: *Trifolium aureum* Poll.'ün %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A) ve OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 μg , 2: 500 μg ; 3: 1000 μg ; 4: 2000 μg ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$ olarak ifade edilmektedir.

Salvia verticillata subsp. *verticillata* L. ekstresinin üreme üzerinde baskılayıcı bir etkisi olmamakla birlikte (Şekil 4.7A), viyolasin üretimi de ekstre kullanımıyla beraber kontrole göre ortalama %89 oranında artmıştır (Şekil 4.7B).



Şekil 4.7: *Salvia verticillata* subsp. *verticillata* L. Miller'in %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.

Hypericum orientale L. ekstresinin uygulandığı kültürlerde üreme ortalama %18 artırmıştır (Şekil 4.8A). Viyolasin üretimi de ekstre kullanımıyla beraber kontrole göre iki kattan fazla artış göstermiştir (Şekil 4.8B).



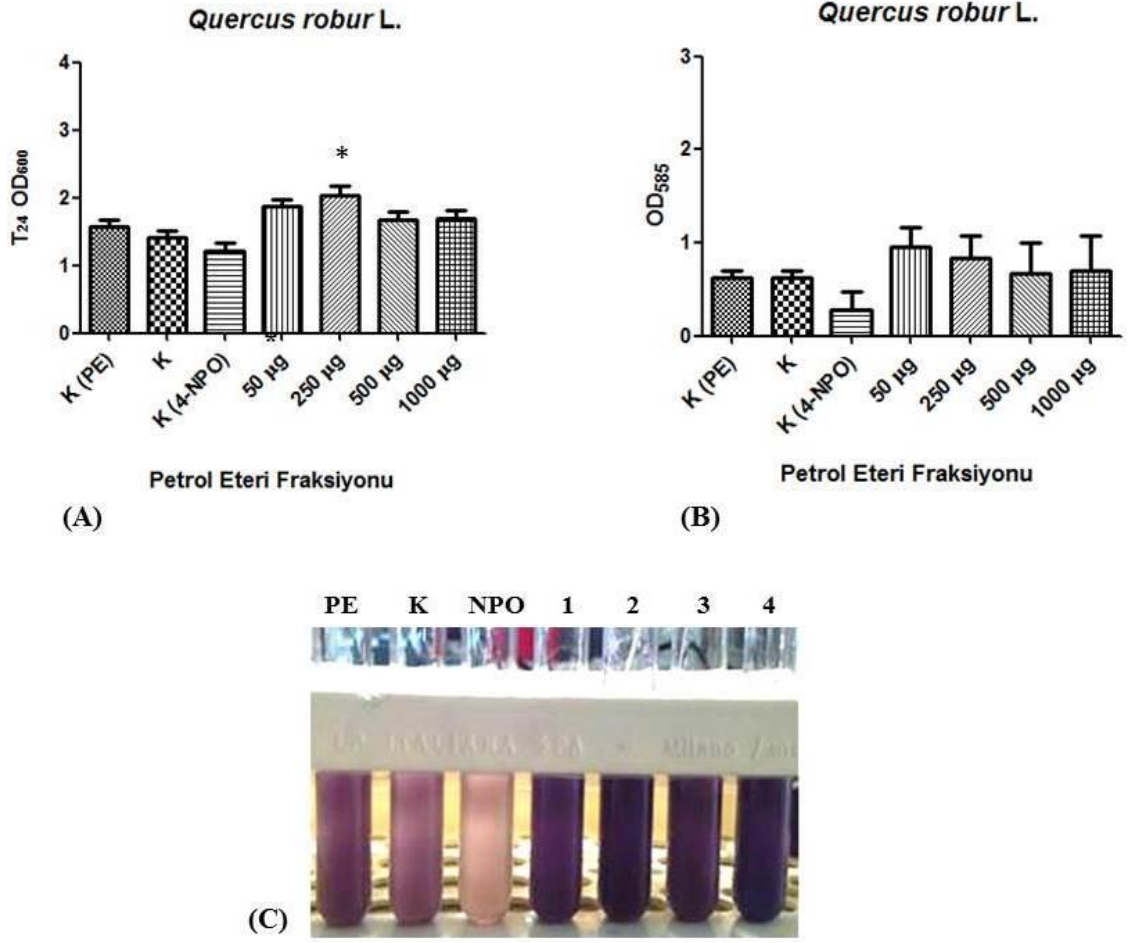
Şekil 4.8: *Hypericum orientale* L.'nin %75 MeOH ekstresi için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A) ve OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B). 0: Kontrol (ekstre yok); 1: 250 µg, 2: 500 µg; 3: 1000 µg; 4: 2000 µg ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 olarak ifade edilmektedir.

4.2. BİYOAKTİVİTE İLE YÖNLENDİRİLMİŞ BİTKİ FRAKSİYONLARINDA ANTI-QS AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

Biyoaktivite ile yönlendirilmiş ekstre fraksiyonlaması çalışmaları için en yüksek anti-QS aktivite gösteren *Quercus robur* ve yakın türü olan *Quercus frainetto* Ten. seçilmiştir. Bu türlere ait ekstraların dört farklı fraksiyonu hazırlanarak aşağıda belirtilen yöntemler ile anti-QS aktivite bakımından incelenmiştir.

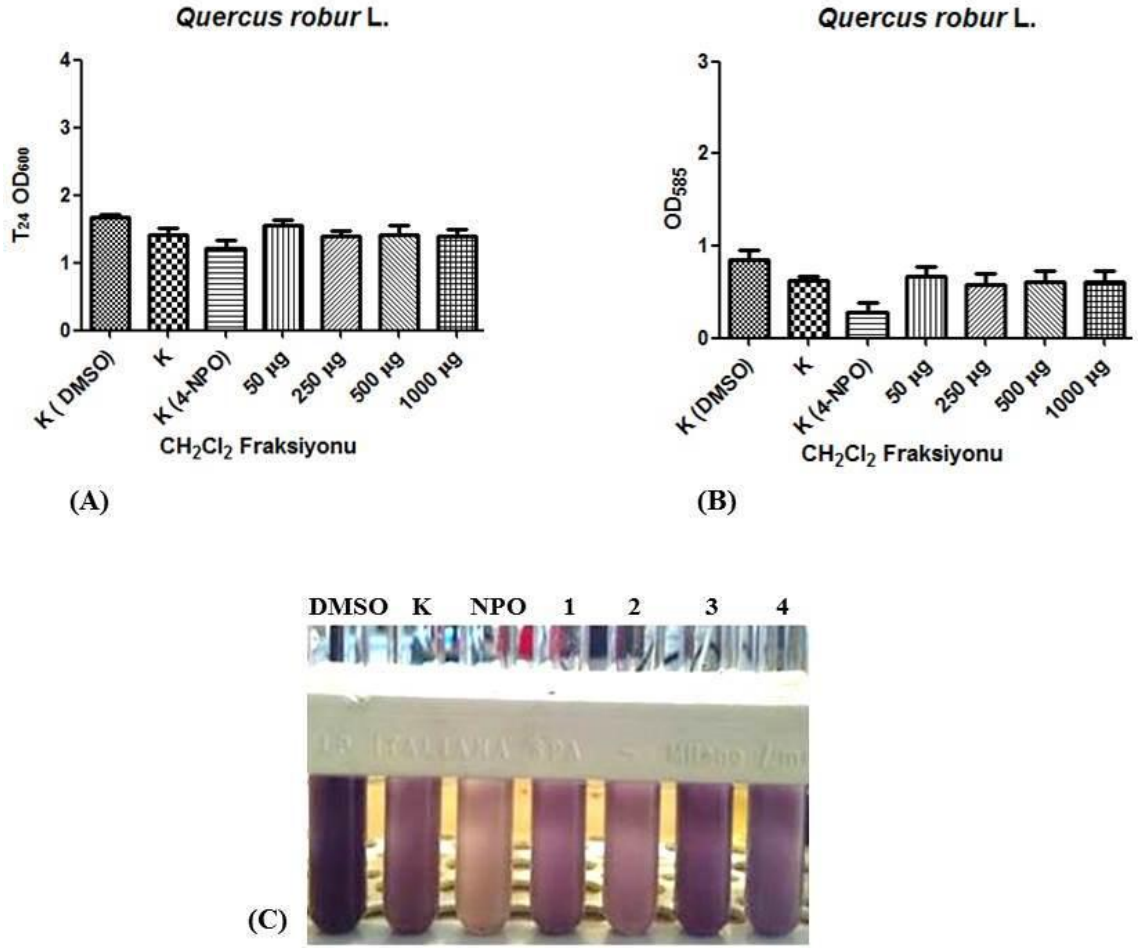
4.2.1. *Chromobacterium violaceum* CV12472 ile Sıvı İnkübasyon Yöntemi

Quercus robur L. petrol eteri fraksiyonu CV12472 ırkı ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine göre bakteri üremesini kontrole göre ortalama %30 (Şekil 4.9A), viyolasin üretimini ise %23 oranında (Şekil 4.9B ve C) artırmıştır.



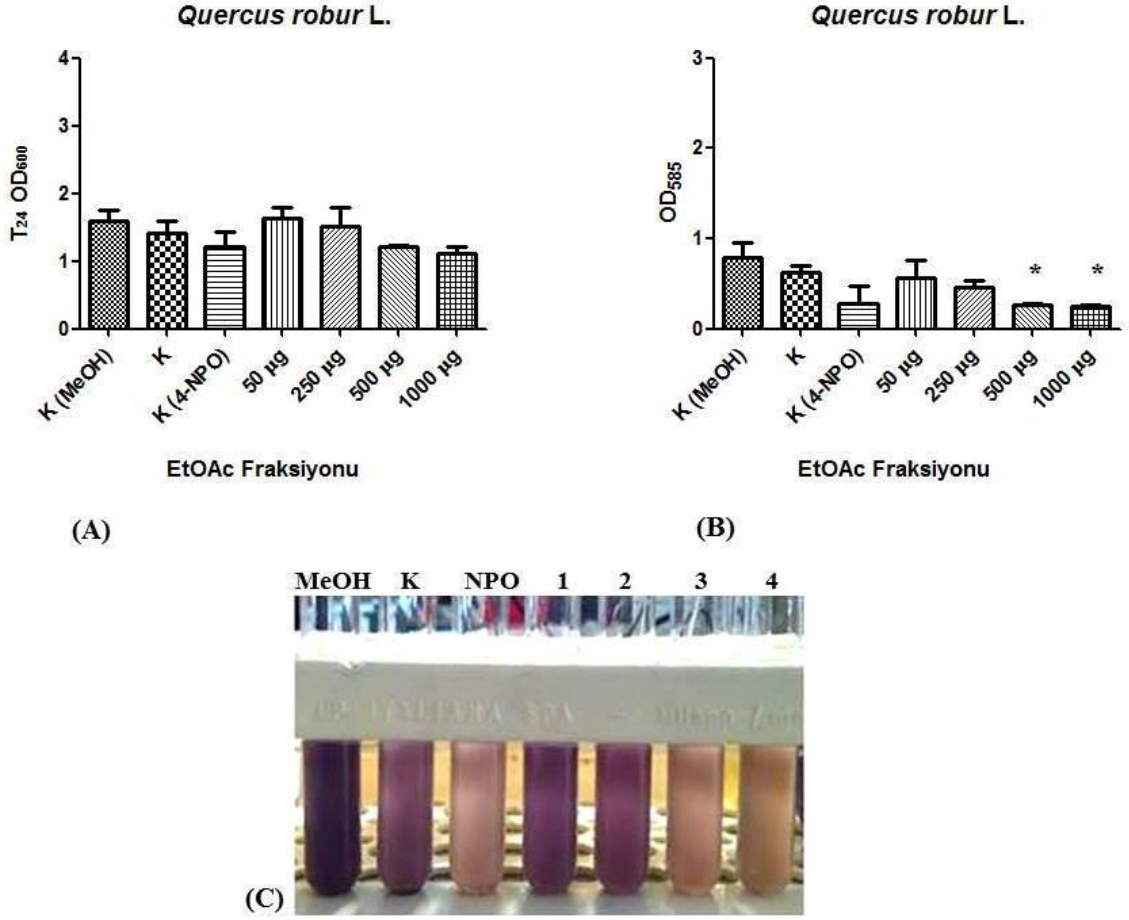
Şekil 4.9: *Quercus robur* L. petrol eteri farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). PE: Petrol eteri içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 μ g); 1: 50 μ g, 2: 250 μ g, 3: 500 μ g, 4: 1000 μ g ekstre. Değerler ortalama \pm SD olup, istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$ olarak ifade edilmektedir.

Quercus robur L. CH_2Cl_2 fraksiyonunun bakteri üremesi (Şekil 4.10A) ve viyolisin üretimi (Şekil 4.10B ve C) üzerinde kontrole göre baskılayıcı veya artırıcı bir etkisi gözlenmemiştir.



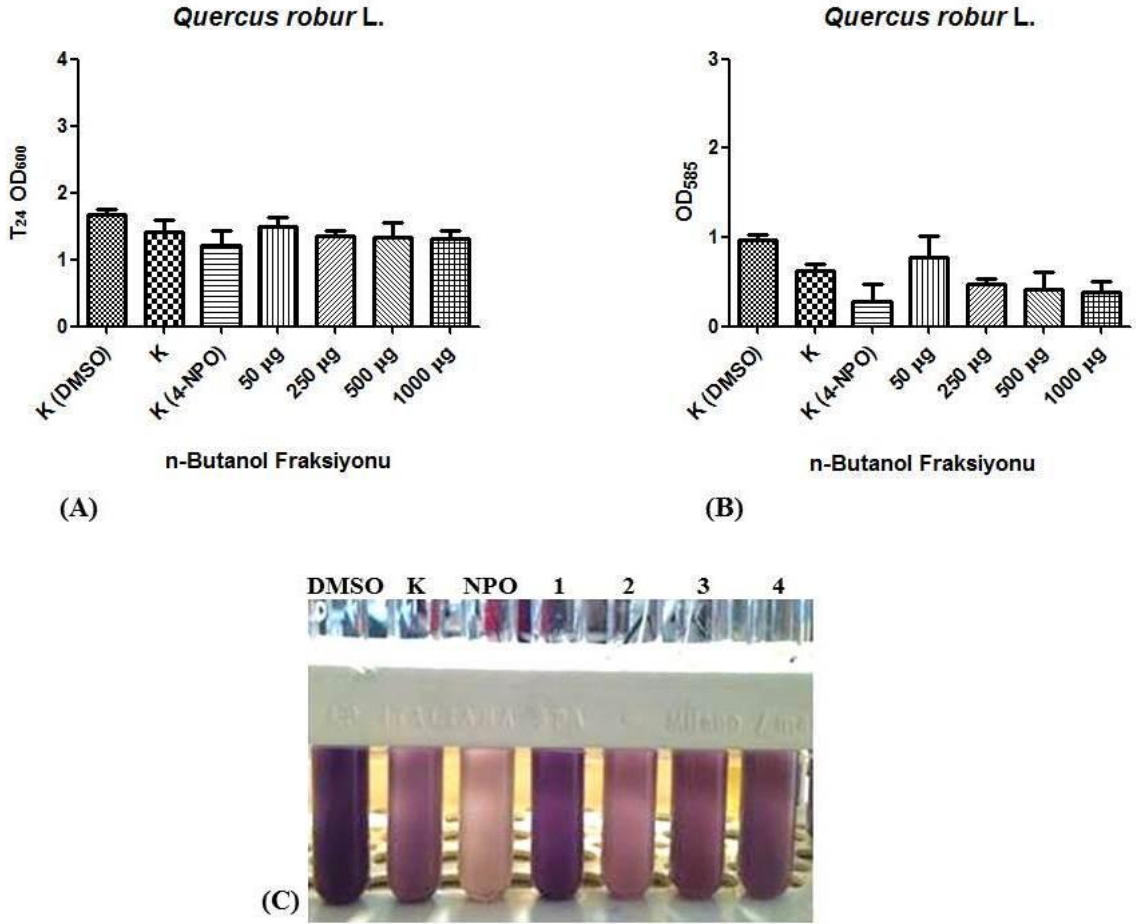
Şekil 4.10: *Quercus robur* L. CH₂Cl₂ fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.

Quercus robur L. EtOAc fraksiyonunun kullanıldığı kültürlerde üremenin baskılanmadığı (Şekil 4.11A), ancak viyolasin üretiminin 500 µg ve 1000 µg ekstre kullanılan kültürlerde %75 oranında inhibe olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11B ve C). Bu baskılanma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.



