



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

***Astragalus chrysochlorus*'da Selenyum Birikimine İlişkin  
Moleküler Çalışmalar**

**Özgür ÇAKIR  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

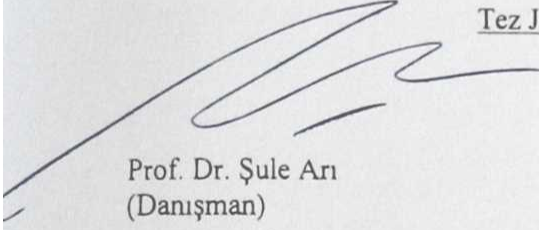
**Danışman  
Prof.Dr. Şule ARI**

**Haziran, 2011**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 07/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

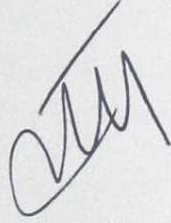
Tez Jürisi



Prof. Dr. Şule Arı  
(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Avni Kuru  
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı  
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Hande Çağlayan  
Boğaziçi Üniversitesi



Doç. Dr. Tijen Talas Oğraş  
Tübitak-MAM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 1509 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması ile, ilk kez araştırma grubumuz tarafından kültüre alınmış Türkiye endemiği *Astragalus chrysochlorus*'un sekonder metabolizmasında genomik düzeydeki çalışmalara ek olarak, selenyum metabolizmasına ait antikanser metabolit üretimi ile ilişkili SMT (selenosistein metiltransferaz) geninin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu, on yılı aşkın süredir çalışılan bitkinin biyoteknolojik olarak değerlendirilmesi potansiyelini yükseltmiştir.

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca her konuda desteğini hissettiğim, bilimsel gelişimime önemli katkılar sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şule ARI'ya her türlü destek ve yardımdan dolayı şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında bilgi, deneyim ve önerileri ile büyük katkılar sağlayan Sayın Prof. Dr. Beyazıt ÇIRAKOĞLU'na ve Sayın Prof. Dr. Güler TEMİZKAN'a,

Çalışmalarında her türlü yardım ve destekleri ile katkıda bulunan başta Sayın Prof. Dr. Avni KURU olmak üzere Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, Sabancı Üniversitesi laboratuvarlarını kullanmama izin veren ve selenyum metabolizması ile ilgili bilgilerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. İsmail ÇAKMAK'a, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya, Dr. Murat PEKMEZ'e, Dr. Evren ÖNAY UÇAR'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımı şekillendirirken aldığım kararlarda beni destekleyen sevgili Ailem'e sevgi ve saygılarımı sunarım.

**İstanbul, 2011**

**Özgür ÇAKIR**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. SELENYUM.....	3
2.2. SELENYUM ve SAĞLIK.....	4
2.3. BİTKİLER ve SELENYUM.....	14
2.4. FİTOREMEDİYASYON ve SELENYUM.....	24
2.5. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ ve GEN İZOLASYONU.....	27
2.5.1. RACE (Rapid Amplified cDNA Ends).....	29
2.6. <i>ASTRAGALUS</i> .....	30
2.6.1. <i>Astragalus chrysochlorus</i> .....	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1. BİTKİ MATERYALİ ve DOKU KÜLTÜRÜ.....	33
3.1.1. BESİYERİ ve KÜLTÜRLEME KOŞULLARI.....	33
3.1.2. TOHURLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ.....	34
3.2. RNA İZOLASYONU.....	35
3.2.1. HOMOJENİZASYON.....	35
3.2.2. FAZ AYRIMI.....	35
3.2.3. RNA'NİN ÇÖKTÜRÜLMESİ.....	36
3.2.4. RNA MİKTARININ ve SAFLIĞININ BELİRLENMESİ.....	36
3.3. AGARoz-FORMALDEHİT JEL ELEKTROFOREZİ.....	37
3.4. SMT GENİ ÇOĞALTIMI İÇİN cDNA SENTEZİ.....	38
3.4.1. 5' RACE PZR için cDNA Sentezi.....	40
3.4.1.1. 5' RACE PZR için Sentez Edilen cDNA'lara PoliA Kuyruğu Eklenmesi.....	41
3.4.2. 3' RACE ve Diğer Polimeraz Zincir Reaksiyonları için cDNA Sentezi.....	42
3.5. SMT GENİ SENTEZİ.....	42
3.5.1. RACE Polimeraz Zincir Reaksiyonları.....	43
3.5.2. Sele nosistein Metiltransferaz Geninin 5' Ucuna Yönelik Gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	45

