



TÜBİTAK – BİDEB

**LİSE ÖĞRETMENLERİ-FİZİK, KİMYA, BİYOLOJİ, MATEMATİK- PROJE
DANIŞMANLIĞI EĞİTİMİ ÇALIŞTAYI**

(LİSE-3 [ÇALIŞTAY 2013])

BİYOLOJİ PROJE RAPORU

GRUP: İKİLİ SARMAL

PROJE ADI

**BAZI BİTKİLERİN ÖZÜTLERİNİN, DNA YA BAĞLAMA ORANLARININ
BELİRLENMESİ**

PROJE EKİBİ

Sevilay KOCABAŞ

Pınar ŞAHİN AVCI

PROJE DANIŞMANLARI

Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ

Doç. Dr. Kemal Melih TAŞKIN

ÇANAKKALE

02 – 10 ŞUBAT 2013

İçindekiler Tablosu

PROJENİN AMACI	3
GİRİŞ.....	3
MATERYAL YÖNTEM.....	4
BULGULAR	6
SONUÇ VE TARTIŞMA	8
TEŞEKKÜR	9
KAYNAKÇA	9
ÖZGEÇMİŞ.....	10

PROJENİN AMACI

Bazı tıbbi bitkilerin özütlerindeki moleküllerin, DNA'ya bağlanma oranlarının spektrofotometrik absorpsiyon yöntemi ile belirlenmesi.

1.GİRİŞ

Kalıtıl materyal olarak DNA canlı hücrelerde yapısal proteinlerle beraber kompleksler oluşturur. Histon olarak bilinen bu proteinler DNA'yı kromatin adlı kompakt yapı içinde organize ederler. Histonlar bazik amino asitlerce zengin 5 farklı tipden oluşurken prokaryotlarda ise çeşitli başka protein türleri DNA'ya bağlanır.^{[1][2]} Histon proteinleri çeşitli şekillerde bir araya gelerek, nükleozom adlı disk şeklinde bir kompleks oluştururlar. Nükleozomlara çift iplikli DNA molekülleri sarılarak etrafında iki kere döner. Histonların bazik kalıntıları ile DNA'nın şeker-fosfat omurgasındaki asidik fosfatlar arasındaki iyonik bağlar, non-spesifik bir etkileşim oluşturur, baz dizisinden büyük ölçüde bağımsızdırlar.^[3] Günümüzde histonların yapısında bulunan bazik amino asitlerin kimyasal değişimlere uğradığı bilinmektedir. Bu değişimler arasında histonların metilasyon, fosforilasyon, ve asetilasyon sayılabilir.^[4] Bu kimyasal değişimler, DNA'nın histonlarla etkileşimini etkiler, bunun sonucunda DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin erişimi ve transkripsiyon hızı değişir.^[5]

Histon proteinleri dışında DNA dizilerine bağlanacak şekilde evrimleşmiş diğer proteinlerde transkripsiyon faktörleridir. Bu proteinlerin görevi transkripsiyonu düzenlemektir. Her transkripsiyon faktörü belli bir DNA diziler kümesine bağlanır ve bu dizilere yakın protörleri olan genlerin transkripsiyonu etkinleştirir veya engeller. Transkripsiyon faktörleri bunu iki farklı yoldan gerçekleştirir. Birincisi, transkripsiyondan sorumlu olan RNA polimeraz bağlanırlar, bunu ya doğrudan ya da aracı proteinlerle yaparlar, bunun sonucunda polimeraz promotöre yakın bir konuma yerleştirilmiş olur ve transkripsiyona başlaması mümkün hale gelir.^[6] Bir diğer yolda ise, transkripsiyon faktörleri promotörde yer alan histonları kimyasal değişime uğratan enzimlere bağlanırlar; bunun sonucunda polimerazın DNA'ya erişimi değişir.^[7]