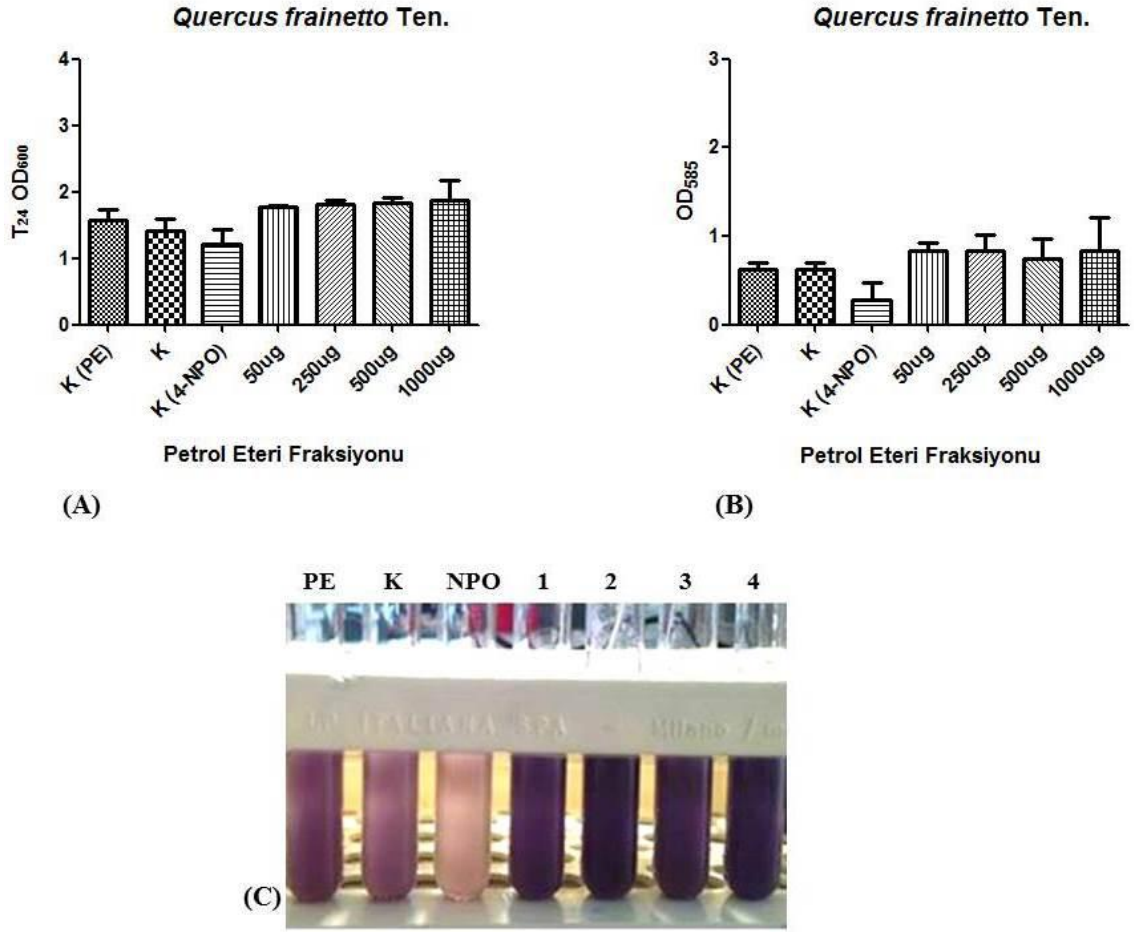
Şekil 4.11: *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.

Quercus robur L. n-butanol fraksiyonunun üremeyi baskılayıcı etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.12A). Viyolasin üretimi ise 250 µg, 500 µg ve 1000 µg ekstre kullanılan kültürlerde kontrole göre %27, %34 ve %40 oranında baskılanmıştır (Şekil 4.12B ve C).



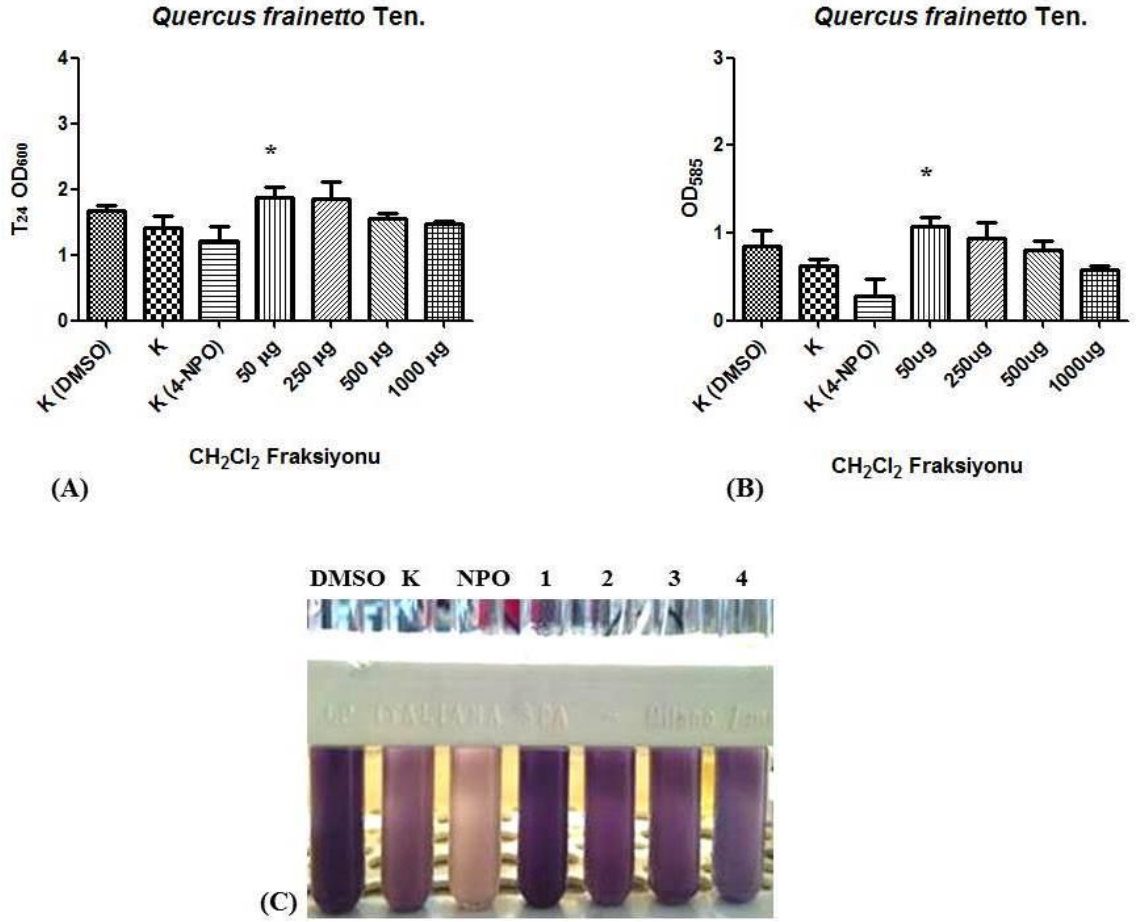
Şekil 4.12: *Quercus robur* L. n-butanol farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg, 3: 500 µg, 4: 1000 µg ekstre.

Quercus frainetto Ten. petrol eteri fraksiyonu bakteri üremesini kontrole göre ortalama %20 oranında artırmıştır (Şekil 4.13A). Aynı şekilde viyolasin üretiminin de yaklaşık olarak %30 arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.13B ve C).



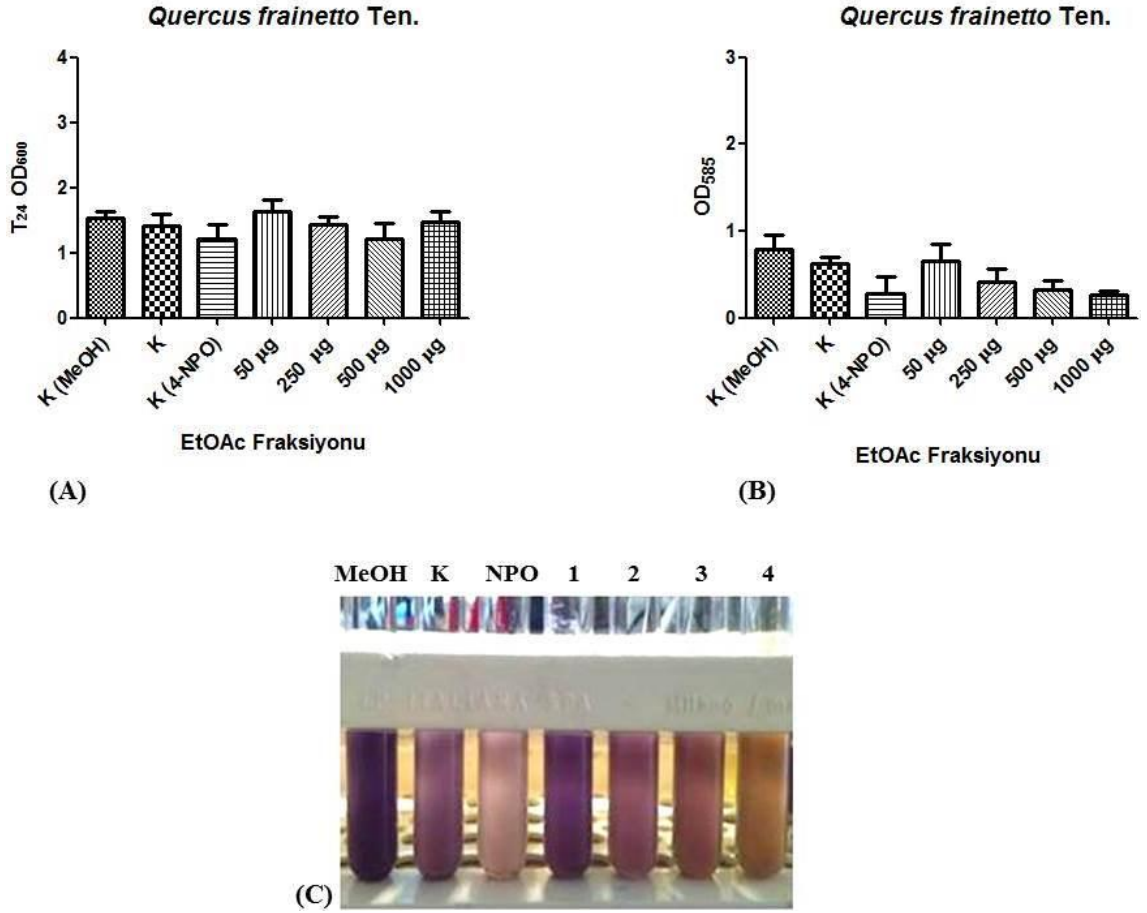
Şekil 4.13: *Quercus frainetto* Ten. petrol eteri farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). PE: Petro eteri içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.

Quercus frainetto Ten. CH₂Cl₂ fraksiyonunun bakteri üremesi üzerinde artırıcı etki göstermiştir (Şekil 4.14A). Viyolasin üretimi bakımından özellikle 50 µg ekstre kullanılan kültürlerde kontrole göre %37 oranında artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.14B ve C).



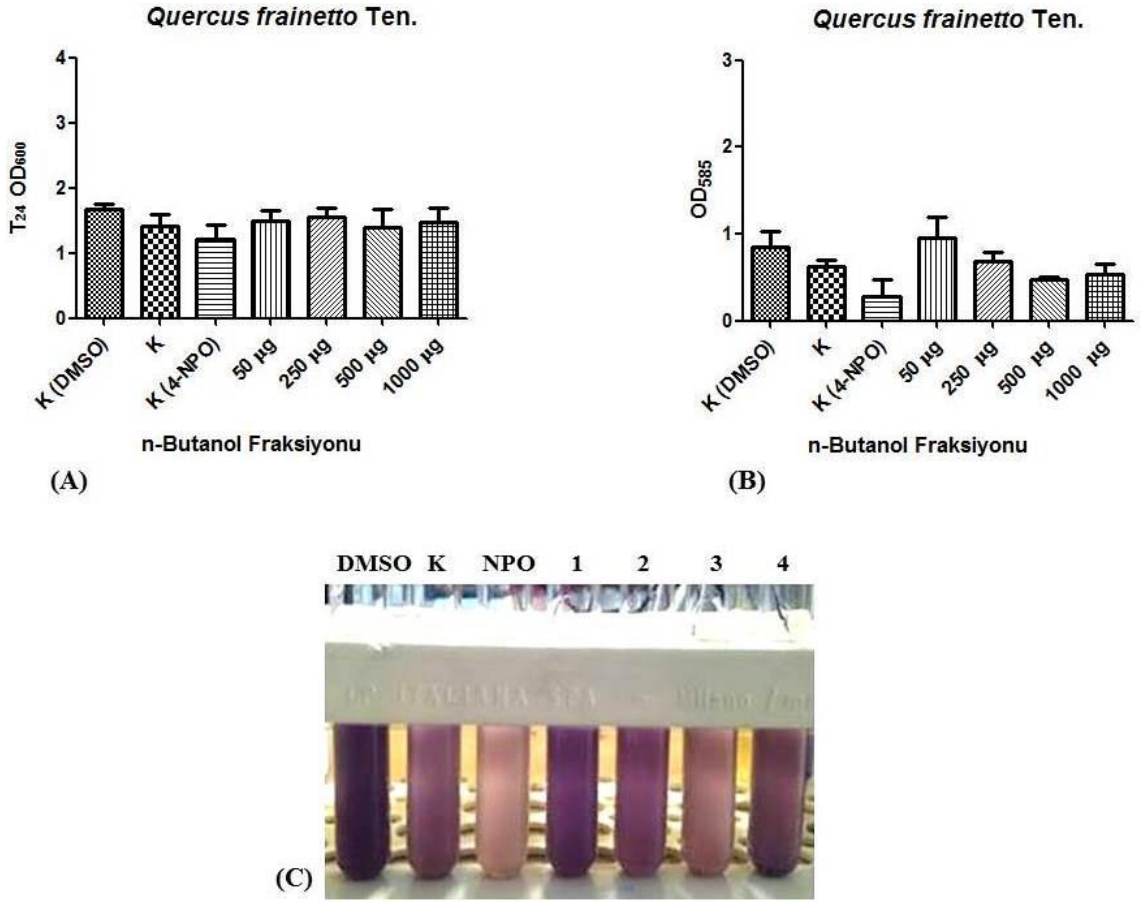
Şekil 4.14: *Quercus frainetto* Ten. CH₂Cl₂ fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg; 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar *p<0.05 olarak ifade edilmektedir.

Quercus frainetto Ten. EtOAc fraksiyonunun bakteri üremesi üzerinde baskılayıcı etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.15A). Ancak 250 µg, 500 µg ve 1000 µg olarak kullanılan ekstre miktarlarıyla birlikte viyolasin üretiminde kontrole göre sırasıyla %34, %51 ve %59 oranlarında inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 4. 15B ve C).



Şekil 4.15: *Quercus frainetto* Ten. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.

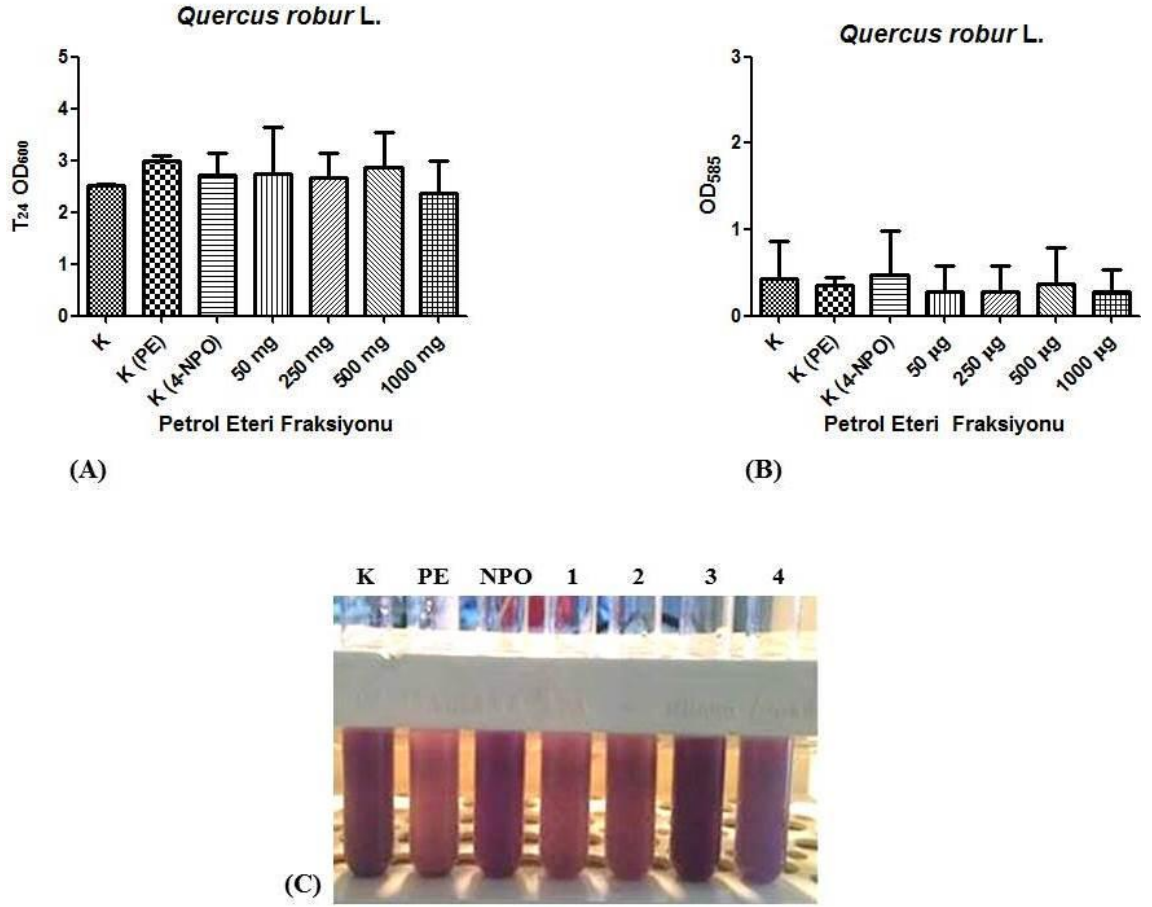
Quercus frainetto Ten. n-butanol fraksiyonunun bakteri üremesi üzerinde baskılayıcı etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.16A). Bununla birlikte 500 µg ve 1000 µg ekstre kullanılan kültürlerde kontrole göre %24 ve %16 oranlarında viyolasin baskılanması saptanmıştır (Şekil 4.16B ve C).



Şekil 4.16: *Quercus frainetto* Ten. n-butanol fraksiyonunun farklı miktarları için CV12472 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg, 3: 500 µg, 4: 1000 µg ekstre.