3.5.3. SMT Geninin PZR ile Çoğaltımı.....	45
3.6. AGAR OZJEL ELEKTROFOREZİ.....	45
3.7. PZR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI.....	46
3.8. SELENOSİSTEİN METİL TRANSFERAZ (SMT) GENİNE AİT POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) ÜRÜNLERİNİN DİZİ VE HOMOLOJİ ANALİZLERİ.....	47
3.9. SMT GENİNİN FARKLI SODYUM SELENAT KONSANTRASYONLARINDA ANLATIMININ ANALİZİ.....	48
3.10. cDNA'NIN pET100/D-TOPO® VEKTÖRÜNE KLONLANMASI.....	48
3.10.1. cDNA'nın pET100/D-TOPO® Vektörü ile Ligasyonu.....	49
3.10.2. One Shot® TOP10 Electrocomp™ <i>E. coli</i> Hücrelerinin Elektroporasyon Yoluyla pET100/D-AcSMT ile Transformasyonu.....	51
3.10.3. Transformasyonun Koloni PZR ile Kontrolü.....	52
3.10.4. pET100/D-AcSMT Plazmit İzolasyonu.....	53
3.10.5. İzole Edilen pET100/D-AcSMT Plazmitlerinin PZR ve Dizileme ile Kontrolü.....	54
3.11. BL21 STAR™ (DE3) <i>E. coli</i> HÜCRELERİNİN PET100/D- AcSMT PLAZMİTİ İLE TRANSFORMASYONU.....	55
3.12. BL21 STAR™ (DE3) <i>E. coli</i> HÜCRELERİNDE AcSMT PROTEİNİNİN ANLATIMI.....	55
3.12.1. Protein İzolasyonu.....	55
3.12.2. Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	56
3.12.3. Coomassie Boyama.....	58
3.12.4. İmmünolojik Belirleme.....	59
3.12.5. SMT Enzim Aktivitesi.....	60
3.12.5.1. SMT Enzim Aktivitesi Analizi için Protein İzolasyonu.....	60
3.12.5.2. Protein Konsantrasyonunun Saptanması.....	60
3.12.5.3. SMT Enzim Aktivitesi Reaksiyonu.....	61
3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. TOHUMLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ.....	62
4.2. SELENOSİSTEİN METİLTRANSFERAZ (SMT) GENİNİN SENTEZİ.....	62
4.2.1. Total RNA İzolasyonu.....	63
4.2.2. cDNA Sentezi.....	63
4.2.3. SMT Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonları.....	64
4.2.3.1. RACE Polimeraz Zincir Reaksiyonları.....	64
4.2.3.2. SMT Geninin 5' Bölgesine Ait 5' PZR.....	65
4.2.3.3. SMT Geninin Çoğaltılması.....	65
4.3. PZR ÜRÜNLERİNİN DİZİ ve HOMOLOJİ ANALİZLERİ.....	66
4.4. SMT GENİNİN FARKLI SODYUM SELENAT KONSANTRASYONLARINDA ANLATIMININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	82
4.5. <i>A. chrysochlorus</i> SMT GENİNİN BAKTERİDE KLONLANMASI.....	83
4.6. SMT PROTEİNİNİN ANLATIMI.....	87

4.7. İMMUNOLOJİK BELİRLEME.....	90
4.8. ENZİM AKTİVİTESİ.....	91
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	93
KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	119