Bu DNA bağlanma dizileri bir canlının genomunun her tarafında bulunabileceği için, bir transkripsiyon faktörünün etkinliğinde meydana gelen değişiklikler binlerce gene etki edebilir.^[8] Dolayısıyla bu proteinler çoklukla, çevresel değişiklikler, hücresel başkalaşım ve gelişimi kontrol eden süreçlerle ilişkili olan sinyal iletim süreçlerinin hedefidirler. Bu transkripsiyon faktörlerinin DNA ile etkileşimindeki spesifisite, proteinin DNA bazlarının kenarları ile yaptığı temaslardan kaynaklanmaktadır, bu sayede bu proteinler DNA'nın dizisini "okurlar". Bazlarla olan bu etkileşimlerin çoğu, bu bazlara kolaylıkla erişilebilen büyük olukta meydana gelir.^[9]

Bunların yanı sıra bazı kimyasal maddeler de DNA zincirleri ile etkileşime girer. Bu maddelerin DNA zincirlerinde kırıklara yol açtığı ya da bağlanma yolu ile hücrelere zarar verdiği bilinmektedir. Bu şekilde aktivite gösteren kimyasal maddelerin yeni ilaç tasarımları için çok önemli olduğu bildirilmiştir.^[10]

Bu nedenle, bu çalışmada çeşitli bitki özütlerinin DNA etkileşimlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda, bazı bitki özütlerindeki moleküllerin DNA' ya bağlanması, DNA' nın spektrofotometrik özelliklerini değiştirmesinden yola çıkarak absorbansta artış ya da azalışın belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Materyaller

Proje sürecinde kullanılan materyal ve kimyasallar aşağıda verilmiştir:

- ✓ Zerdaçal
- ✓ Biberiye
- ✓ Sinameki
- ✓ Zeytin yaprağı
- ✓ Fesleğen
- ✓ Üzüm çekirdeği
- ✓ Ependorf tüpleri
- ✓ Porselen havan
- ✓ Etanol(%98'lik)
- ✓ Saf su
- ✓ Etüv
- ✓ U.v spektrofotometri
- ✓ Vorteks cihazı
- ✓ İnsan DNA sı

2.2. Bitki özütlerinin hazırlanması

- 1) 100 mg. olacak şekilde kurutulmuş olarak; zerdeçal, sinameki, fesleğen yaprakları ile taze olarak da; zeytin yaprağı, biberiye yaprağı ve üzüm çekirdeği tartıldı.
- 2) Tartılan bitki dokuları porselen havanda sıvı azot içerisinde ezildi.
- 3) Ezilen bitki dokuları ependorf tüplerine alındı.
- 4) I. Grup ependorf tüplerin üzerine saf su, II. Grup ependorf tüplerin üzerine ise %98 lik etanol ilave edildi.
- 5) Hazırlanan bitki ekstraktları 24 sa. 37°C sıcaklıkta etüvde bekletildi.

2.3. Deney yapılışı

- 1) Etüvden çıkarılan özütler, santrüfuj makinasında 14,1rcf de 5 dk. Santrüfuj edildi.
- 2) Santrüfujden çıkarılan ependorf tüplerindeki çökeltiden mikropipetle özütleri ayırarak yeni ependorf tüplerine aktarıldı.
- 3) Her bitki için aşağıda verilen şekilde tüpler hazırlandı.

1,5ml. Saf su + 10µl.distile suda hazırlanmış bitki özütü

1,5ml. Saf su + 10µl.saf alkolde hazırlanmış bitki özütü

1,5ml. Saf su + 10µl.distile suda hazırlanmış bitki özütü + 1 µl. DNA(insan DNA sı)

1,5ml. Saf su + 10µl.saf alkolde hazırlanmış bitki özütü + 1 µl. DNA(insan DNA sı)
- 4) Hazırlanan örneklerin hepsi spektrofotometride 260nm dalga boyundaki ışık absorbans değerleri ölçülerek tabloya aktarıldı.

2.4. Spektral yöntemler

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm. Dalga boyundaki ışığı max. emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür. Buna göre DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm. Dalga boylarında elde edilecek değerlerden belirlenebilir. 1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml. tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml. ve oligonükleotidler için ise 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir.

Örneğin, izole edilen DNA çift iplikli ise, miktarının belirlenmesi için aşağıdaki formülden yararlanılır.