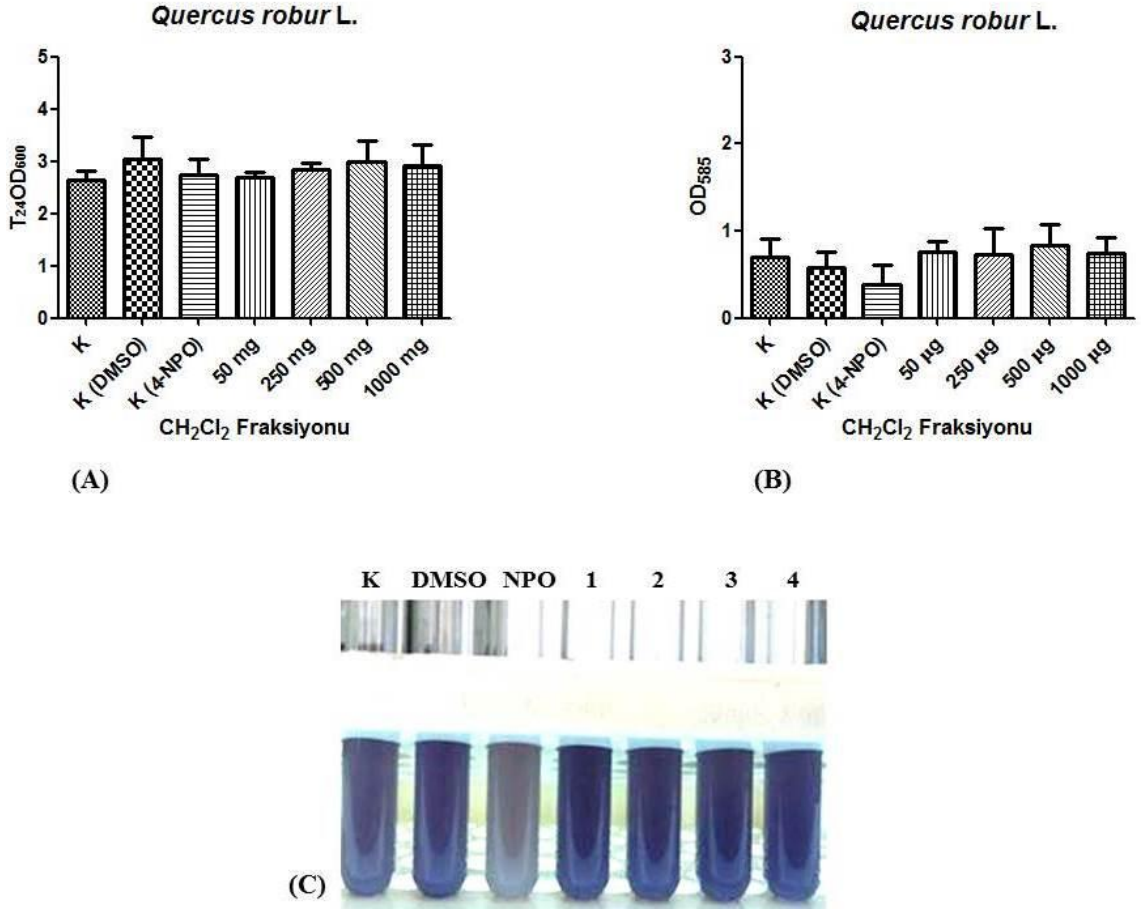
4.2.2. *Chromobacterium violaceum* CV026 ile Sıvı İnkübasyon Yöntemi

Quercus robur L. petrol eteri fraksiyonunun mutant bakteri ırkı olan CV026'nın üremesi (Şekil 4.17A) ve viyolasin üretimi üzerinde inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.17B ve C).



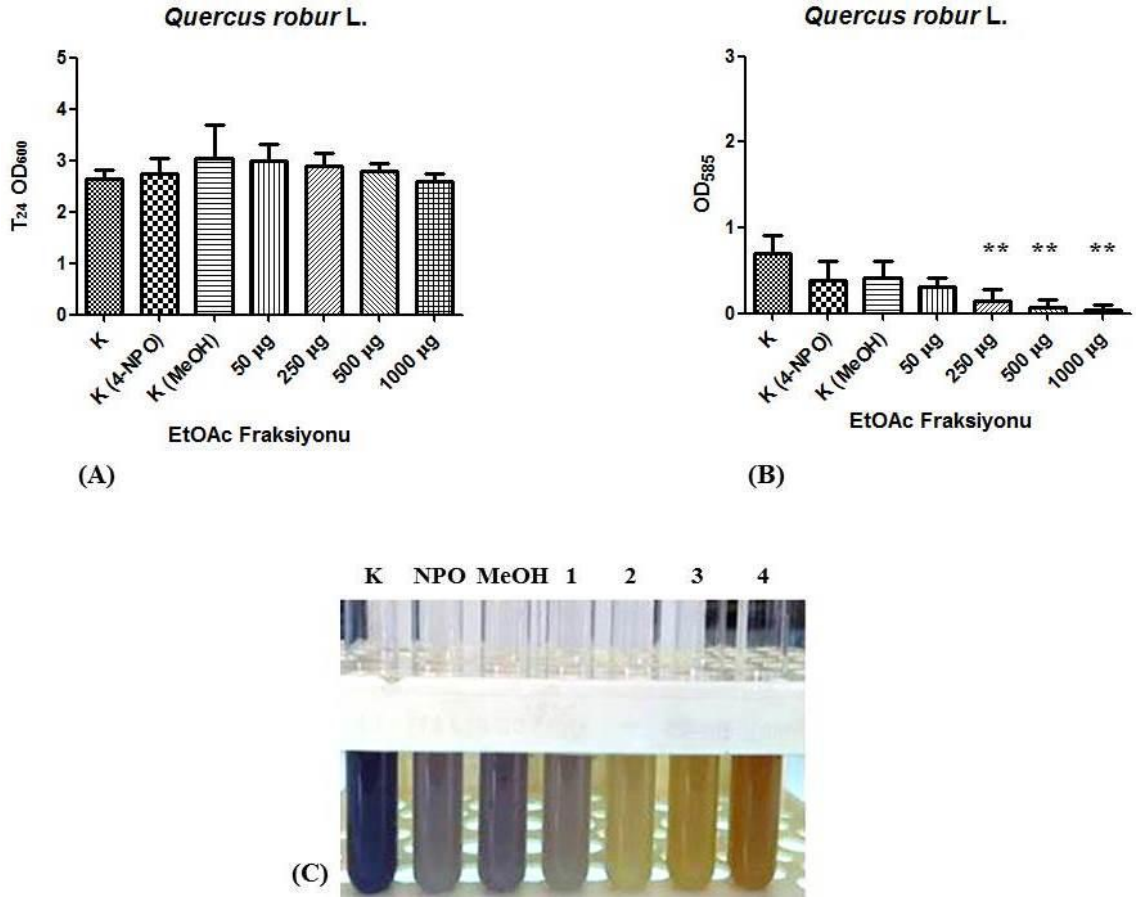
Şekil 4.17: *Quercus robur* L. petrol eteri fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); PE: Petrol eteri içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.

Benzer şekilde *Quercus robur* L. CH₂Cl₂ fraksiyonu da bu bakteri irkının üremesi (Şekil 4.18 A) ve viyolasin üretimi üzerinde baskılayıcı etki göstermemiştir (Şekil 4.18B ve C).



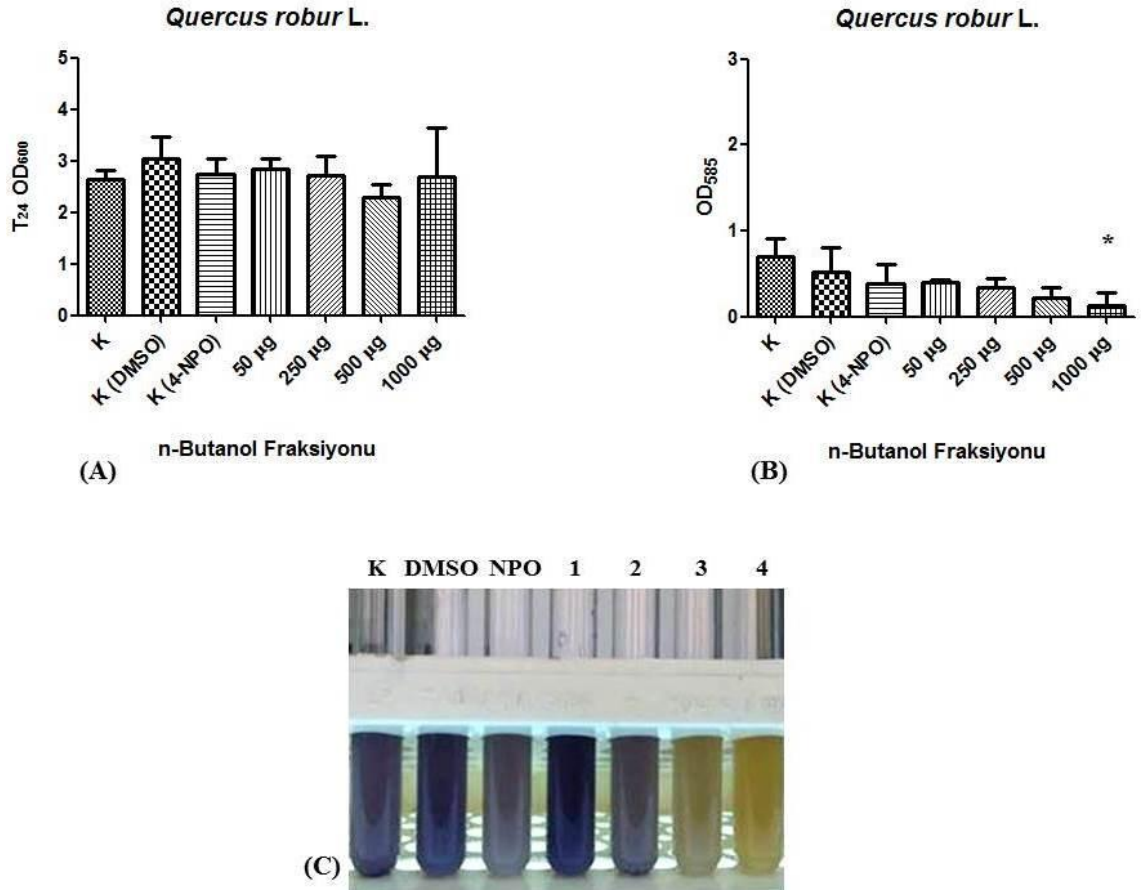
Şekil 4.18: *Quercus robur* L. CH₂Cl₂ fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.

Quercus robur L. EtOAc fraksiyonunun üreme üzerinde baskılayıcı etkisi gözlenmemek ile birlikte (Şekil 4.19A) kullanılan ekstre miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı ve oldukça yüksek viyolasin baskılanması saptanmıştır. Bu oranlar ekstre artışına bağlı olarak 250 µg, 500 µg ve 1000 µg için sırasıyla %80, %90 ve %92 olmuştur (Şekil 4.19B ve C).



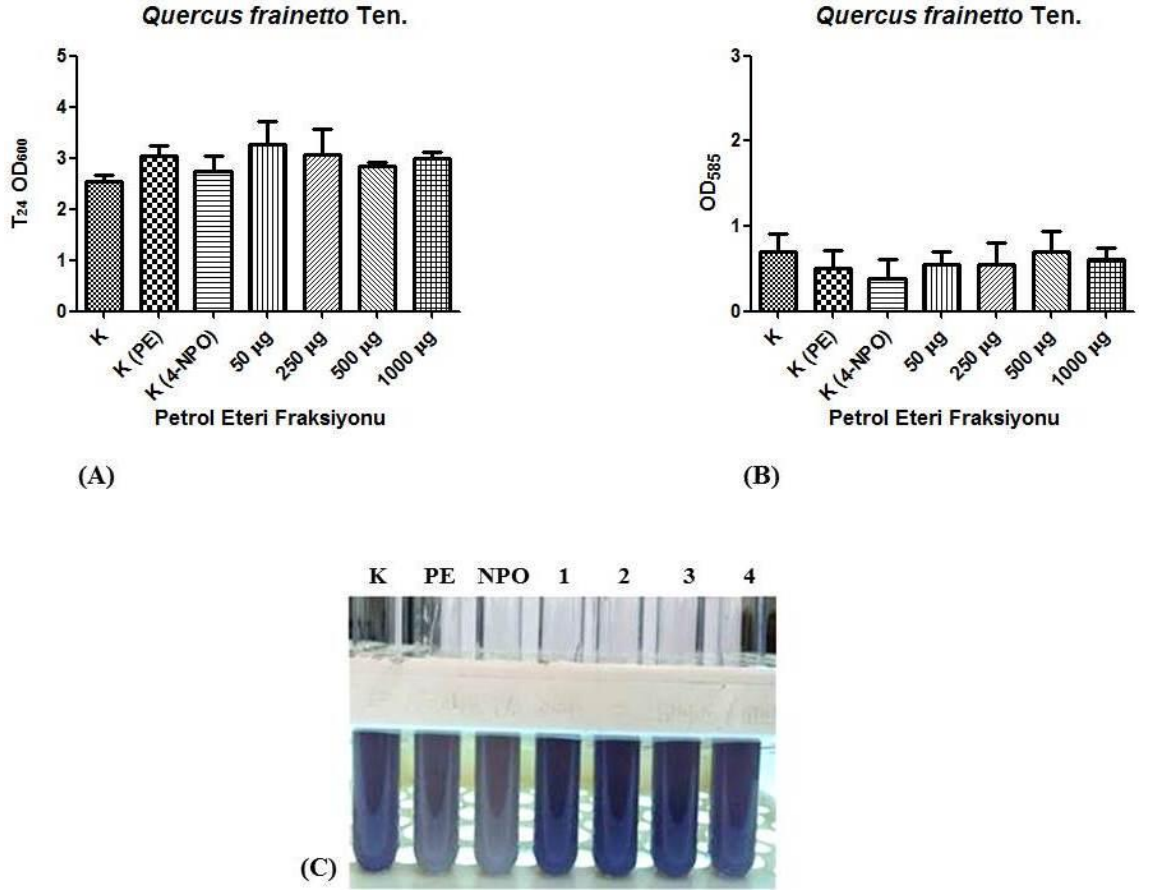
Şekil 4.19: *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; 1: 50 µg, 2: 250 µg, 3: 500 µg, 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.

Quercus robur L. n-butanol fraksiyonunun da üremeyi baskılamadığı (Şekil 4.20A), bununla birlikte 1000 µg ekstre kullanılan kültürde istatistiksel açıdan anlamlı %82 oranında viyolasin inhibisyonu saptanmıştır (Şekil 4.20B ve C).

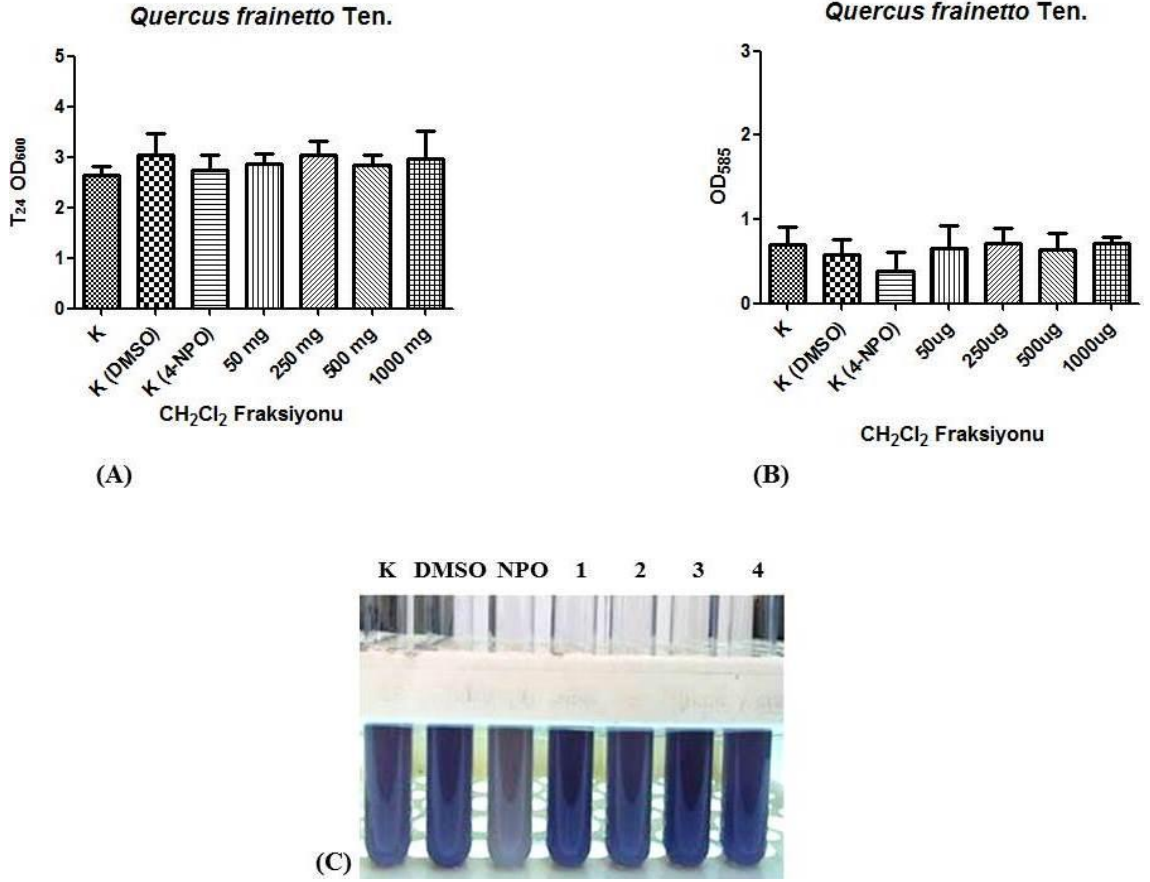


Şekil 4.20: *Quercus robur* L. n-butanol fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.

Quercus frainetto Ten.'in petrol eteri ve CH₂Cl₂ fraksiyonunun CV026 bakteri üremesi (Şekil 4.21A ve 4.22A) ve viyolasin üretimi üzerinde baskılayıcı etkisi olmamıştır (Şekil 4.21B ve C; 4.22B ve C).