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1:</b> Selenosistein biyosentez yolu.....	5
<b>Şekil 2.2:</b> Selenyumlu bileşiklerin yapıları A) selenit, B) selenat, C) metilselenol, D) metilselenik asit, E) trimetilselenonium iyonu, F) selenometiyonin, G) selenosistein, H) metilselenosistein, I) selenobetain ve J)selenosiyanat.....	13
<b>Şekil 2.3:</b> Selenyum biriktiren bitkilerde selenat alımı ve Se birikimi.....	16
<b>Şekil 2.4:</b> Bitkilerde Se Metabolizması (1) ATP sulfurilaz, (2) APSe redüktaz, (3) Glutatyon, (4) OAS tiol liyaz, (5) SMT, (6) Selenosistein liyaz, (7) sistatyonin- $\gamma$ -sentaz, (8) sistatyonin- $\beta$ -liyaz, (9) metionin sentaz, (10) metionin metiltransferaz, (11) DMSP liyaz, (12) $\gamma$ -glutamilsistein sentaz.....	19
<b>Şekil 2.5:</b> a) 3', b) 5' RACE reaksiyonlarının akış şeması (GSP: Gene özgü primer, GSP1: Gene özgü primer 1, GSP2: Gene özgü primer 2).....	30
<b>Şekil 2.6:</b> Sertavul-Mersin'de yetişen <i>Astragalus chrysochlorus</i> bitkisi.....	32
<b>Şekil 3.1:</b> cDNA sentez ve PZR şeması.....	39
<b>Şekil 3.2:</b> pET100/D-TOPO <sup>®</sup> vektörünün haritası.....	49
<b>Şekil 3.3:</b> Champion <sup>™</sup> pET Directional Expression Kitinin işleyiş şeması.....	50
<b>Şekil 4.1:</b> A) Kontrol B)1 ppm C) 5 ppm D) 25 ppm sodyum selenat içeren MS besiyerinde yetişen 30 günlük <i>Astragalus chrysochlorus</i> bitkileri.....	62
<b>Şekil 4.2:</b> A) Kontrol bitkisinden ve B) 1 ppm C) 5 ppm D) 25 ppm sodyum selenat uygulanmış <i>A. chrysochlorus</i> bitkilerinden izole edilen bütünlüğü bozulmamış nitelikteki total RNA.....	63
<b>Şekil 4.3:</b> 1 ppm sodyum selenat uygulanmış <i>A. chrysochlorus</i> bitkilerinden izole edilen bütünlüğü bozulmamış nitelikteki total RNA'lerden sentezlenen cDNA lar A) Markır (100 bp, Fermentas), B) 3' RACE PZR, 5' PZR, SMT PZR için sentezlenen cDNA lar, C) 5' RACE reaksiyonları için sentezlenen cDNA lar.....	64
<b>Şekil 4.4:</b> PZR ürünlerinin % 1' lik agaroz jeldeki görüntüsü. <b>A.</b> Markır (100 bp, Fermentas), <b>B.</b> 3' RACE ile elde edilen PZR ürünü, <b>C.</b> 5' PZR ile elde edilen PZR ürünü.....	65
<b>Şekil 4.5:</b> PZR ürünlerinin % 1' lik agaroz jeldeki görüntüsü. <b>A.</b> Markır (1 kb Amresco), <b>B.</b> SMT geni.....	66
<b>Şekil 4.6:</b> <i>A. chrysochlorus</i> SMT 5' PZR ile elde edilen nukleotid dizisi (221 bç.).....	67
<b>Şekil 4.7:</b> <i>A. chrysochlorus</i> SMT 3' RACE PZR ile elde edilen nukleotid dizisi (542 bç.).....	67
<b>Şekil 4.8:</b> <i>A. chrysochlorus</i> 'dan SMT PZR ile elde edilen nukleotid dizisi (1020 bç.).....	68