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm.deki OD} \times \text{sulandırım oranı} \times \text{katsayı (50)}$$

3. BULGULAR

3.1. Bitki özütlerine ait spektrofotometrik absorbens değerleri

Bu çalışmada, bitki özütleri iki farklı yöntemle elde edilmiştir. Bunlardan ilkinde bitki dokuları sıvı azot ile parçalanmış ve 1ml. steril distile suda çözülmüştür. Diğerinde ise çözücü olarak aynı miktarda saf etanol kullanılmıştır. Daha sonra örnekler 1 gece 37°C etüvde bekletilmiştir. Ertesi gün ölçümler 260nm. Dalga boyunda spektrofotometride yapılmıştır. Buna göre, bitki özütlerinin Absorbans değerleri 0.063-0.280 arasında değiştiği gözlenmiştir. Deney gruplarında ise DNA içeren tüplere bitki özütleri eklenmiş ve ölçümler tekrarlanmıştır.

Bu sonuçlar, özütler içinde DNA varlığından dolayı güvenilir bulunmamıştır. (Tablo 1).

	Distile Suda hazırlanmış Özüt	Alkolde hazırlanmış Özüt	Distile Suda hazırlanmış Özüt+DNA	Alkolde hazırlanmış Özüt+DNA
<i>Olea europaea</i> (zeytin)	0,164	0,182	0,280	0,163
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Biberiye)	0,141	0,172	0,063	0,117
<i>Cinnamomum aromaticum</i> (sinameki)	0,196	0,237	0,130	0,170
<i>Vitis</i> (üzüm)	0,146	0,145	0,164	0,219
<i>Ocimum basilicum</i> (fesleğen)	0,182	0,167	0,175	0,193
<i>Curcuma longa</i> (zerdeçal)	0,164	0,160	0,161	0,185

Tablo 1. Bitki özütlerine ait spektrofotometrik absorbans değerleri

3.2. İzole edilen DNA miktarının belirlenmesi

Örneğin, izole edilen DNA çift iplikli ise, miktarının belirlenmesi için aşağıdaki formülden yararlanılır.

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm.deki OD} \times \text{sulandırım oranı} \times \text{katsayı (50)}$$

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = 0,162 \times 1 \times 50$$

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}) = 8,1 \mu\text{g/ml.}$$

3.3. Bitki özütlerinden nükleik asitlerin (DNA-RNA) uzaklaştırılması

Bitki özütlerinden nükleik asitlerin uzaklaştırılması için tüplere 20µl. Sodyum asetat ve 500µl. soğuk etil alkol ilave edilerek 14000rpm. de 5 dk. Santrüföje edilmiştir. Santrüföj sonrasında nükleik asitlerin tüpün dibinde çökelti halinde olduğu görülmüştür.

Daha sonra ölçümler 260nm. Dalga boyunda spektrofotometride yapılmıştır. Buna göre, bitki özütlerinin Absorbans değerleri 0.012-0.145 ⁰A arasında değiştiği gözlenmiştir. Deney gruplarında ise öncelikle tüplere 1 ul. DNA eklenmiş ve absorbans değeri ölçülmüştür. Daha sonra aynı tüplere özüt eklenmiş ve ölçümler tekrarlanmıştır (Tablo 2). Buna göre zeytin özütü eklenmeden 0,018 ölçülen DNA absorbans değeri özüt eklendikten sonra 0,024 olarak değişmiştir. Biberiye özütü eklenmeden önce 0,121 ölçülen DNA absorbans değeri özüt eklendikten sonra 0,133 olarak değişmiştir. Sinameki özütü eklenmeden önce 0,140 ölçülen DNA absorbans değeri özüt eklendikten sonra 0,141 olarak değişmiştir. Üzüm özütü eklenmeden önce 0,145 ölçülen DNA absorbans değeri özüt eklendikten sonra 0,125 olarak değişmiştir. Fesleğen özütü eklenmeden önce 0,012 ölçülen DNA absorbans değeri özüt eklendikten sonra 0,031 olarak değişmiştir. Zerdaçal özütü eklenmeden önce 0,103 ölçülen DNA absorbans değeri özüt eklendikten sonra 0,106 olarak değişmiştir.

Sinamaki ve zerdaçal için alkol ile hazırlanan özütlerde ölçümler tekrarlanmış ve distile su ile hazırlanan özütlerle yaklaşık olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir.