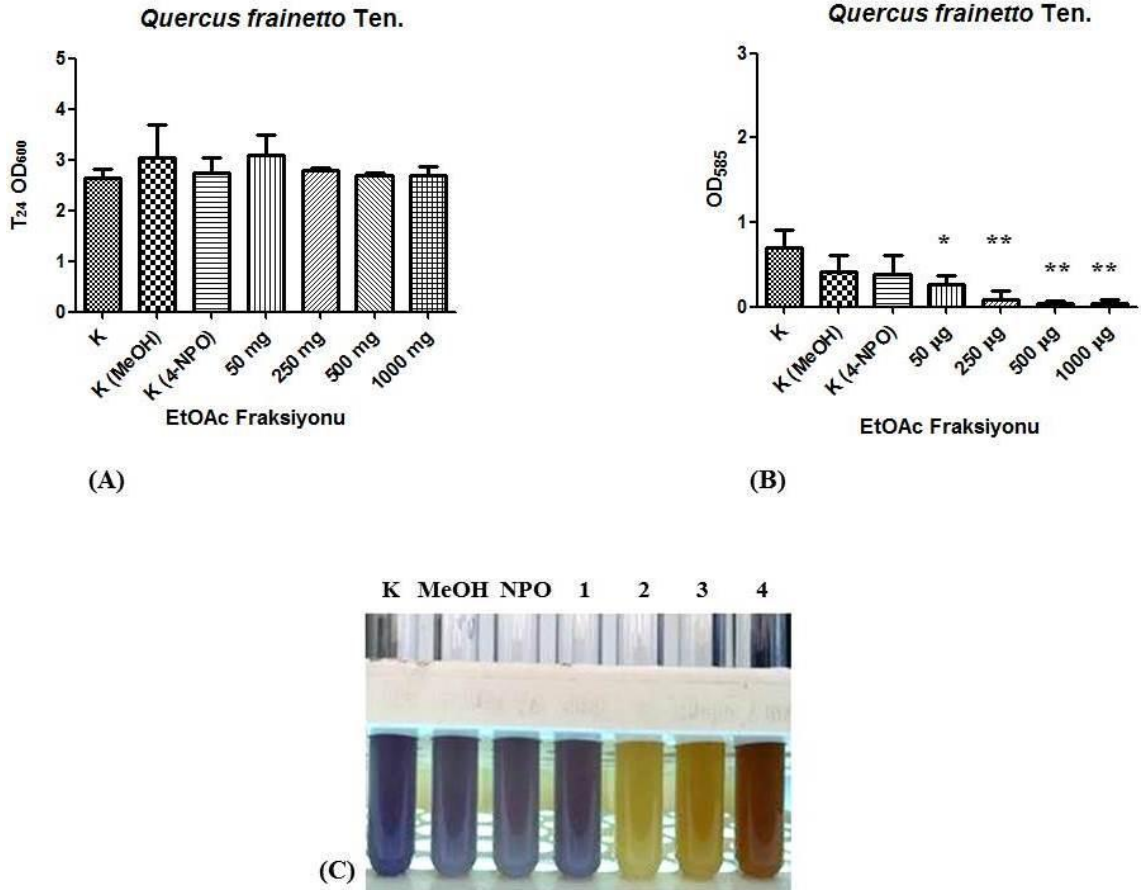


Şekil 4.21: *Quercus frainetto* Ten. petrol eteri fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T_{24}) OD_{600} (A), OD_{585} değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); PE: Petrol eteri içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg, 3: 500 µg, 4: 1000 µg ekstre.



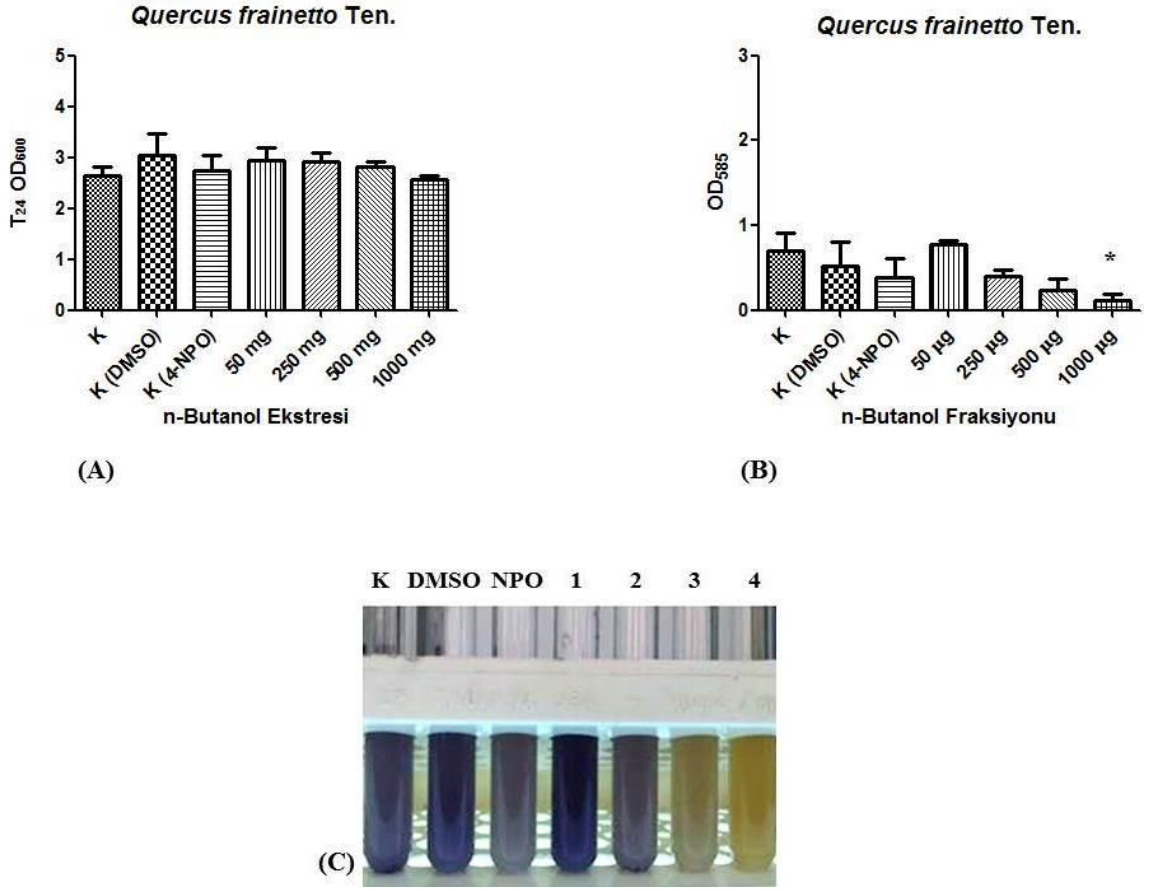
Şekil 4.22: *Quercus frainetto* Ten. CH₂Cl₂ fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre.

Quercus frainetto Ten. EtOAc fraksiyonu bakteri üremesini etkilememiş (Şekil 4.23A) ve bununla birlikte kullanılan ekstre miktarlarındaki artışa bağlı olarak viyolasin üretimi kontrole göre %63, %87, %95 ve %94 oranlarında baskılanmış ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.23B ve C).



Şekil 4.23: *Quercus frainetto* Ten. EtOAc fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); MeOH: %75 MeOH içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 ve ** p<0.01 olarak ifade edilmektedir.

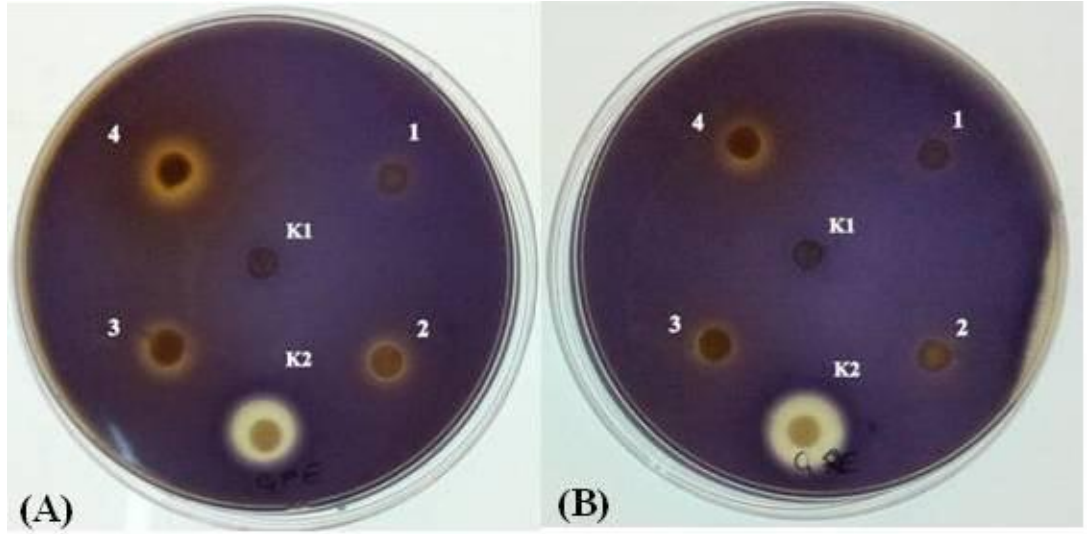
Quercus frainetto Ten. n-butanol fraksiyonunun bakteri üremesi üzerinde baskılayıcı etkisi olmamıştır (Şekil 4.24A). Viyolasin üretimi ise 250 µg ve üzeri miktarlarda artarak baskılanmış, 1000 µg ekstre kullanımıyla baskılanma oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %85'e ulaşmıştır (Şekil 4.24B ve C).



Şekil 4.24: *Quercus frainetto* Ten. n-butanol fraksiyonunun farklı miktarları için CV026 ile yapılan sıvı inkübasyon yöntemine ait 24. sa. (T₂₄) OD₆₀₀ (A), OD₅₈₅ değerlerini gösteren grafikler (B) ve resim (C). K: Kontrol (ekstre ve çözücü yok); DMSO: %4 DMSO içeren kontrol; NPO: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg; 3: 500 µg; 4: 1000 µg ekstre. Değerler ortalama ±SD olup, istatistiksel farklılıklar * p<0.05 olarak ifade edilmektedir.

4.2.3. *Chromobacterium violaceum* CV12472 ile Disk Difüzyon Yöntemi

Aktif olan *Q. frainetto* Ten. ve *Q. robur* L.'nin EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarının kullanıldığı CV12472 ırkı ile yapılan disk difüzyon analizi sonucunda elde edilen zon çapları Tablo 4.1'de verilmiştir. Buna göre bu iki türün EtOAc fraksiyonlarının eklendiği petrielerde artan konsantrasyonlara bağlı olarak opak zon çaplarında artış olmuştur (Şekil 4.25A ve B)



Şekil 4.25: *Chromobacterium violaceum* (CV12472) bakterisi ile yapılan disk difüzyon yöntemine göre *Q. frainetto* Ten. (A) ve *Q. robur* L.'nin EtOAc fraksiyonlarında anti-QS aktivite analizleri (B). K1: %75 MeOH içeren kontrol; K2: 4-NPO içeren pozitif kontrol (300 µg); 1: 50 µg, 2: 250 µg, 3: 500 µg, 4: 1000 µg ekstre.

Q. frainetto Ten. EtOAc fraksiyonunun 1000 µg ile oluşan zon çapının (Şekil 4.25A, 4 No'lu disk) ortalaması 12.83 ± 0.28 mm olarak belirlenmiş ve bu değer pozitif kontrol olan 4-NPO'nun oluşturduğu zon çapına (14.33 ± 0.57) (Şekil 4.25A, K2 No'lu kuyu) yakın bulunmuştur (Tablo 4.1).

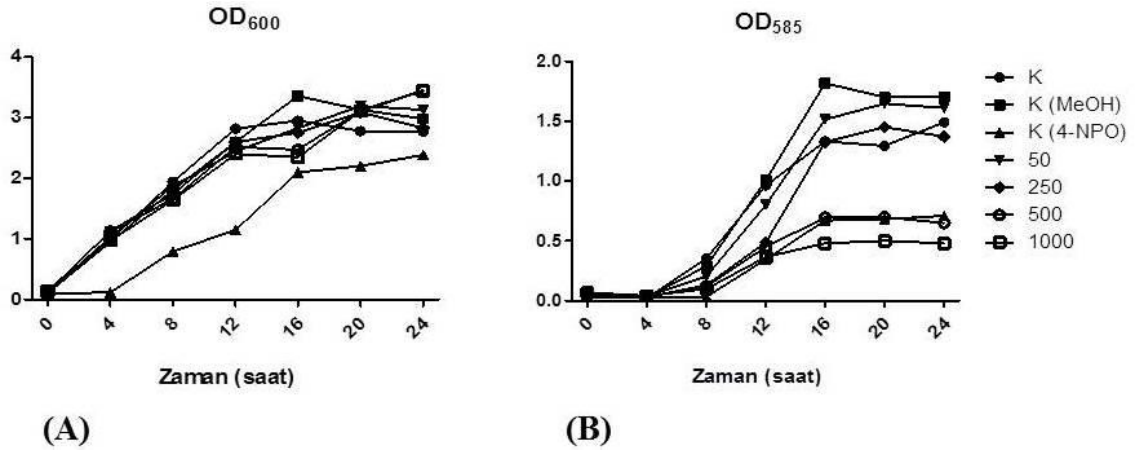
Tablo 4.1: *Quercus frainetto* Ten. ve *Quercus robur* L.'nin EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarının CV12472 ırkı ile yapılan disk difüzyon analizi sonuçları.

Ekstre/ Madde Adı	Ekstre/ Madde Miktarı (µg)	Zon Çapları (mm)	Ekstre/ Madde Adı	Ekstre/ Madde Miktarı (µg)	Zon Çapları (mm)
<i>Q. robur</i> L. EtOAc	50	6±0	<i>Q. frainetto</i> Ten. EtOAc	50	6±0
	250	6±0		250	7±0
	500	7±0		500	8,33±0,57
	1000	8,3±0,57		1000	12,83± 0,28
<i>Q. robur</i> L. n-Butanol	50	6±0	<i>Q. frainetto</i> Ten. n-Butanol	50	6±0
	250	6±0		250	6±0
	500	6,66±0,57		500	6±0
	1000	6,66±0,57		1000	6,66±0,57
4-NPO	300	14,33±0,57	%75 MeOH	-	6±0
Gentamisin	10	14,66±0,57			

*Ölçüm değerlerine disk çapı (6mm) dahildir.

4.3. AKTİF FRAKSİYONLARDA BAKTERİ ÜREMESİ VE VİYOLASİN ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

Aktivite gösteren ekstraler arasından *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun CV12472 kültürlerinin üremesi ve viyolasin üretimi üzerindeki etkisi 24 sa. boyunca alınan ölçümlerle izlenmiştir. 4-NPO için ilk 4 saat boyunca üreme çok yavaş gerçekleşmiş daha sonra artmaya başlamıştır. Yine 4-NPO içeren kültürde üreme grafiği diğer kültürlerin üreme grafiklerinin altında yer almıştır (Şekil 4.26A). 24 saat sonunda pozitif kontrol (4-NPO), 500 µg ve 1000 µg ekstre içeren kültürlerin viyolasin üretimlerinin oldukça baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.26B).

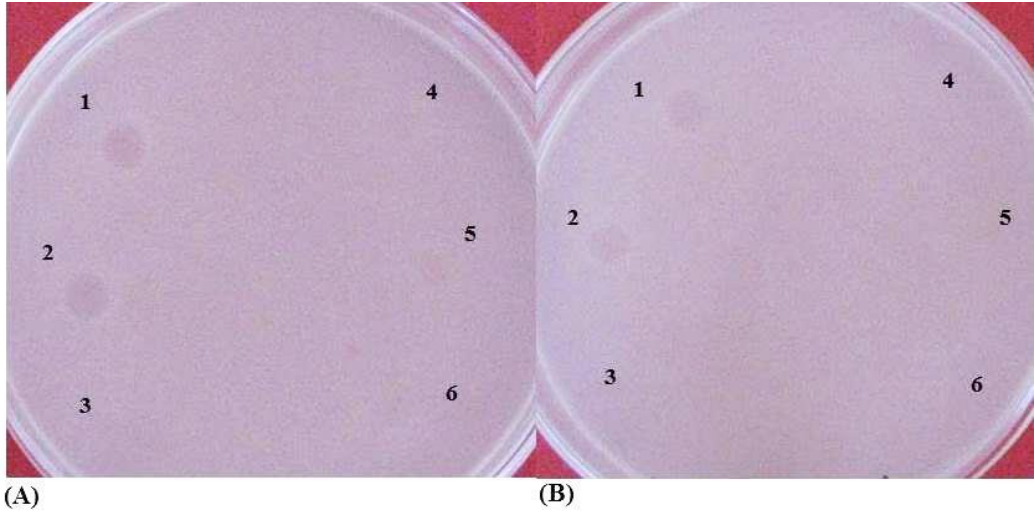


Şekil 4.26: *Quercus robur* L. EtOAc ekstresi uygulanan CV12472 sıvı kültürlerinde 24 sa.'lik üreme (A) ve viyolasin üretimini (B) gösteren grafikler.