<b>Şekil 4.9.</b> <i>A. chrysochlorus</i> SMT cDNA dizisi ve aminoasit dizisi (Sistein = C, Histidin = H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin = V, Alanin = A, Glisin = G, Lösin = L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin = N, Aspartat = D, Glutamat = E, Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin = Y, Triptofan = W) (1021-1242. bazlar a rası 3' anlatım yapmayan bölgedir).....	69
<b>Şekil 4.10:</b> Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT, : <i>Astragalus bisulcatus</i> , ArSMT: <i>Astragalus racemosus</i> , ApSMT: <i>Astragalus pectinatus</i> , AdSMT: <i>Astragalus drummondii</i> , Ace: <i>Astragalus ceramicus</i> ve AISMT: <i>Astragalus leptocarpus</i> , CsSMT: <i>Camellia sinensis</i> , BoSMT: <i>Brassica oleracea var italica</i> ve AcSMT: <i>Astragalus chrysochlorus</i> ).....	70
<b>Şekil 4.10 (devam):</b> Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT, : <i>Astragalus bisulcatus</i> , ArSMT: <i>Astragalus racemosus</i> , ApSMT: <i>Astragalus pectinatus</i> , AdSMT: <i>Astragalus drummondii</i> , Ace: <i>Astragalus ceramicus</i> ve AISMT: <i>Astragalus leptocarpus</i> , CsSMT: <i>Camellia sinensis</i> , BoSMT: <i>Brassica oleracea var italica</i> ve AcSMT: <i>Astragalus chrysochlorus</i> ).....	71
<b>Şekil 4.10 (devam):</b> Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT, : <i>Astragalus bisulcatus</i> , ArSMT: <i>Astragalus racemosus</i> , ApSMT: <i>Astragalus pectinatus</i> , AdSMT: <i>Astragalus drummondii</i> , Ace: <i>Astragalus ceramicus</i> ve AISMT: <i>Astragalus leptocarpus</i> , CsSMT: <i>Camellia sinensis</i> , BoSMT: <i>Brassica oleracea var italica</i> ve AcSMT: <i>Astragalus chrysochlorus</i> ).....	73
<b>Şekil 4.10 (devam):</b> Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT, : <i>Astragalus bisulcatus</i> , ArSMT: <i>Astragalus racemosus</i> , ApSMT: <i>Astragalus pectinatus</i> , AdSMT: <i>Astragalus drummondii</i> , Ace: <i>Astragalus ceramicus</i> ve AISMT: <i>Astragalus leptocarpus</i> , CsSMT: <i>Camellia sinensis</i> , BoSMT: <i>Brassica oleracea var italica</i> ve AcSMT: <i>Astragalus chrysochlorus</i> ).....	74
<b>Şekil 4.10 (devam):</b> Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT, : <i>Astragalus bisulcatus</i> , ArSMT: <i>Astragalus racemosus</i> , ApSMT: <i>Astragalus pectinatus</i> , AdSMT: <i>Astragalus drummondii</i> , Ace: <i>Astragalus ceramicus</i> ve AISMT: <i>Astragalus leptocarpus</i> , CsSMT: <i>Camellia sinensis</i> , BoSMT: <i>Brassica oleracea var italica</i> ve AcSMT: <i>Astragalus chrysochlorus</i> ).....	75
<b>Şekil 4.10 (devam):</b> Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT, : <i>Astragalus bisulcatus</i> , ArSMT: <i>Astragalus racemosus</i> , ApSMT: <i>Astragalus pectinatus</i> , AdSMT: <i>Astragalus drummondii</i> , Ace: <i>Astragalus ceramicus</i> ve AISMT: <i>Astragalus leptocarpus</i> , CsSMT: <i>Camellia sinensis</i> , BoSMT: <i>Brassica oleracea var italica</i> ve AcSMT: <i>Astragalus chrysochlorus</i> ).....	76
<b>Şekil 4.11:</b> Amino asit dizi karşılaştırmaları ( <i>A. chrysochlorus</i> SMT, <i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein, <i>A. leptocarpus</i> SMT, <i>A. ceramicus</i> SMT, <i>A. racemosus</i> SMT, <i>A. bisulcatus</i> SMT, <i>A. pectinatus</i> SMT, <i>C. sinensis</i> SMT, <i>B. olerae</i> SMT) (Sistein = C, Histidin = H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin = V,	