	Genomik DNA ölçümleri	Özüt eklenmiş genomik DNA ölçümleri	Alkol ekstrası
<i>Olea europaea</i> (zeytin)	0,018	0,024	
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Biberiye)	0,121	0,133	
<i>Cinnamomum aromaticum</i> (sinameki)	0,140	0,141	0,142
<i>Vitis</i> (üzüm)	0,145	0,125	
<i>Ocimum basilicum</i> (fesleğen)	0,012	0,031	
<i>Curcuma longa</i> (zerdeçal)	0,103	0,106	0,130

Tablo 2. Nükleik asitleri uzaklaştırılmış bitki özütlerine ait spektrofotometrik absorbands değerleri

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bazı kimyasal maddeler de DNA zincirleri ile etkileşime girer. Bu maddelerin DNA zincirlerinde kırıklara yol açtığı ya da bağlanma yolu ile hücrelere zarar verdiği bilinmektedir. ^[10] Bu çalışmada bitki özütlerindeki kimyasal maddeler DNA ile etkileşime girerek spektrofotometrik absorbands değerlerini değiştirdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, sinameki ve zerdeçal bitkilerinin özütleri içinde yer alan kimyasal maddeler DNA absorbands değerlerinin değiştirmemiştir. Buna karşın en yüksek değişim fesleğen bitkisi daha sonra sırasıyla üzüm, biberiye ve zeytinde gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda fesleğen, üzüm, biberiye ve zeytin özütlerinde yer alan madde ya da maddelerin daha ayrıntılı yöntemlerle analiz edilerek DNA bağlanma potansiyellerinin belirlenmesi gerektiğini ortaya çıkarmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalıştay koordinatörü: Prof. Dr. Mehmet AY' a, sunuları ve çalışmalarlarıyla bizleri aydınlatan danışmanlarımız Prof. Dr. Gürcan GÜLERYÜZ ve Doç. Dr. Kemal Melih Taşkın'a tüm çalıştay ekibine ve 18 Mart üniversitesi' ne teşekkür ederiz...

KAYNAKLAR

[1]. Sandman K, Pereira S, Reeve J (1998). "Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome". *Cell Mol Life Sci* **54** (12): 1350–64. Doi:10.1007/s000180050259. PMID 9893710.

[2]. Dame RT (2005). "The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin". *Mol. Microbiol.* **56** (4): 858–70. Doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04598.x. PMID 15853876.

[3]. Luger K, Mäder A, Richmond R, Sargent D, Richmond T (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution". *Nature* **389** (6648): 251–60. Doi:10.1038/38444. PMID 9305837.

[4]. Jenuwein T, Allis C (2001). "Translating the histone code". *Science* **293** (5532): 1074–80. Doi:10.1126/science.1063127. PMID 11498575.

[5]. Ito T. "Nucleosome assembly and remodelling". *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 1–22. PMID 12596902.

[6]. Spiegelman B, Heinrich R (2004). "Biological control through regulated transcriptional coactivators". *Cell* **119** (2): 157–67. Doi:10.1016/j.cell.2004.09.037. PMID 15479634.

[7]. Li Z, Van Calcar S, Qu C, Cavenee W, Zhang M, Ren B (2003). "A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells".

[8]. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (14): 8164–9. Doi:10.1073/pnas.1332764100. PMID 12808131.

[Http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?Tool=pubmed&pubmedid=12808131](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?Tool=pubmed&pubmedid=12808131).

[9]. Pabo C, Sauer R (1984). "Protein-DNA recognition". *Annu Rev Biochem* **53**: 293–321. Doi:10.1146/annurev.bi.53.070184.001453. PMID 6236744.

[10]. Mikkelsen, S.R. *Electroanalysis*, 1996,1,8.

GRUP ÜYELERİNİN ÖZGEÇMİŞLERİ

Sevilay KOCABAŞ (Selçuk Üniversitesi)

1971 yılında Emirdağ'da doğdu. İlköğretimini Emek İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra liseyi Eskişehir Atatürk Lisesi 'nde okudu ve üniversite eğitimini Konya Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı.

Pınar ŞAHİN AVCI (19 Mayıs Üniversitesi)

1978 yılında Fatsa'da doğdu. Liseyi Samsun 19 Mayıs Lisesi'nde bitirdi.1998 yılında Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünden mezun oldu.