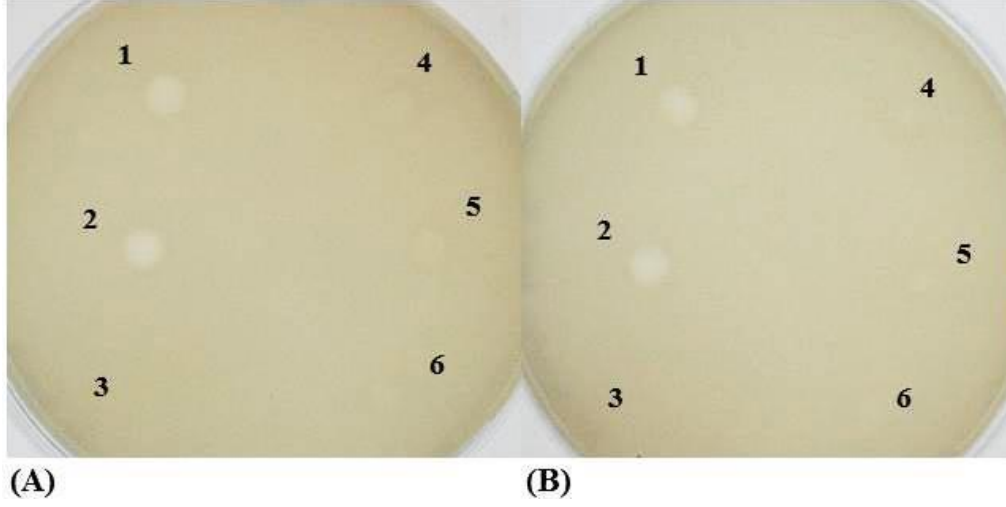
4.4. NİSİN ÜRETİMİNE BAĞLI BİYODİFÜZYON BELİRLEMESİ

Bu çalışmada öncelikle belirleme yönteminin hassasiyetini ölçmek için saf maddeler kullanılmıştır. Kullanılan tüm saf maddeler içinde özellikle ferulik asit ve rosmarinik asitte zon çapının kontrole göre bariz oranda azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.27 ve 4.28). Kontrol gruplarından biri olan ve sadece *L. lactis* içeren kültürlerin oluşturduğu nisin kaynaklı inhibisyon zon çaplarının ortalaması 7.17 ± 0.6 mm olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2). Saf maddeler için kullanılan diğer kontrol grubunda (MeOH) ise zon çapları 6.25 ± 0.57 mm olarak bulunmuştur (Tablo 4.2). %1'lik rosmarinik asit ve ferulik asit

içeren kültürlerden elde edilen zonların (Şekil 4.27A ve 4.28A; 4, 5 ve 6 No'lu zonlar). kontrol gruplarına (Şekil 4.27A, B ve 4.28A, B; 1 ve 2 No'lu zonlar) göre daha küçük oldukları gözlenmiştir. Bu zonların çapları sırasıyla $3,62 \pm 0,47$ mm ve $2,87 \pm 0,25$ mm olmuştur (Tablo 4.2). %2'lik saf madde kullanımında ise zon çapı belirlenememiştir (Tablo 4.2) (Şekil 4.27B ve 4.28B; 4, 5 ve 6 No'lu zonlar). Bu durum üst sıvı içerisindeki nisin varlığının güçlü bir şekilde baskılandığını düşündürmektedir.



Şekil 4.27: Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirlenmesi yöntemine göre %1 (A) ve %2 Rosmarinik asitin etkisi (B). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; 3: saf madde (rosmarinik asit); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.



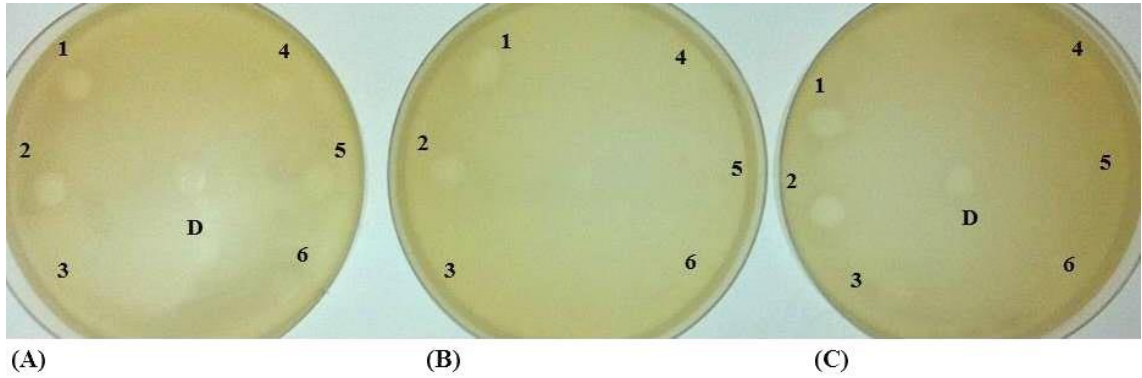
Şekil 4.28: Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirlenmesi yöntemine göre %1 (A) ve %2 ferulik asitin etkisi (B). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; 3: saf madde (ferulik asit); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.

Tablo 4.2: *L.lactis* kültürüne eklenen bitki ekstreleri ve saf maddelerin nisin inhibisyonunu gösteren zon çapı değerleri.

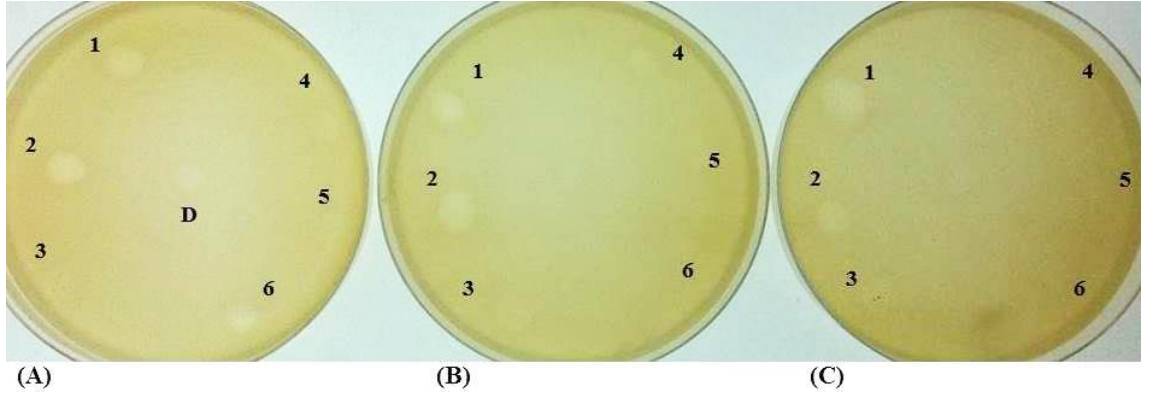
Saf Maddeler ve Bitki Ekstreleri	Konsantrasyon	İnhibisyon Zon Çapı (mm)±SD
Rosmarinik asit	%1	3,62±0,47
	%2	0
Ferulik asit	%1	2,87± 0,25
	%2	0
<i>Quercus robur</i> L. (CH ₂ Cl ₂)	%1	6,25±0,35
	%2	0
	%4	0
<i>Quercus frainetto</i> L. (CH ₂ Cl ₂)	%1	5,4±0,11
	%2	5,1±0,23
	%4	0
MeOH (kontrol)	%2	6,25±0,57
DMSO (Kontrol)	%4	6,62±0,51
<i>L.lactis</i> (Kontrol)	-	7,17±0,6

Daha önce yaptığımız ön çalışmalarda başka bitki türlerinin farklı fraksiyonları içerisinde diklormetan fraksiyonunun nisin inhibisyon zonlarının oluşumunu artırdığı gözlenmiştir. Bu nedenle tez kapsamında yapılan çalışmalarda da anti-QS aktivite gösteren *Q. robur* L. ve *Q. frainetto* Ten. türlerine ait diklormetan fraksiyonları ekstraları tercih edilmiştir.

Bitki ekstraları için kullanılan ikinci kontrol grubunun (DMSO) oluşturduğu zon çapları $6,62 \pm 0,51$ mm iken %1'lik *Q. robur* L. ve *Q. frainetto* Ten. diklormetan ekstralarının kullanıldığı kültürlerin (Şekil 4.29A ve 4.30A; 4, 5 ve 6 No'lu zonlar) oluşturduğu zon çapları sırasıyla $5,4 \pm 0,11$ mm ve $6,25 \pm 0,35$ mm olarak bulunmuştur (Tablo 4.2). %2'lik *Q. frainetto* Ten. ekstresinin kullanıldığı kültürlerde (Şekil 4.30B; 4, 5 ve 6 No'lu zonlar) ise ortalama zon çapı $5,1 \pm 0,23$ mm olmuştur (Tablo 4.2). %2'lik *Q. robur* L. (Şekil 4.29B; 4,5 ve 6 No'lu zonlar), %4'lük *Q. robur* L. (Şekil 29C; 4,5 ve 6 No'lu zonlar) ve %4'lük *Q. frainetto* Ten. (Şekil 30C; 4, 5 ve 6 No'lu zonlar) ekstralarının kullanıldığı kültürler için zon çapı belirlenememiştir.

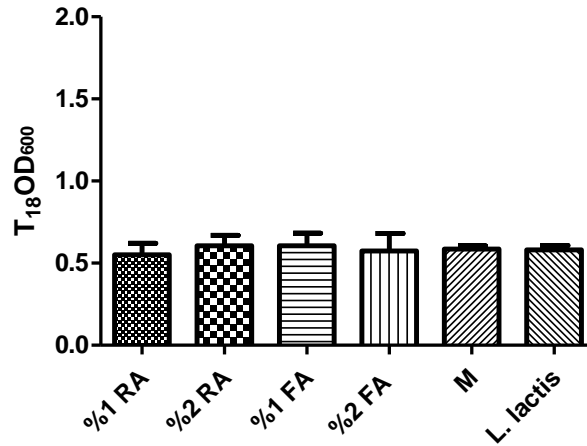


Şekil 4.29: Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirleme yöntemiyle %1 (A), %2 (B) ve %4 *Q. robur* L. diklormetan ekstresinin etkisi (C). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; D: DMSO (Çözücü) içeren kontrol grubu; 3: Ekstre (*Q. robur* L. diklormetan); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.

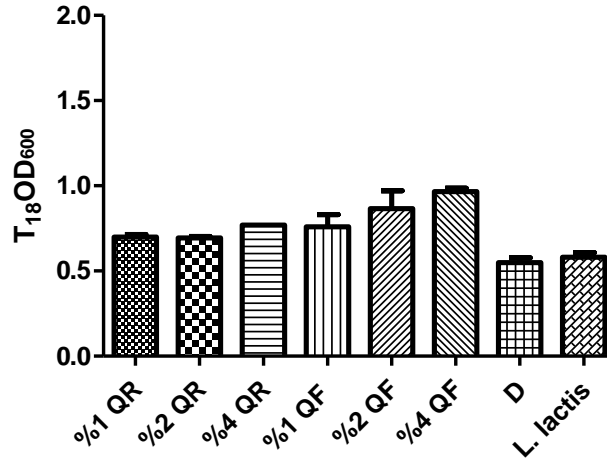


Şekil 4.30: Anti-QS aktivitenin belirlenmesinde *L.lactis* ve *M.luteus* ırklarının kullanıldığı biyodifüzyon belirlemesi yöntemine göre %1 (A), %2 (B) ve %4 *Q. frainetto* L. diklormetan ekstresinin etkisi (C). 1 ve 2: saf madde içermeyen kontrol grubu; D: DMSO (Çözücü) içeren kontrol grubu; 3: Ekstre (*Q. frainetto* L. diklormetan); 4, 5, 6: saf madde eklenen deney grupları.

Aynı zamanda *L. lactis* kültürlerine eklenen saf maddelerin, bitki ekstralarının ve bunların çözdürüldüğü %75 MeOH'un ve %4 DMSO'nun bakteri üremesi üzerinde baskılayıcı etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.31; M ve Şekil 4.32; D). Tam tersi yönde, kullanılan bitki ekstralarının *L.lactis* bakteri ırkının üremesini indükledikleri gözlenmiştir (Şekil 4.32).



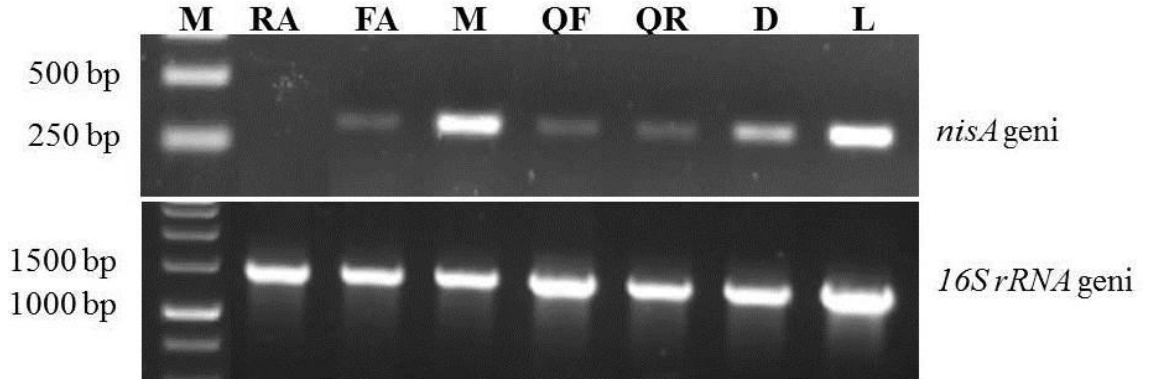
Şekil 4.31: Rosmarinik asit ve ferulik asit uygulanmış *L. lactis* bakteri kültürlerinin 18. saat OD₆₀₀ değerleri değerlerini gösteren grafikler. RA: Rosmarinik asit; FA: Ferulik asit; M: %75 Metanol.



Şekil 4.32: *Quercus frainetto* L. ve *Quercus robur* L. diklormetan fraksiyonları uygulanmış *L.lactis* bakteri kültürlerinin 18. saat OD₆₀₀ değerleri değerlerini gösteren grafikler. QF: *Quercus frainetto* L.; QR: *Quercus robur* L.; D: %4 DMSO.

4.4.1. Nisin İnhibisyonunun RT-PCR ile Analizi

L. lactis bakteri ırkında saf maddeler ve bitki ekstraktlarıyla gözlenen nisin inhibisyonunun gen anlatımı düzeyinde gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için RT-PCR yapılmıştır. Saf maddeler (%2 Rosmarinik asit ve ferulik asit) ve bitki ekstraktları (%4 *Q. robur* L. ve *Q. frainetto* Ten.) eklenen *L.lactis* kültürleri ile kontrol gruplarından (%75 MeOH, %4 DMSO ve *L.lactis*) izole edilen RNA'ların 260/280 değerleri 2,03-2,11 arasında olmuştur. RT-PCR sonucunda *nisA* geninin anlatımı %2'lik rosmarinik ve ferulik asit (RA ve FA) ile %4'lük bitki ekstresi (QF ve QR) içeren kültürlerde kontrol gruplarına göre (M, D ve L) düşük olmuştur (Şekil 4.33). Bunlar içerisinde özellikle rosmarinik asitin *nisA* geninin anlatımını çok belirgin şekilde baskıladığı gözlenmiştir (Şekil 4.33; RA). Ancak bitki ekstraktlarının çözündürüldüğü %4 DMSO'unda *nisA* geninin anlatımını baskıladığı belirlenmiştir (Şekil 4.33; D).



Şekil 4.33: Saf madde ve ekstrelerin uygulandığı kültürlerde nisin anlatım düzeyini gösteren RT-PCR sonuçları. M: DNA markır; RA: %2 Rosmarinik asit; FA: %2 Ferulik asit; M: Metanol; QF: %4 *Quercus frainetto* Ten. diklormetan ekstresi; QR: %4 *Quercus robur* L. diklormetan ekstresi; D: DMSO; içeren *L.lactis* kültürleri ve L: *L. lactis* kültürünü ifade etmektedir.

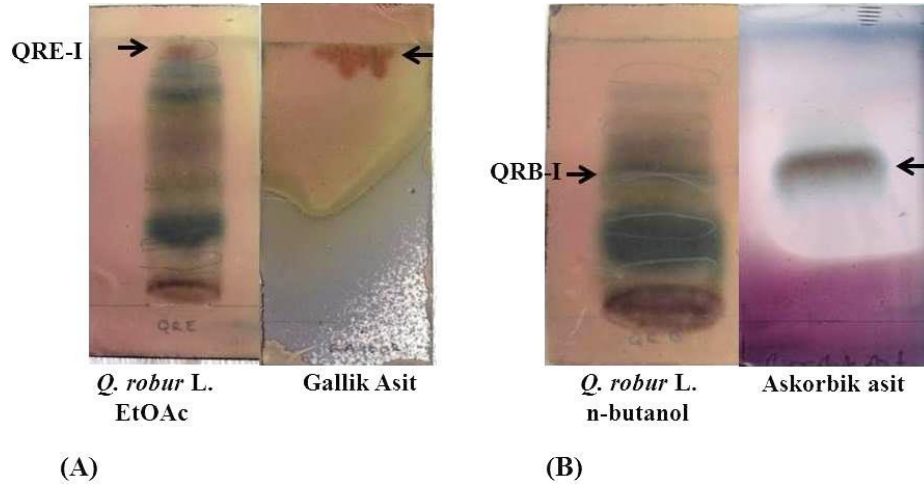
4.5. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

4.5.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Quercus robur L.'nin anti-QS aktivite gösteren EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarında etken madde veya madde grubunun belirlenmesi için İTK yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar EtOAc fraksiyonunda (QRE-I) ve n-butanol fraksiyonunda (QRB-I) birer bandın gallik asit ve askorbik asit varlığını düşündürmektedir (Şekil 4.34A ve B). Bu bantlara ve referans maddelere ait Rf değerleri Tablo 4. 3'de verilmiştir.

Tablo 4.3: *Quercus robur* L. EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarında belirlenen aktif bantların ve referans maddelerin Rf değerleri.

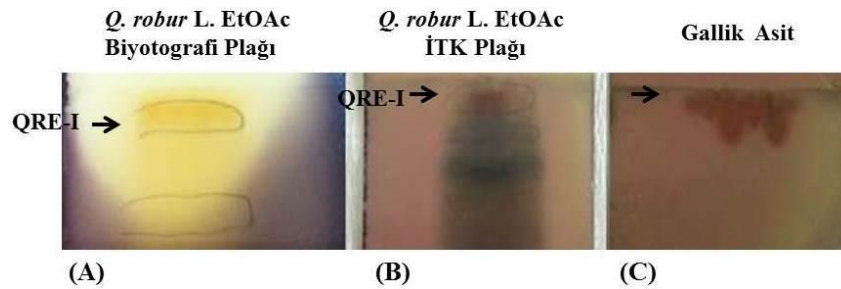
Madde İsmi	Rf Değeri
QRE-I	0,96
QRB-I	0,52
Gallik Asit	0,96
Askorbik asit	0,52



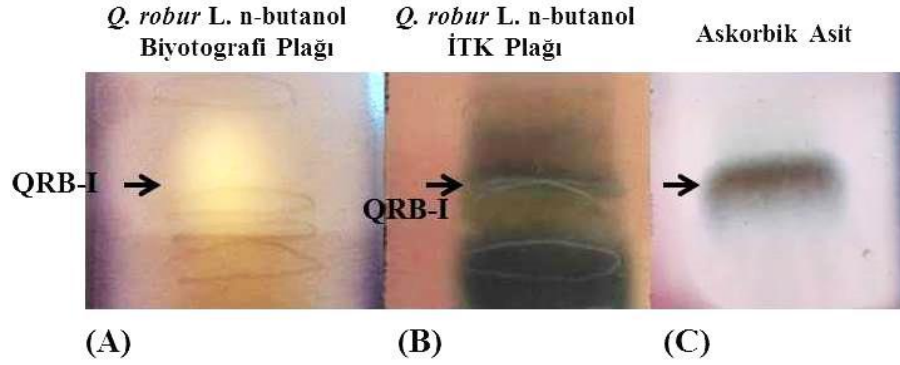
Şekil 4.34: *Quercus robur L.* EtOAc fraksiyonu ile referans madde olarak gallik asidin (A) ve *Quercus robur L.* n-butanol fraksiyonunun (B) İTK plakalarının görüntüsü. Oklar Rf değerleri aynı olan bantları ve referans maddeleri göstermektedir.