Alanin = A, Glisin = G, Lösin =L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin = N, Aspartat = D, Glutamat = E, Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin =Y , Triptofan = W).....	78
<b>Şekil 4.11 (devam):</b> Amino asit dizi karşılaştırmaları ( <i>A.chrysochlorus</i> SMT, <i>A.drummondii</i> -SMT benzeri protein, <i>A. leptocarpus</i> SMT, <i>A. ceramicus</i> SMT, <i>A.racemosus</i> SMT, <i>A.bisulcatus</i> SMT, <i>A.pectinatus</i> SMT, <i>C. sinensis</i> SMT, <i>B. olerae</i> SMT) (Sistein = C, Histidin = H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin =V, Alanin = A, Glisin = G, Lösin =L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin =N, Aspartat = D, Glutamat = E, Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin =Y , Triptofan = W).....	79
<b>Şekil 4.12:</b> A) <i>A. bisulcatus</i> SMT proteininin olası üç boyutlu yapısı (Sors ve diğ. 2009) B) <i>A. chrysochlorus</i> SMT proteininin olası üç boyutlu yapısı.....	82
<b>Şekil 4.13:</b> <i>A. chrysochlorus</i> SMT genine ve aktin genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü (A), bu genlere ait densitometrik analizler sonucu elde edilen yoğunluk grafiği (B).....	83
<b>Şekil 4.14:</b> Transformasyondan sonra 100 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerinde üreyebilen bakteri kolonileri.....	84
<b>Şekil 4.15:</b> Koloni PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	84
<b>Şekil 4.16:</b> Transformantlardan elde edilen örnek plazmit DNA'sı.....	85
<b>Şekil 4.17:</b> pET100/D-AcSMT bakımından pozitif olarak transformanttan elde edilen plazmit DNA'sı ile yapılan PZR sonucu.....	85
<b>Şekil 4.18:</b> Pozitif AcSMT transformantlarına dizi bilgisi (koyu yazılmış olan dizi pET100D vektörüne ait olan dizidir. ? SMT geninin +1. nükleotidi ile 1020. nükleotidi arasındaki gene ait diziyi göstermektedir.).....	86
<b>Şekil 4.19:</b> 0. ve 2. saatlerde alınan örneklerin suda çözünebilir kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDA'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDA'luk SMT'yi işaret etmektedir).....	87
<b>Şekil 4.20:</b> 4. ve 6. saatlerde alınan örneklerin suda çözünebilir kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDA'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDA'luk SMT'yi işaret etmektedir).....	88
<b>Şekil 4.21:</b> 0. ve 2. saatlerde alınan örneklerin suda çözünemeyen kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDA'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDA'luk SMT'yi işaret etmektedir).....	89
<b>Şekil 4.22:</b> 4. ve 6. saatlerde alınan örneklerin suda çözünemeyen kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDA'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDA'luk SMT'yi işaret etmektedir).....	90

- Şekil 4.23:** a) *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) bakterilerinde kontrol ve deney gruplarına ait SMT anlatımlarının Western blot analizi, b) Analiz sonuçlarının grafik şeklinde gösterimi (Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlendi. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. \*\* P<0.01) [IPTG ile uyarılmış kontrol (0. saat), 2., 4., 6. saate ait protein ekstresi]..... **91**
- Şekil 4.24:** *Astragalus chrysochlorus* SMT genine sahip BL21 Star (DE3) hücrelerinde enzim aktivitesi. A) S-adenozilmetionin B) Selenosistein C) *A. chrysochlorus* SMT genini içermeyen BL21 Star (DE3) bakterisinden elde edilen protein özütü ile yapılan enzim aktivitesi D) 0. saatte E) 2. saatte F) 4. saatte G) 6. saatte alınan örnekte enzim aktivitesi I) Metilselenosistein..... **92**

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1:</b> İnsan Selenoproteomundaki Selenoproteinler.....	<b>6</b>
<b>Tablo 3.1:</b> <i>Astragalus chrysochlorus</i> doku kültürü için kullanılan MS temelli besiyerlerinin kimyasal içeriği (besiyerlerinin pH'ları 5.7-5.8 dir)...	<b>34</b>
<b>Tablo 3.2:</b> Agaroz-Formaldehit jel sisteminde kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri.....	<b>38</b>
<b>Tablo 3.3:</b> cDNA sentez tüplerinde bulunan bileşenler, bu bileşenlerin içerikleri ve reaksiyon sırasında kullanılan miktarları.....	<b>40</b>
<b>Tablo 3.4:</b> 5' RACE PZR'de kullanılacak cDNA'lara poliA kuyruğu eklenmesi için gerekli bileşenler, bu bileşenlerin içerikleri ve reaksiyon sırasında kullanılan miktarları.....	<b>41</b>
<b>Tablo 3.5:</b> PZR'de kullanılan primer dizileri.....	<b>43</b>
<b>Tablo 3.6:</b> PZR tüplerinde bulunan bileşenler, bu bileşenlerin içerikleri ve reaksiyon sırasında kullanılan konsantrasyon/miktarları.....	<b>44</b>
<b>Tablo 3.7:</b> PZR koşulları.....	<b>44</b>
<b>Tablo 3.8:</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan yürütme tampon çözeltisi ve içeriği.....	<b>46</b>
<b>Tablo 3.9:</b> Ligasyon işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	<b>50</b>
<b>Tablo3.10:</b> Luria-Bertani (LB) (pH 7.2) besiyeri yapımında kullanılan bileşenler ve miktarları.....	<b>51</b>
<b>Tablo 3.11:</b> SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.....	<b>57</b>
<b>Tablo 3.12:</b> SDS-PAGE'de kullanılan jelin hazırlanması.....	<b>58</b>
<b>Tablo 3.13:</b> İmmünojenik analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikorlar, kaynakları, elde edildikleri organizmalar ve dilüsyonları.....	<b>59</b>
<b>Tablo 3.14:</b> SMT enzim aktivitesi reaksiyonunda kullanılan bileşenler.....	<b>61</b>
<b>Tablo 4.1:</b> <i>A. chrysochlorus</i> SMT gen dizisinin veri bankası tarama sonuçları.	<b>77</b>
<b>Tablo 4.2:</b> <i>A. chrysochlorus</i> SMT aminoasit dizisinin farklı bitkilere ait SMT aminoasit dizileri ile karşılaştırılması.....	<b>80</b>
<b>Tablo 4.3:</b> <i>A. chrysochlorus</i> SMT aminoasit dizisinin farklı proteinlere ait aminoasit dizileri ile karşılaştırılması.....	<b>81</b>