4.5.2. Biyootografik İTK

Anti-QS aktivite gösteren *Quercus robur L.* EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarında aktiviteden sorumlu madde veya madde gruplarının belirlenebilmesi için yapılan biyootografik İTK analizi sonucunda *Q. robur L.* EtOAc fraksiyonunda QRE-I bandı (Şekil 4.35A) ve *Q. robur L.* n-butanol fraksiyonunda QRB-I bandı etrafında inhibisyon zonunun oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.36A). Yapılan İTK analizlerinde QRE-I ile gallik asidin (Şekil 4.35B ve C) ve QRB-I ile askorbik asidin (Şekil 4.36B ve C) Rf değerlerinin aynı olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3).



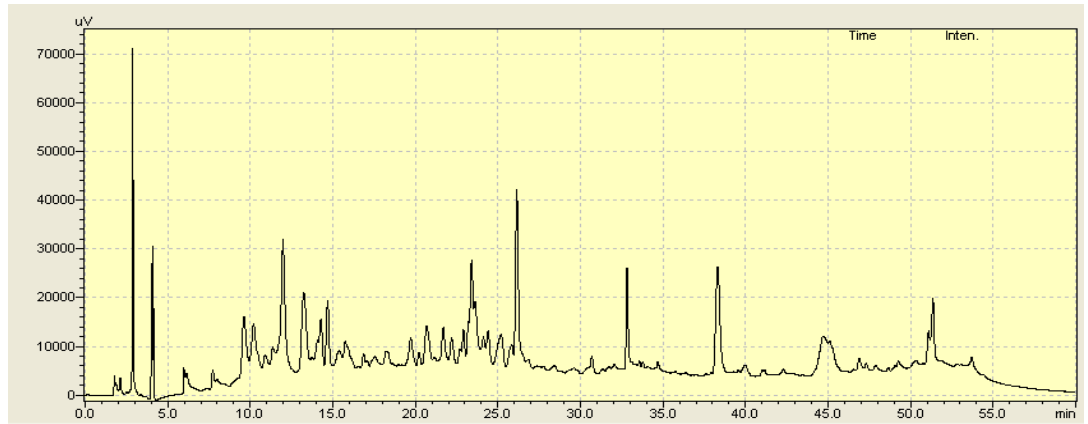
Şekil 4.35: *Quercus robur L.* EtOAc fraksiyonunun biyootografi analizinde ekstreye ait biyootografi plağı (A) ve İTK plağı (B) ile gallik asidin yürütüldüğü plakaya (C) ait görüntüler. Oklar Rf değerleri aynı olan bantları ile referans maddeleri ve inhibisyon zonunun oluştuğu bölgeyi göstermektedir.



Şekil 4.36: *Quercus robur* L. n-butanol fraksiyonunun biyotografi analizinde ekstreye ait biyotografi plağı (A) ve İTK plağı (B) ile gallik asidin yürütüldüğü plakaya (C) ait görüntüler. Oklar Rf değerleri aynı olan bantları ile referans maddeleri ve inhibisyon zonunun oluştuğu bölgeyi göstermektedir.

4.5.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Quercus robur L. EtOAc ve n-butanol fraksiyonlarının İTK analizinde elde edilen sonuçların doğrulanması için daha hassas bir yöntem olan HPLC analizi yapılmıştır (Şekil 4.37). Bu analizler sonucunda n-butanol fraksiyonunda askorbik asidin ve kullanılan diğer referans maddelerin varlığı saptanamamıştır.

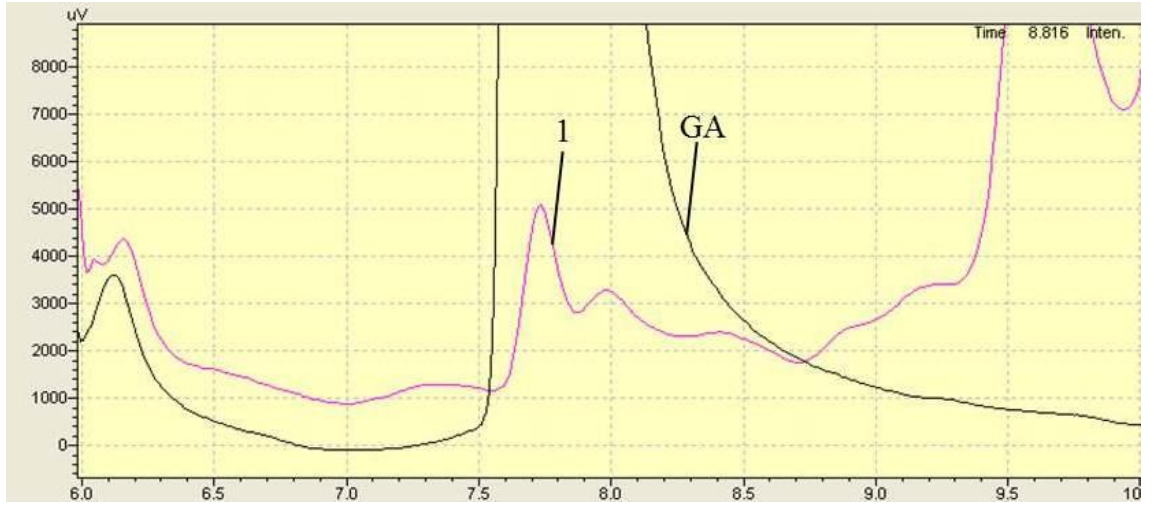


Şekil 4.37: *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonunun HPLC analizi.

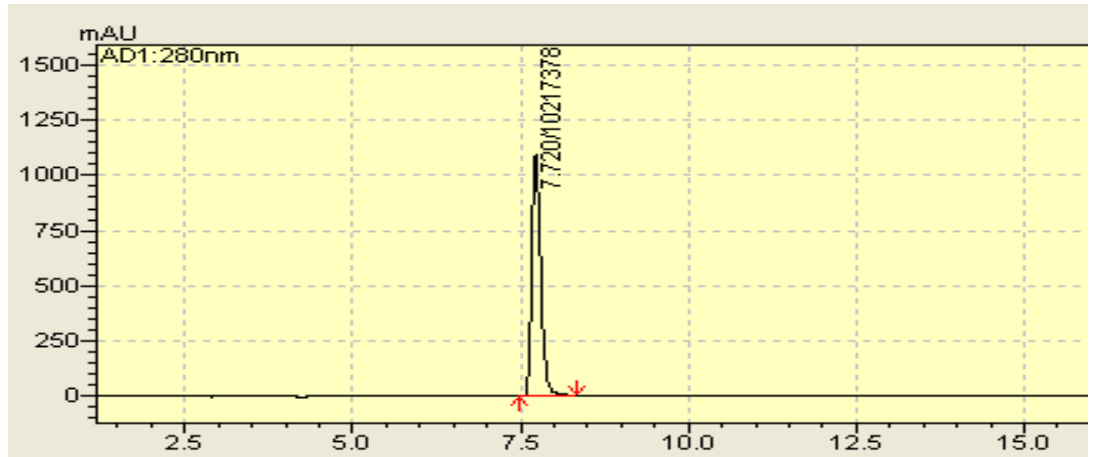
Quercus robur L. EtOAc fraksiyonunda ise sadece gallik asidin varlığı kalitatif olarak saptanmıştır (Şekil 4.38; 1 No'lu pik). Referans gallik asit (Şekil 4.39) ile 1 No'lu pik için alıkonma zamanları Tablo 4.4' de verilmiştir.

Tablo 4.4: Gallik asit için HPLC analizi.

Bileşik	Altkonma Zamanı (RT)
Gallik asit (GA)	7.720
1 No'lu pik (örnek)	7.729



Şekil 4.38: *Quercus robur* L. EtOAc fraksiyonu (pembe) ve gallik asit (siyah) HPLC analizlerinin birlikte gösterimi. 1: Fraksiyon içindeki gallik asit piki, GA: referans madde olarak gallik asit (GA) piki.



Şekil 4.39: Gallik asit için HPLC analizi ve altkonma zamanı.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakteriyel “quorum-sensing” hücreler arası sinyal iletimi aracılığıyla çeşitli fonksiyonların düzenlendiği önemli bir mekanizmadır. Bu mekanizmanın çeşitli yollarla kesintiye uğratılması özellikle istenmeyen fonksiyonların (patojenite vb. gibi) engellenmesi ile sonuçlanabilir (Rasmussen ve diğ., 2005). Ancak günümüzde bilinen anti-QS maddelerin tıbbi olarak kullanımı sınırlıdır ve bakteriyel hastalıkların tedavisi için yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine yönelik AR-GE çalışmalarına ihtiyaç vardır. Diğer yandan bitkisel kaynakların anti-QS aktivitelerinin araştırılması henüz yetersiz düzeydedir. Bu nedenle tez çalışmasında florası büyük çeşitlilik gösteren ülkemizde yetişen bazı tıbbi bitkilerin anti-QS potansiyelleri ilk kez araştırılmıştır.

Çalışma sırasında anti-QS aktivitenin saptanmasında kullanılan yöntemler ile ilgili bazı bulgular dikkat çekicidir. Ham ekstrelerde oransal olarak farklar saptanabilirken fraksiyonlardaki anti-QS etkinin istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu bulunmuştur. Ek olarak bazı bitki türlerinin ham ekstrelerinde saptanan anti-QS aktivitenin konsantrasyona bağlı olmadığı görülmüştür. Örn. Her iki *Centaurea* türünde de 1000 µg düzeyinde ekstre kullanıldığında aktivite yüksek bulunurken ekstre düzeyi 2000 µg çıkarıldığında aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca aktivitenin belirlenmesi için kullanılan iki yöntem kıyaslandığında sıvı inkübasyon yönteminin etkinliği disk difüzyon yöntemine göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun disklere yüklenen bitki ekstrelerindeki maddelerin agarda difüze olma yeteneklerinin farklılığından ileri gelebileceği düşünülmektedir (Pongtharangkul ve Demirci, 2004).

Bu tezde 26 bitki türü içerisinde 4 türde (*Quercus robur* L., *Quercus frainetto* Ten., *Epilobium angustifolium* L. ve *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides*) önemli oranlarda (%31-62) anti-QS etki gözlenmiş, bu sonucun bakteri üremesinin baskılanmasından kaynaklanmadığı tespit edilmiştir. Fraksiyonlama için ham ekstresi en yüksek aktiviteyi gösteren *Quercus robur* L. ve aynı aktiviteye sahip yakın bir tür olan *Q. frainetto* Ten. ekstreleri farklı polariteye sahip dört çözücü kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Bu fraksiyonlar CV026 biyomonitör ırk ile yapılan sıvı inkübasyon

yöntemi ile analiz edildiğinde, her iki bitkinin etil asetat ve n-butanol fraksiyonlarında anlamlı derecede anti-QS aktivite bulunurken, CV12472 ırkı ile yapılan analiz sonucunda ise sadece *Q. robur* L.’nin EtOAc fraksiyonunda aktivite belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı bir tür olan *Q. viriginiana*’nın su ve etanol ekstralarının (Adonizio ve diğ., 2006) ve *Acacia nilotica* L.’nin yeşil tohum zarflarının EtOAc fraksiyonunun anti-QS aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Singh ve diğ., 2009a).

Saplı meşe olarak bilinen *Quercus robur* L., Avrupa, Kuzey Afrika, Anadolu ve Avrasya bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir. Türkiye’de Trakya, Marmara, Batı ve Orta Anadolu bölgelerinde bulunan bu türün yaprakları, kabukları ve mazıları halk arasında yara tedavisinde ve antiseptik olarak kullanılmaktadır. *Q. robur* L.’nin toprak üstü kısımlarının hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ekstralarının DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme etkisine göre orta derecede antioksidan ve *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis* türlerine karşı orta derecede antibakteriyel aktivitesinin olduğu bilinmektedir (Uddin ve Rauf, 2012).

Q. robur L. EtOAc fraksiyonundaki anti-QS aktivitenin yapılan biyootografi ve İTK analizlerine göre gallik asitten kaynaklandığı düşünülmektedir. HPLC sonuçları fraksiyonda az miktarda da olsa gallik asit varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.38). Gallik asit içerdiği bilinen *Acacia nilotica* ve *Moringa oleifera* ekstralarında *C. violaceum* sistemi ile yapılan analizler sonucunda benzer şekilde anti-QS aktivitenin belirlenmesi (Singh ve diğ., 2009a, b) ve gallik asidin dört patojen bakteride biyofilm oluşumu ve aktivitesini indirgediğini gösteren çalışmalar (Borges ve diğ., 2012) elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Yine yapılan başka bir çalışmada *Cuminum cyminum*’un anti-QS aktivitesinin metanol ekstresinde az miktarda bulunan metil öjenolden ileri geldiği bildirilmektedir (Packiavathy ve diğ., 2012). Bu çalışmada *Cuminum cyminum*’un ekstresindeki bileşenler için moleküllerin bağlanma afinitelerini gösteren ve “docking score” olarak ifade edilen değerleri belirlenmiş ve buna göre sinyal molekülünün “docking score” değerine yakın bulunan metil öjenol için anti-QS aktivite belirlenmiştir. *P.aeruginosa*’da LasR reseptör bölgesine bağlanma yeteneği yüksek veya yakın olan ligandların doğal ligand olan 3-okso-C12-HSL molekülü ile yer değiştirebileceği ve böylece QS’e dayalı faktörlerin sentezini indirgediği gösterilmiştir

(Zhang ve diğ., 2002b; Yang ve diğ., 2009). Elma kabuğu ekstresinin QS inhibisyon aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada ise bu aktivitenin ekstredeki moleküller arasında var olan ortak veya sinerjik bir etkiyle ortaya çıktığını destekler sonuçlar alınmıştır (Fratianni ve diğ., 2011). Yine hastalıkların önlenmesinde yiyeceklerde doğal olarak bulunan düşük konsantrasyonlu biyoaktif bileşiklerin, yüksek konsantrasyonda bulunan tek bir molekülden daha etkili olabileceği ifade edilmektedir (Boyer ve Liu, 2004; Fini ve diğ., 2007; D'Angelo ve diğ., 2007; Mari ve diğ., 2010). Bu sonuçlara göre herhangi bir ekstrenin sahip olduğu anti-QS aktivitenin ekstre içerisinde bulunan majör bileşen varlığından çok ilgili moleküle bağlanma yeteneği yüksek olan (sinyal moleküle daha benzer) bileşenlerden kaynaklandığı söylenebilir. Bu nedenle *Q. robur* L. EtOAc fraksiyonundaki anti-QS aktivitenin gallik asitten ileri geldiği düşünülmeyle beraber ekstre içerisindeki diğer maddeler ve bunların anti-QS potansiyelleri de belirlenmelidir. Yine yakın bir tür olan *Q. frainetto* Ten.'nin EtOAc fraksiyonu için de aynı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Tez çalışmasında anti-QS aktivite saptanan diğer türler *Epilobium angustifolium* L. ve *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides*'dur. Küpe çiçeği ve pire otu olarak bilinen bu bitkiler çokyıllık otsu bitkilerdir ve kuzey yarımkürede yaygın olarak yetişirler. Geleneksel anlamda antiseptik, yara iyileştirici, kabızlık ve mide rahatsızlıkları tedavisinde kullanılan *Epilobium angustifolium* L. (Baytop, 1999, p.372) aynı zamanda günümüzde iyi huylu prostat büyümesinin tedavisine yardımcı olarak da kullanılmaktadır. *E. angustifolium* L'nin toprak üstü kısımlarının MRSA gibi önemli klinik izolatlarda dahil olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyel (Kosalec ve diğ., 2013), antioksidan (Stajner ve diğ., 2007) ve prostatik epitel hücre hattında anti-proliferatif etkilerinin (Vitalone ve diğ., 2001) olduğu gösterilmiştir. *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides*'in ise uçucu yağlarının antimikrobiyel etkileri bilinmektedir (Baser ve diğ., 2001). Bu bitkilerin metanolik ekstrelerindeki QS inhibisyon potansiyeli ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle ilerideki çalışmalarda bu bitkilerin fraksiyonlarında anti-QS aktivite çalışmalarının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Günümüzde anti-QS araştırmalarda kullanılan iki biyomonitör ırk (*C. violaceum* ve *E.coli* QSI-1) Gram (-)'dir (McLean ve diğ., 2004; Bjarnsholt ve diğ., 2010). Bu tez

çalışmasında Gram (+) bakterilerde de anti-QS aktivitenin belirlenmesi için yeni bir model sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada *Staphylococcus spp.*'nin üst sınırlarının *L. lactis*'de nisin üretimine etkisi incelenmiştir (Avcı, 2008). Bu kapsamda yapılan çalışmalarda özellikle %2'lik rosmarinik asit ve ferulik asit ile %4'lük *Q. robur* L. ve *Q. frainetto* Ten. diklormetan ekstreleriyle nisin sentezinin baskılandığı indikatör ırk olan *M. luteus* yardımıyla ve gen anlatımı düzeyinde RT-PCR ile başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Bu sayede anti-QS analizler için Gram (+) *L. lactis* ve *M. luteus* bakterilerinin kullanıldığı agar biyodifüzyon belirlemesinin etkili bir yöntem olarak kullanılabilirliği ilk kez gösterilmiştir. Bu çalışmada oluşturulan deneysel prosedür ile Gram (+) bakterilerde anti-QS maddeler incelenebilecektir.