## SEMBOL LİSTESİ

AcOH	: Asetik Asit
AMP	: Adozin mono fosfat
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
APS	: ATP Sülfürilaz
APSe	: 5' fosfo selenat
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BSA	: Bovine Serum Albumin
C4H	: Sinamat-4-hidroksilaz
cDNA	: Komplementer DNA
Cgs	: Sistasyonin $\gamma$ sentaz
Cys	: Sistein
DCi	: Ayrım Katsayısı
DEPC	: Dietil pirokarbonat
DIO	: İyodotironin Deiyonidaz
DMDS	: Dimetildisülfid
DMSe	: Dimetilselenid
DMSeP	: Dimetil selenoniopropionat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTT	: Ditiotreitol
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EtOH	: Etanol
FAGP	: DNA saflaştırma kolonu
GGMeCys	: Gama glutamilmetilsistein
GGMeSeCys	: Gama glutamilmetilselenosistein
GPx	: Glutasyon preoksidaz
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	: Fosforik asit
HMT	: Homosistein metiltransferaz
HPLC-ICPMS	: High Performance Liquid Chromatography- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
HRPO	: Yaban Turbu peroksidazı
IPTG	: İsopropil-beta-D-tiogalaktopiranosid
KCl	: Potasyum Klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Potasyum Hidrojen Fosfat
LB	: Luria-Bertani
LBA	: Luria-Bertani Agar
MeCysSo	: Metilsistein-sülfoksit
MeOH	: Metanol
MeSeCys	: Metilselenosistein
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür

MMT	: Metionin metiltransferaz
MOPS	: 3-(N morfolino) propansülfonik asit
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Disodyum Hidrojen Fosfat
Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Se	: Sodyum Selenat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
OAS	: o-asetilserin
OAS-TL	: o-asetilserin tioI-liyaz
PAL	: Fenilalanin amonyak liyaz
PBS	: Fosfat Salin Tamponu
ppm	: Milyonda bir
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RACE	: Rapid Amplified cDNA Ends
SAT	: Serin asetil transferaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SeCys	: Selenosistein
SeMet	: Selenometionin
SL	: Selenosistetin liyaz
SMM	: S-metilmetionin
SMT	: Selenosistein Metiltransferaz
TAE	: Tris-asetat tamponu
TEMED	: Tetrametiletilediamin
TrxR	: Tioredoksin Redüktaz

## ÖZET

### ***Astragalus chrysochlorus*'da Selenyum Birikimine İlişkin Moleküler Çalışmalar**

Selenyum kanserden koruyucu etkilerinin yanı sıra insan sağlığında önemli rolleri olan bir elementtir. Selenyumlu bileşiklerin kanserden koruyucu etkilerinin değişkenlik gösterdiği saptanmış olmakla birlikte, metilselenosisteinin (MeSeCys) en etkili bileşiklerden biri olduğu bilinmektedir. *Astragalus* cinsi bitkilerin yüksek oranda MeSeCys olmak üzere, selenyumlu bileşikleri biriktirdikleri belirlenmiştir. Bu nedenle MeSeCys biriktirilmesi çalışmaları için uygun bir model oluşturmaktadırlar. MeSeCys oluşumundan sorumlu olan selenosistein metiltransferaz (SMT) enzimini şifreleyen gen *Astragalus chrysochlorus* bitkisinden, veribankasında bulunan diğer SMT genleri ve daha önceki çalışmamızdan elde edilen dizi bilgileri kullanılarak tasarlanan primerler ile PZR ve RACE PZR yöntemleriyle izole edilmiştir. Bu genin, 1.242 bp. uzunluğunda ve 340 amino asit, 40 kDa ağırlığında proteini şifreleyen açık okuma çerçevesine sahip olduğu belirlenmiştir. AcSMT'nin aminoasit dizisinin *A. bisulcatus* SMT proteinine % 97 oranında benzediği saptanmıştır. Mitokondri ve kloroplast sinyali içermediği belirlenen AcSMT'nin karboksil ucunda, diğer metil transferazlar gibi çinko bağlayan GGCC motifi içerdiği ve bu bölgeye yakın konumlanmış korunmuş sistein bakiyeleri saptanmıştır. AcSMT geni, *Escherichia coli*'ye aktarılarak bu bakteride anlatımı sağlanmış ve ürünü olan protein Western Blotlama yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca bu bakterilerden elde edilen hücre ekstratlarında yapılan enzim aktivitesiyle AcSMT'nin varlığı saptanmış, farklı selenat uygulamaları ile anlatımı araştırılan AcSMT geninin bitkide sürekli anlatım yaptığı bulunmuştur. AcSMT geninin bakteride klonlanarak ürünün anlatımının başarılması, bu enzimin rekombinant DNA teknolojisi ile üretimine temel oluşturacaktır.



## SUMMARY

### **Molecular Studies on Selenium Accumulation in *Astragalus chrysochlorus***

Selenium (Se) plays an indispensable role in human nutrition and has been implicated to have important health benefits, including being a cancer preventative agent. While different forms of Se vary in their anticarcinogenic efficacy, methylselenocysteine (MeSeCys) has been demonstrated to be one of the most effective chemopreventative compounds. *Astragalus* sp. is known for its ability to accumulate high levels of Se with the majority of the selenoamino acids in the form of methylselenocysteine. Therefore, they serve as a good model to study the regulation of MeSeCys accumulation in plants. A cDNA encoding selenocysteine methyltransferase (SMT), the key enzyme responsible for MeSeCys formation, was cloned from *Astragalus chrysochlorus* using specific primers designed from a fragment that we obtained in our previous work and other SMT genes in databases. AcSMT isolated by PCR and RACE-PCR reactions. This gene is a 1.242 kb cDNA with an open reading frame predicted to encode a 340 amino acid, 40 kD protein. The predicted amino acid sequences of AcSMT shows 97% identity with *A. bisulcatus* selenocysteine methyltransferase (AbSMT). Analyses of AcSMT showed that it lacks obvious chloroplast or mitochondrial targeting sequences and contains a consensus sequence of GGCC for a possible zinc-binding motif near the C-terminal and a conserved Cys residue upstream of the zinc-binding motif as other related methyltransferases. This cDNA, designated as AcSMT, was functionally expressed in *Escherichia coli*, and its identity was confirmed by sequence analysis, western blotting and enzyme activity. Expression of AcSMT correlated with the presence of SMT enzyme activity in cell extracts. Examination of AcSMT gene expression in response to selenate treatments showed that the AcSMT transcript was constitutively expressed in plants. We have achieved to clone and express AcSMT in bacteria. This results provide an avenue for producing AcSMT by using recombinant DNA technologies.