Antibiyotik direnci yüksek olan MRSA ve *P. aeruginosa* gibi önemli patojen ve fırsatçı bakteriler de dahil olmak üzere bakteriyel kökenli hastalıkların tedavisinde antibiyotik direncinin önemli bir sorun olduğu ve mevcut antibiyotiklerin yetersiz kaldığı günümüzde bu konu ile ilgili yapılacak tüm çalışmalar ve yeni tüm yaklaşımlar büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle son yıllarda QS mekanizması ve özellikle bu mekanizmanın doğal kaynaklar ile inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekici olmaktadır.

Yapılan bazı çalışmalarda patojen bakterilerde QS mekanizmasını inhibe edebilen maddeler bulunmuş, ancak bu maddelerin insan ve diğer memeliler üzerinde toksik etkileri sebebiyle kullanımları mümkün görülmemiştir. Bu maddeler içinde en iyi bilinen örnek furanon türevleridir. Halojenli furanonlar sahip oldukları halojen grupları nedeniyle toksik etki gösterirler. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada bazı sentetik furanonların genotoksik etki göstermeyen konsantrasyonları incelenmiştir (Lönn-Stensrud ve diğ., 2009). Ancak furanonların ökaryotik hücre canlılığı ve toksisitesi ile genotoksik etkilerine dair çalışma sayısı oldukça azdır. Bundan dolayı QS inhibisyonu için doğal kaynak olarak zengin kimyasal içeriğe sahip ve geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılan bitkiler diğer adaylara göre daha uygundur. Anlaşılacağı üzere anti-QS etkiye sahip daha fazla bitkinin ve bunlardaki etken maddelerin araştırılması bakteriyel hastalıkların tedavisine katkı sağlayabilir. Bu açıdan tez çalışmasında daha önce anti-QS aktivitesi bilinmeyen 4 bitki türünün bulunması tezin önemini artırmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A., Valverde, S., 1993, Anti-inflammatory activity of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum*, *Journal of Natural Product*, 56 (7), 1164-1167.
- Adonizio, A.L., Downum, K., Bennett, B.C., Mathee, K., 2006, Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida, *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 427-435.
- Akroum, S., Bendjeddou, D., Sata, D. and Lalaoui, K., 2009, Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*, *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4 (2), 93-96.
- Al-Bayati, F., 2008, Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 403-406.
- Al-Hussaini, R., Mahasneh, A.M., 2009, Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts, *Molecules*, 14, 3425-3435.
- Avcı, M.K., 2008, *Stahylococcus epidermidis* ve *Stahylococcus aureus*'a ait Quorum sensing sinyal moleküllerinin *Lactococcus lactis*'in nisin üretimi üzerine etkisi (quorum sensing cross-talk analizi), Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bassler, B.L. and Miller, M.B., 2006, Quorum sensing, *Prokaryotes*, 2, 336-353.
- Baser, K.H.C., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., 1992, Composition of the essential oil of *Origanum sipyleum* of Turkish origin, *Journal of Essential Oil Research*, 4 (2), 139-142.
- Baser, K.H.C., Demirci, B., Tabanca, N., Ozek, T., Goren, N., 2001, Composition of essential oils of *Tanacetum armenum* (DC.) Schultzbip., *T. balsamita* L., *T. chiliophyllum* (Fisch&Mey.) Schultzbip var. *chiliophyllum* and *T. haradjani* (Rech.Fil) Grierson and the enantiomeric distribution of camphorand carvone, *Flavour and Fragrance Journal*, 16 (3), 195-200.
- Battinelli, L., Tita, B., Evandri, M.G., Mazzanti, G., 2001, Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. Extracts, *Il Farmaco*, 56, 345-348.
- Baytop, T., 1999, *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün*, İlaveli 2.baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 975-420-021-1
- Berahou, A., Auhmani, A., N. Fdil N., Benharref, A., Jana, M., Gadhi, C.A., 2007, Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 426-429.
- Bianco, A., Guiso, M., Martino, M. Nicoletti, M., Serafini, M., Tomassini, L., Mossa, L., Poli, F., 1996, Iridoids from endemic Sardinian *Linaria* species. *Phytochemistry*, 42, 89-91.

- Bjarnsholt, T., Gennip, M., Jakobsen, T.H., Christensen, L.D., Jensen, P., Givskov, M., 2010, *In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect, *Nature Protocols*, 5, 282-93.
- Blosser, R.S. and Gray, K.M., 2000, Extraxction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for *N*- acyl homoserine lactone autoinducer, *Journal of Microbiological Methods*, 40, 47-55.
- Borchardt, S.A., Allain, E.J., Michels, J.J., Stearns, G.W., Kelly, R.F., McCoy, W.F., 2001, Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3174–3179.
- Borchardt, J.R., Wyse, D.L., Sheaffer, C.C., Kauppi, K.L, Fulcher, R.G., Ehlke, N.J., Biesboer, D.D., Bey, R.F., 2008, Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (5), 98-110.
- Borges, A., Saavedra, M.J. and Simões, M., 2012, The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria, *Biofouling*, 28 (7), 755-767.
- Bosgelmez-Tinaz, G., Ulusoy, S., Ugur, A., Ceylan, O., 2007, Inhibition of QS-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*, *Current Microbiology*, 55,114-118.
- Boyer, J. and Liu, R.H. 2004, Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3, 1-15.
- Castang, S., Chantegrel, B., Deshayes, C., Dolmazon, R., Gouet, P., Haser, R., Reverchon, S., Nasser, W., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Doutheau, A., 2004, N–Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 5145–5149.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., and Fink, G.R., 2004, Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5048–5052.
- Chen, C.N., Chen, C.J., Liao, C.T., Lee, C.Y., 2009, A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acylhomoserine lactone acylase with quorum–quenching activity, *BMC Microbiology*, 9, 89.
- Chenia, H.Y., 2013, Anti-quorum sensing potential of crude *Kigelia africana* fruit extracts, *Sensors*, 13, 2802-2817.
- Chhabra, S.R., Stead, P., Bainton, N.J., Salmond, G.P., Stewart, G.S., Williams, P., Bycroft, B.W., 1993, Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of *N*-(3- oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 46, 441–454.
- Choo, J.H., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., 2006, Inhibition of bacterial QS by vanilla extract, *Letters in Appied Microbiology*, 42, 637-641.
- Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J., Greenberg, E.P., 2004, Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3587–3590.

- Çepni, E. ve Gürel, F., 2011, Bitkilerden elde edilen anti-quorum sensing bileşikleri ve yeni ilaç geliştirmedeki potansiyelleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 41 (4), 131-138.
- Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A.P., Albring, D., Nör, C., Sarmiento, L., Lamb, L., Hass, M., von Poser, G., Schapoval, E.E., 2003, Antimicrobial activity of some *Hypericum* species, *Phytomedicine*, 10, 511–516.
- D'Angelo, S., Cimmino, A., Raimo, M., Salvatore, A., Zappia, V., Galletti, P., 2007, Effect of reddening ripening on the antioxidant activity of polyphenol extracts from Cv. 'Annurca' apple fruits, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 9977-9985.
- Davis P.H., 1965-1988, *The Flora of Turkey and the east aegean islands*, University Press, Edinburgh,
- Décosterd, L., Stoeckli-Evan, H., Msonthi, J.D., Hostettmann, K., 1986, A new antifungal chromene and a related dichromene from *Hypericum revolutum*, *Planta Medica*, 55, 429.
- Décosterd, L.A., Hoffmann, E., Kyburz, R., Bray, D., Hostettmann, K., 1991, A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and *in vitro* antimalarial activity, *Planta Medica*, 57, 548–551.
- de Kievit, T.R., Iglewski, B.H., 2000, Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships, *Infection and Immunity*, 68, 4839-4849.
- Delalande, L., Faure, D., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo–Picard, C., Elasri, M., Carlier, A., Berruyer, R., Petit, A., Williams, P., Dessaux, Y., 2005, N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum–sensing regulation, exhibits plant-dependen stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings, *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 13–20.
- de Ruyter, P.G., Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., van Alen-Boerrigter, I., de Vos, W.M. 1996, Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*, *The Journal of Bacteriology*, 178, 3434–9.
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H., 2000, AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3526–3531.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., Zhang, L.H., 2001, Quenching quorum sensing–dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase, *Nature*, 411, 813–817.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Zhang, L.H., 2007, Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362, 1201–1211.
- Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S., LaDu, B.N., 2000, Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein–associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33435–33442.

- Dunny, G.M., Leonard, B.A., 1997, Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 51,527–64.
- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S. A. B., Christiansen, G., Chhabra, S. R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., Givskov, M., 1996, Involvement of n-acyl-l-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behavior of *Serratia liquefaciens*, *Molecular Microbiology*, 20, 127–136.
- Eberhard, A.,1972, Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis, *Journal of Bacteriology*, 109, 1101-1105.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., Oppenheimer, N. J., 1981, Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri*, *Biochemistry*, 20, 2444–2449.
- Egland, K.A., Greenberg, E. P., 1999, Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Elements of the *luxI* promoter, *Molecular Microbiology*, 31, 1197-1204.
- Eijsink,V.G., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F., 2002, Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 639–54.
- El-Lakany, A.M., Abdel-Kader, M.S., Hammouda, H.M., Ghazy, N.M., Mahmoud, Z.F., 1997, A new flavone glycoside with antimicrobial activity from *Carduus pycnocephalus* L., *Pharmazie*, 52 (1), 78,79.
- Engebrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M., 1983, Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*, *Cell*, 32, 773–781.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., Entian, K.D.,1994, Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 814–25.
- Ekim, T.,2009, *Türkiye'nin nadir endemikleri*, Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, İstanbul, ISBN: 9789944886482
- Erdemoğlu, N., Bingöl, F. ve Sener, B.,1998, *Linaria* türlerinin kimyasal bileşimi ve biyolojik etkileri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11, 49-66.
- Fini, L., Selgrad, M., Fogliano, V., Graziani, G., Romano, M., Hotchkiss, E., Daoud, Y.A., de Vol, E.B., Boland, C .R., Ricciardiello, L., 2007, Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells, *Journal of Nutrition*, 137, 2622-2628.
- Flythe, M. and Kagan, I., 2010, Antimicrobial effect of red clover (*Trifolium pratense*) phenolic extract on the ruminal hyper ammonia-producing bacterium, *Clostridium sticklandii*. *Current Microbiology*,61 (2), 125-131.
- Fратиани, F., Coppola, R. and Nazzaro, F., 2011, Phenolic composition, antimicrobial and antiquorum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar Annurca, *Journal of Medicinal Food*, 14 (9), 957-963.

- Frezza, M., Soulere, L., Deshayes, C., Reverchon, S., Guiliani, N., Jerez, C., Queneau, Y., Doutheau, A., 2008, Synthetic homoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 3550–3556.
- Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J.B., Bauer, W.D., 2003, Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing, *The American Phytopathological Society*, 16 (9), 827–834.
- Givskov, M., Eberl, L., Molin, S., 1997, Control of exoenzyme production, motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*, *FEMS Microbiology Letters* 148, 115–122.
- Gönüz, A., Dülger, B. and Kargıoğlu, M., 2005, The morphological, anatomical properties and antimicrobial activity of endemic *Linaria corifolia* Desf. (Scrophulariaceae) in Turkey, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (2), 220-226.
- Gross, E. and Morell, J.L., 1971, Structure of nisin, *Journal of American Chemical Society*, 93 (18), 4634-4635.
- Güllüce, M., Adıgüzel, A., Öğütçü, H., Şengül, M., Karaman, İ., Şahin, F., 2004, Antimicrobial effects of *Quercus ilex* L. extract. *Phytotherapy Research*, 18(3), 208 – 211.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C., 2000, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2)*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 11, 71-72, ISBN: 9780748614097
- Güven, K., Karabacak, E., Çelik, S. ve Uysal, İ., 2009, Antimicrobial activity of *Centaurea derderiifolia*, *Stachys aleurites* and *Anthemis aciphylla*, *Journal of Applied Biological Science*, 3 (2), 154-159.
- Hastings, J.W., 2004, Bacterial quorum-sensing signals are inactivated by mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3993–3994.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2002, Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, *Microbiology*, 148, 87–102.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manfield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N., Givskov, M., 2003, Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors, *EMBO J*, 22, 3803–3815.
- Hideyuki, I., Koji, Y., Tae-Hoon, K., Khennouf, S., Gharzouli, K., Yoshida, T., 2002. Dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber*, *Journal of Natural Product*, 65, 339–345.
- Hiermann, A., Reidlinger, M., Juan, H., Sametz, W., 1991, Isolation of the antiphlogistic principle from *Epilobium angustifolium*, *Planta Medica*, 54, 357–360.

- Hoang, T.T. and Schweizer, H.P., 1999, Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis, *Journal of Bacteriology*, 181, 5489–5497.
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W., 2001, Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol, *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7), 2982-2992.
- Hornby, J.M., Jacobitz-Kizzier, S.M., McNeel, D.J., Jensen, E.C., Treves, D.S., Nickerson, K.W., 2004, Inoculum size effect in dimorphic fungi: extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3), 1356-1359.
- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., Leadbetter, J.R., 2003, Utilization of acylhomoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5941–5949.
- Ichimiya, T., Takeoka, K., Hiramatsu, K., Hirai, K., Yamasaki, T., Nasu, M., 1996, The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa in vitro*, *Chemotherapy*, 42, 186–191.
- Ishida, T., Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Kato, J., Ohtake, H., 2007, Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by Nacyl cyclopentylamides, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3183–3188.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Kashihara, M., Takagi, S., 1986, Sarothralen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*, *Planta Medica*, 52, 288–290.
- Ishiguro, K., Nagata, S., Fukumoto, H., Yamaki, M., Isoi, K., Oyama, Y., 1993, Isopentenylated flavonol from *Hypericum japonicum*, *Phytochemistry*, 32, 1583–1585.
- Ishiguro, K., Yakamoto, R., Oku, H., 1999, Patulosides A and B, novel xanthenes glycosides from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*, *Journal of Natural Products*, 62, 113–117.
- Jacobson, J.M., Feinman, L., Liebes, L., Ostrow, N., Koslowski, V. ve diğ., 2001, Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 517–524.
- Jaramillo-Colorado, B., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E.E., Wagner-Döbler, I., Kunze, B., 2012, Anti-quorum sensing activity of essential oils from colombian plants. *National Product Research*, 26, 1075–1086.
- Jayasuriya, H. and McChesney, J.D., 1989, Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*, *Journal of Natural Products*, 52, 325–331.
- Jayasuriya, H., Clark, A.M., McChesney, J.D., 1991, New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*, *Journal of Natural Products*, 54, 1314–1320.
- Johnson, T., 1999, *CRC Ethnobotany Desk Reference*. CRC Press LLC Blvd., N.W., Boca Raton, Florida, ISBN: 978-0849311871

- Jordon-Thaden, I. E. and Louda, S. M., 1993, Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds, *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 1353–1396.
- Kapadnis, P.B., Hall, E., Ramstedt, M., Galloway, W.R.J.D., Welch, M., Spring, D.R., 2009, Towards quorum–quenching catalytic antibodies, *Chemical Communication*, 5, 538–540.
- Karaalp, C., Yurtman, A. N. and Karabay Yavaşoğlu, Ü., 2009, Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea L.* flower head extracts, *Pharmaceutical Biology*, 47(1), 86-91.
- Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Mee, J.M., Altobell, L.J., Kujawa, D.P., Jeffries, E, Clapham, B., Meijler, M.M., Janda, K.D., 2006, Antibody interference with N–acyl homoserine lactone–mediated bacterial quorum sensing, *Journal of American Chemical Society*, 128, 2802–2803.
- Keleş, O., Ak, S., Bakirel, T. ve Alpınar, K., 2001, Türkiye’de yetişen bazı bitkilerin antibakteriyel etkisinin incelenmesi, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25, 559-565.
- Khan, M.S.A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F.M., Ahmad, I., 2009, Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil, *Letters in Applied Microbiology*, 49, 354–360.
- Khurram, M., 2010, Studies on the isolation and characterization of secondary metabolites from *Dodonaea viscosa* and *Quercus baloot* and their potential as antibacterial agents, Thesis (PhD), Quaid-I-Azam University, Islamabad.
- Kim, J.J., Ghimire, B.K., Shin, H.C., Lee, K.J., Song, K.S., Chung, Y.S., Yoon, T.S., Lee, Y.J., Kim., E.H., Chung., I.M., 2012, Comparison of phenolic compounds content in deciduous *Quercus* species, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (39), 5228-5239.
- Kiran, M.D., Adikesavan, N.V., Cirioni, O., Giacometti, A., Silvestri, C., Scalise, G., Ghiselli, R., Saba, V., Orlando, F., Shoham, M., Balaban N., 2008, Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening, *Molecular Pharmacology*, 73, 1578–1586.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 1997, Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria, *Molecular Microbiology*, 24, 895–904.
- Kleerebezem, M., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., 1999, *The lantibiotics nisin and subtilin act as extracellular regulators of their own biosynthesis*. In: Dunny GM, Winans SC, editors. Cell–cell signaling in bacteria. ASM Press, Washington, D.C., p. 159–74, ISBN: 1555811493, 9781555811495.
- Kleerebezem, M. and Quadri, L.E., 2001, Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*, 22, 1579–96.
- Kleerebezem, M., 2004, Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis, *Peptides*, 25, 1405–1414.

- Klein, C., Kaletta, C., Entian, K.D., 1993, Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 296–303.
- Kosalec, I., Kopjar, N., Kremer, D., 2013, Antimicrobial activity of willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves and flowers, *Current Drug Target*, 14 (9), 986-991.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., de Ruyter, P.G., Luesink, E.J., de Vos, W.M., 1995, Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 70, 27299–27304.
- Kügler, S., Young, B., Miller, V.L., Goldman, W.E., 2000, Monitoring phase-specific gene expression in *Histoplasma capsulatum* with telomeric GFP fusion plasmids, *Cell Microbiology*, 2 (6), 537-547.
- Kürşat, M. ve Erecevit, P., 2009, The Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of Some *Lamiaceae* Members Collected from Turkey. *Turkish Journal of Science & Technology*, 4 (1), 81- 85.
- Leadbetter, J.R., Greenberg, E.P., 2000, Metabolism of acylhomoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*, *Journal of Bacteriology*, 182, 6921–6926.
- Lönn-Stensrud, J., Landin, M.A., Benneche, T., Petersen, F.C., Scheie, A.A., 2009, Furanones, potential agents for preventing *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 309–316.
- Manefield, M., Nys, R.D., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S., 1999, Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, 145, 283-291.
- Manefield, M., Rasmussen, T.B., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2002, Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 148, 1119-1127.
- Mari, A., Tedesco, I., Nappo, A., Russo, G.L., Malorni, A., Carbone, V., 2010, Phenolic compound characterization and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar, *Food Chemistry*, 123, 157-164.
- Martinelli, D., Grossmann, G., Sequin, U., Brandl, H., Bachofen, R., 2004, Effects of natural and chemically synthesized furanones on QS in *Chromobacterium violaceum*, *BMC Microbiology*, 4, 25.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., Bauer, W.D., 2003, Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 1444–1449.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Steward, G.S., Williams, P., 1997, Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones, *Microbiology*, 143, 3703-3711.
- McLean, R.J., Pierson, L.S., Fuqua, C., 2004, A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists, *Journal of Microbiological Methods*, 58, 351-60.

- Meng, Z., Zhou, Y., Lu, J., Sugahara, K., Xu, S., Kodama, H., 2001, Effect of five flavonoid compounds isolated from *Quercus dentata* Thunb on superoxide generation in human neutrophils and phosphorylation of neutrophil proteins, *Clinica Chimica Acta*, 306, 97–102.
- Mojab, F., Poursaeed, M., Mehrgan, H. and Pakdaman, S., 2008, Antibacterial activity of *Thymus Daenensis* methanolic extract. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21 (3), 210-213.
- Molinari, G., Guzmán, C., Pesce, A., Shchito, G., 1993, Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by subinhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 31, 681–688.
- Moreno, L., Bello, R., Primo-Yufera, E., Esplugues, J., 2002, Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh, *Phytotherapy Research*, 16, 10–13.
- Mulders, J. W. M., Ingrid J. B., Rollema, H.S., Siezen, R.J., de Vos W.M., 1991, Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant, *The FEBS Journal*, 201 (3), 581-584.
- Musthafa, K. S., Ravi, A. V., Annapoorani, A., Packiavathy, I.S.V., Pandian, S. K., 2010, Evaluation of Anti-Quorum-Sensing Activity of Edible Plants and Fruits through Inhibition of the N-Acyl-Homoserine Lactone System in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Chemotherapy*, 56, 333–339.
- Nakayama, J., Uemura, Y., Nishiguchi, K., Yoshimura, N., Igarashi, Y., Sonomoto, K., 2009, Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quorumones in Gram-positive bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2), 580–586.
- Nalca, Y., Jansch, L, Bredenbruch, F., Geffers, R., Buer, J., Haussler, S., 2006, Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1680–1688.
- Nealson, K. H., Platt, T., Hastings, J. W., 1970, Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system, *Journal of Bacteriology*, 104, 313-322.
- Olivero, V. J. T., Pájaro C. N.P., Stashenko, E., 2011, Anti-quorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus *Piper. Vitae*, *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 18 (1), 77-82.
- Öztürk, S. and Ercisli, S., 2005, Broad-spectrum antibacterial properties of *Thymus fallax*, *Pharmaceutical Biology*, 43 (7), 609–613.
- Packiavathy, I.A.S.V., Agilandeswari, P., Rajendran, R.B., Pandian, S.K., Ravi A.V., 2011, Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*, *Archives of Medical Research*, 42, 658-68.
- Packiavathy, I.A.S.V., Agilandeswari, P., Rajendran, R.B., Musthafa, K.S., Pandian, S.K., Ravi A.V., 2012, Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum*

- and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens, *Food Research International*, 45, 85-92.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E. & Greenberg, E. P., 1999, Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 4360–4365.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski B. H., Greenberg, E. P., 1994, Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 197–201.
- Pehlivan-Karakaş, F., Yıldırım, A., Türker, A., 2012, Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities, *Turkish Journal of Biology*, 36, 641-652.
- Persson, T., Hansen, T.H., Rasmussen, T.B., Skindersoe, G.E., Givskov, M., Nielsen, K.J., 2005, Rational design and synthesis of new quorum sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 253–262.
- Piper, K. R., Beck von Bodman, S., Farrand, S. K., 1993, Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction, *Nature*, 362, 448–450.
- Pongtharangkul, T. and Demirci, A., 2004, Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 268–272.
- Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S., Schaefer, A.L., 1997, A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Journal of Bacteriology*, 179, 7530–7537.
- Qazi, S., Middleton, B., Muharram, S.H., Cockayne, A., Hill, P., O’Shea, P., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., 2006. *N*-Acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*, *Infection and Immunity*, 74, 910–919.
- Radulović, N., Stankov-Jovanović. V., Stojanović, G., Šmelcerović, A., Spittelerr, M., Asakawa, Y., 2007, Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans, *Food Chemistry*, 103, 15–21.
- Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M.E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Köte, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M., 2005, Screening for quorum sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector, *Journal of Bacteriology*, 187, 1799–1814.
- Rasmussen, T.B. and Givskov, M., 2006, Quorum-sensing inhibitors: a bargain of effects, *Microbiology*, 152, 895–904.
- Rasooli, I., and Rezaei, M. B., 2002, Bioactivity and chemical properties of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha longifolia* (L.) Huds, *Journal of Essential Oil Research*, 14 (2),141–146.

- Ren, D., Sims, J., Wood, T.K., 2001, Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone, *Environmental Microbiology*, 3, 731–736.
- Ren, D., Sims, J., Wood, T.K., 2002, Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 293–299.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Ye, R.W., Thomas, S.M., Wood, T.K., 2004, Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 630–642.
- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M.A.C., Stoeckli-Evans, H., Hostettmann, K., 1995, Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*, *Phytochemistry*, 40, 1447–1152.
- Safary, A., Motamedi, H., Maleki, S., Seyyednejad, S.M., 2009, A preliminary study on the antibacterial activity of *Quercus brantii* against bacterial pathogens, particularly enteric pathogens. *International Journal of Botany*, 5 (2), 176-180.
- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H., 2004, Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey, *Food Control*, 15, 549–557.
- Sarabhai, S., Sharma, P., Capalash, N., 2013, Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. downregulate the expression of quorum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence, *PLOS ONE*, 8 (1), 1-11.
- Schauder, S. and Bassler, B.L., 2001, The languages of bacteria, *Genes and Development*, 12, 1468-1480.
- Sezik, E. and Yesilada. E. ,1999, Uçucu Yağ Taşıyan Türk Halk İlaçları (Turkish folk medicine containing volatile oils). In: Kırimer N, Mat A eds. *Essential Oils – In Honour of Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer On his 50th Birthday*. *Anadolu University Press, Eskisehir*. pp. 98–131.
- Sezik, E., Yesilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., 2001, Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia, *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 95–115.
- Schinella, G.R., Giner, R.M., Recio, M.C., Mordujovich de Buschiazzo, P., Ríos, J.L., Máñez, S., 1998, Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50 (9), 1069-74.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, Jr. J.E., Rinehart, K.L. and Farrand, S.K., 1997, Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 6036-41.
- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Sarma, B.K., Singh, H.B., 2009a, Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L., *Food and Chemical Toxicology*, 47, 778–786.

- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., Singh, H. B., 2009b, Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (6), 1109-1116.
- Smith, K.M., Bu, Y., Suga, H., 2003, Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs, *Chemical Biology*, 10, 81–89.
- Sofer, D., Gilboa–Garber, N., Beiz, A., Garber, N.C., 1999, ‘Subinhibitory’ erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors, *Chemotherapy*, 45, 335–341.
- Sökmen, A., Vardar-Ünlü, G., Darıcı, N., Şahin, S., 2000, Antimicrobial activities of methanolic extracts of various plants growing in the Sivas district, *Turkish Journal of Infection*, 14 (2), 253-256.
- Sökmen, A., Sökmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Unlü, M., Akpulat, H.A., 2004a, The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae), *Phytotherapy Research*, 18, 451-456.
- Sökmen, A., Güllüce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sökmen, M., Sahin, F., 2004b, The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*, *Food Control*, 15(8), 627-634.
- Stajner, D., Popović, B.M., Boza, P., 2007, Evaluation of willowherb’s (*Epilobium angustifolium* L.) antioxidant and radical scavenging capacities, *Phytotherapy Research*, 21 (12), 1242-1245.
- Szabó, M. Á., Varga, G.Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., Molnár J., 2010, Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils, *Phytotherapy Research*, 24, 782–786.
- Taganna, J.C. and Rivera, W.L., 2008, Epigallocatechin gallate from *Camellia sinensis* L. (Kuntze) is a potential quorum sensing inhibitor in *Chromobacterium violaceum*, *Science Diliman*, 20 (1). 24-30.
- Tateda, K., Comte, R., Pechere, J.C., Köhler, T., Yamaguchi, K., van Delden, C., 2001, Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:1930–1933.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., Sökmen, A., 2004. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1132–1137.
- Teplitski, M., Robinson, J.B. and Bauer W.D., 2000, Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(6), 637-648.
- Teplitski, M., Chen, H., Rajamani, S., Gao, M., Merighi, M., Sayre, R.T., Robinson, J.B., Rolfe, B.G., Bauer, W.D., 2004, *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic

- bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria, *Plant Physiology*, 134, 137–146.
- Tokur, S., 1988, Bazı *Hypericum* Türlerinin Ekolojisi Üzerinde Araştırmalar, *Doğa Türk Botanik Dergisi*, 12 (3), 323-331.
- Trifunovic, S., Vais, V., Macura, S., Juranic, N., 1998, Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*, *Phytochemistry*, 49, 1305–1310.
- Truchado, P., Gil-Izquierdo, A., Tomás-Barberán, F., Allende, A., 2009, Inhibition by chestnut honey of N-Acyl-L-homoserine lactones and biofilm formation in *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11186–11193.
- Tuzlacı, E., 2006, *Şifa Niyetine Türkiye'nin Bitkisel Halk İlaçları*, Alfa Yayınları, İstanbul, ISBN:975297712X
- Türker, H., Birinci-Yıldırım, A., Pehlivan-Karakaş, F., Köylüoğlu, H., 2009, Antibacterial activities of extracts from some Turkish endemic plants on common fish pathogens. *Turkish Journal of Biology*, 33, 73-78.
- Uddin, G. and Rauf, A., 2012, Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of aerial parts of *Quercus robur* L., *Middle-East Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1), 01-04.
- Ulubelen, A., Sönmez, U., Topcu, G., Bozok-Johansson, C., 1996, An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*, *Phytochemistry*, 42 (1), 145-147.
- Uroz, S., Heinon, J., 2008, Degradation of n-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root associated fungi, *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 271–278.
- Uroz, S., Dessaux, Y., Oger, P., 2009, Quorum sensing and quorum quenching: The Yin and Yang of bacterial communication, *ChemBioChem*, 10, 205–216.
- Uva, E., 2011, *Boron Plays No Boring Role in Quorum Sensing*, http://www.science20.com/chemical_education/blog/boron_plays_no_boring_role_quorum_sensing-76384, [Ziyaret tarihi: 24 Şubat 2014].
- Uysal, I., 2003. *Stachys thirkei* C. Koch türünün morfolojisi, anatomisi ve ekolojisi üzerinde araştırmalar. *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 10 (2), 129-141.
- van der Meer, J.R., Polman, J., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., 1993, Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis, *Journal of Bacteriology*, 175, 2578– 88.
- Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson S., 2010, Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (1), 243–253.

- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., Patil, B.S., 2011, Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator LuxO, *Microbiology*, 157, 99–110.
- Vitalone, A., Bordi, F., Baldazzi, C., Mazzanti, G., Saso, L., Tita, B., 2001, Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by *Epilobium angustifolium* L., *Il Farmaco*, 56 (5-7), 483-489.
- Wang, W., Morohoshi, T., Ikeda, T., Chen, L., 2008, Inhibition of Lux quorum-sensing system by synthetic *N*-acyl-L-homoserine lactone analogous, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40, 1023–1028.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C., 2001, Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 365-404.
- Williams, C.A., Harborne, J.B., Geiger, H. and Hoult, J.R.S., 1999, The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *Tanacetum vulgare* and their anti-inflammatory properties, *Phytochemistry*, 51, 417–423.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W., Tagg, J.R., 2006, Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1148–1156.
- Wolf, C.E. and Gibbons, W.R., 1996. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin, *Journal of Applied Bacteriology*, 80 (4), 453-457.
- Xavier, K.B. and Bassler B.L., 2003, LuxS quorum sensing: more than just a numbers game, *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 191-197.
- Yang, L., Rybtke, M. T., Jakobsen, T. H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Nielsen, T. T., 2009, Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2432–2443.
- Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H., Williams, P., 2002, *N*-Acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Infection and Immunity*, 70, 5635–5646.
- Yeşilada, E., Gürbüz, İ. ve Shibata, H., 1999, Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 289–293.
- Yousefzadi, M., Ebrahimi, S.N., Sonboli, A., Miraghasi, F., Ghiasi, S., Arman, M., Mosaffa, N., 2009, Cytotoxicity, antimicrobial activity and composition of essential oil from *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamita*, *Natural Product Communication*, 4 (1), 119-122.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2003, Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61–14 isolated from a river in Japan, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 1616–1619.

- Zhang, H.B., Wang, L.H., Zhang, L.H., 2002a, Genetic control of quorum- sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 4638–4643.
- Zhang, L., Murphy, P. J., Kerr, A., Tate, M. E., 1993, *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by n-acyl-l-homoserine lactones, *Nature*, 362, 446–448.
- Zhang, L.H, 2003, Quorum quenching and proactive host defense. *Trends in Plant Science*, 8, 238 -244.
- Zhang, R. G., Pappas, T., Brace, J. L., Miller, P. C., Oulmassov, T., Molyneaux, J.M., Anderson, J.C., Bashkin, J. K., Winans, S. C., Joachimiak, A., et al., 2002b, Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA, *Nature*, 417, 971–974.
- Zhentian, L., Jervis, J., Helm, R.F., 1999. C-Glycosidic ellagitannins from white oak-heartwood and callus tissues. *Phytochemistry*, 51, 751–756.
- Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y., Yu, W., Gong, Q., 2013, Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations, *Biotechnology Letters*, 35, 631–637.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Fatma Elif ÇEPNİ
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	İstanbul- 8.11.1978
Telefon	0212 631 62 02
E-mail	elifcepni@gmail.com
Web adres	www.ebittech. com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2014
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2007
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi/ Biyoloji Bölümü	2000
Lise	Fatih Kız Lisesi	1994

Makaleler / Bildiriler

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayınlar
<p>Çepni, E., Tunalı, B., Gürel, F., 2012, Genetic diversity and mating types of <i>Fusarium culmorum</i> and <i>Fusarium graminearum</i> isolates in Turkish crop breeding areas, <i>Journal of Basic Microbiology</i>, 52,1-9.</p>

Gürel, F., Albayrak, G., Diken, O., **Çepni, E.**, Tunali, B., 2010, Use of Rep-PCR for genetic diversity analyses in *Fusarium culmorum*, *Journal of Phytopathology*, 92 (3), 781-787.

SCI Expanded Kapsamındaki Dergilerde Yayınlar

Çepni, E., Gürel, F., 2012, Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in identification of closely related isolates, *Genetics and Molecular Biology*, 35 (3), 650-656.

Diğer Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlar

Çepni, E., Gürel, F., 2011, Bitkilerden Elde Edilen Anti-Quorum sensing Bileşikleri ve Yeni İlaç Geliştirmedeki Potansiyelleri, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 41 (4), 131-138.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sözlü Sunulan ve Tam Metni Konferans Bildiri Kitabında Yayınlanan Bildiriler

Yörük, E., **Çepni, E.**, Çakır, Ö., Albayrak, G., Arı, Ş., 2009, Arpa (*Hordeum vulgare* L.)'nın Farklı Çeşit Eksplantlarında *in vitro* rejenerasyon kapasitesi, 16. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Aralık 2009, Antalya, S-BHB9, 106-109.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Özeti Konferans Bildiri Kitabında Yayınlanan Bildiriler

Şerbetçi, T., **Çepni, E.**, 2012, Türkiye'de doğal olarak yetişen bazı *Stachys cretica* alttürlerinin anti-QS aktiviteleri yönünden araştırılması, 20. *Bitkisel İlaç Hammadeleri Toplantısı (BİHAT)*, Ekim 2012, Antalya, P-26, 55.

Çepni, E., Şerbetçi, T., Gürel, F., 2009, Anti-Quorum Sensing Etkili Bileşiklerin Moleküler Biyosensörlerle Belirlenmesi, 16. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Aralık 2009, Antalya, P-D2, 29.

Çepni, E., Gürel, F., 2006, Bitkisel Patojen Bakterilerin Tiplendirilmesinde REP-PCR'ın Kullanımı, 18. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Haziran 2006, Kuşadası, PS-374, 220-221.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Özeti Konferans Bildiri Kitabında Yayınlanan Bildiriler

Pekmez, M., **Çepni, F.E.**, Candar-Çakır, B., Çakır, Ö., 2013, Antibacterial and antioxidant activities of *Physalis peruviana*, 5th *Central European Congress of Life Sciences*, 8th -11th October 2013, Krakow, Poland, P5.3, 38.

Bal, A., **Çepni, F.E.**, Çakır, Ö., Acar, I., Güçlü, G., 2013, Hydrogel-Silver Nanocomposites for Antibacterial Application, 8th *International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials*, 3rd -5th July 2013, Aix-en- Provence, France.