## 1. GİRİŞ

Selenyum, biyolojik sistemler için yüksek konsantrasyonlarda toksik bir element olabildiği gibi pek çok hücresel işlev için de gereklidir. Günümüzde, selenyumun gelişim, bağışıklık, antioksidasyon, kanser gibi pek çok biyolojik süreçte etkili olduğu belirlenmiştir. Selenyumun toksik etkisi canlılarda depolanmasını zorlaştırır. Ancak *Astragalus* sp. türü bazı bitkiler yüksek miktarda selenyum biriktirebilmektedirler. Selenyum, bu bitkilerde metilselenosistein (MeSeCys) şeklinde depolanır. Metilselenosistein, toksik olmayan bir selenyum bileşiğidir. Selenyumun MeSeCys şeklinde biriktirilmesi, bu elementin hem toksik etkisinin giderilmesini hem de depolanabilmesini sağlar. MeSeCys oluşumunda rol oynayan anahtar enzim, Selenosistein metiltransferazdır (SMT). MeSeCys, selenosistein ve S-metilmethioninden SMT aracılığı ile sentezlenir (Pilon-Smits ve Quinn, 2010).

*Leguminosae* ailesinin üyesi olan, dünyada yaklaşık 2500 türü bulunan *Astragalus* (geven) cinsi bitkiler özellikle Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da yayılım göstermektedir (Akan ve Civelek 2001). *Astragalus* türleri, Çin'de halk arasında yüzyıllardır yorgunluk, halsizlik, iştahsızlık, ateş, terleme, diyare, astım, soğuk algınlığı, uterus, ovaryum ve kolon kanserine karşı tedavi amaçlı kullanılmaktadır. *A. membranaceous*, *A. mongholicus* tıbbi olarak en yaygın kullanılan türlerdir. Ayrıca kitre zamkı olarak da isimlendirilen *Astragalus*'un yapışkan özelliğe sahip öz suyu tedavi amaçlı, yapıştırıcı-sıkılaştırıcı ve katılaştırıcı (diş hekimliğinde protez yapımı, besin endüstrisinde dondurma yapımı, iplik, deri ve kumaşların işlenmesi için tekstilde) olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında *Astragalus*'lar hayvanlar tarafından yem olarak tüketilmektedir (Çalış ve diğ. 1996).

Bu tez kapsamında daha önceki ön çalışmalarla selenyuma tolerans gösterdiği belirlenen ve selenyum birikiminden sorumlu olan SMT genine ait korunmuş 595 baz çiftlik parçayı taşıdığı saptanan *A. chrysochlorus* bitkisinde SMT geninin proteini şifrelemeden sorumlu olan DNA dizisinin tamamının izolasyonu ve moleküler

analizinin yapılması hedeflendi. Bu amaçla öncelikle *A. chrysochlorus* tohumları Se varlığında doku kültürü koşullarında çimlendirildi ve çimlenen fidelerden total RNA izolasyonu yapıldı. RNAların saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlendi. Kalitatif analiz ise % 1'lik agaroz/formaldehit jelde yapıldı. Bu RNAlar kullanılarak yapılan revers transkripsiyon reaksiyonuyla cDNAlar elde edildi. Se içeren ortamda yetiştirilmiş *A. chrysochlorus*'dan elde edilen cDNAlar, RACE (Rapid Amplified cDNA Ends) PZR yöntemi (Frohman ve diğ. 1988) için kullanıldı. Böylece SMT genine ait cDNA, korunmuş bölgelere özel primerler yardımıyla çoğaltıldı. PZR ile, yapılan ön çalışmalardan elde edilen ve selenyum birikiminden sorumlu olan SMT genine ait korunmuş bölgelere göre tasarlanan primerlerle genin 5', 3' bölgeleri ve tamamı çoğaltıldı. Elde edilen bölgelerin dizi analizleri yapıldı. Diziler diğer dizi verileriyle karşılaştırma yapmaya olanak veren BLASTX programı aracılığı ile tanımlandı. Karşılaştırılan dizilerin daha önce diğer organizmalardan elde edilen SMT genine ait dizilerle benzerliği saptandı. Daha sonra SMT genine ait dizi bakteriyel pET100D/TOPO ekspresyon vektörüne klonlandı ve genin anlatımı SDS-PAGE, ardından yapılan western blotlama ve enzim analiziyle belirlendi.

Bu tez çalışmasıyla, *Astragalus chrysochlorus*'da selenyum birikimine ilişkin SMT (Selenosistein metiltransferaz) geninin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonunun gerçekleştirilmesinin, biyoteknolojik açıdan antikanser bir madde olan metilselenosistein (MeSeCys) üretimine, selenyum ile kirlenmiş toprakların fitoremediasyon ile temizlenmesine ve SMT geninin türler arası homoloji karşılaştırmaları ile de temel bilime katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. SELENYUM

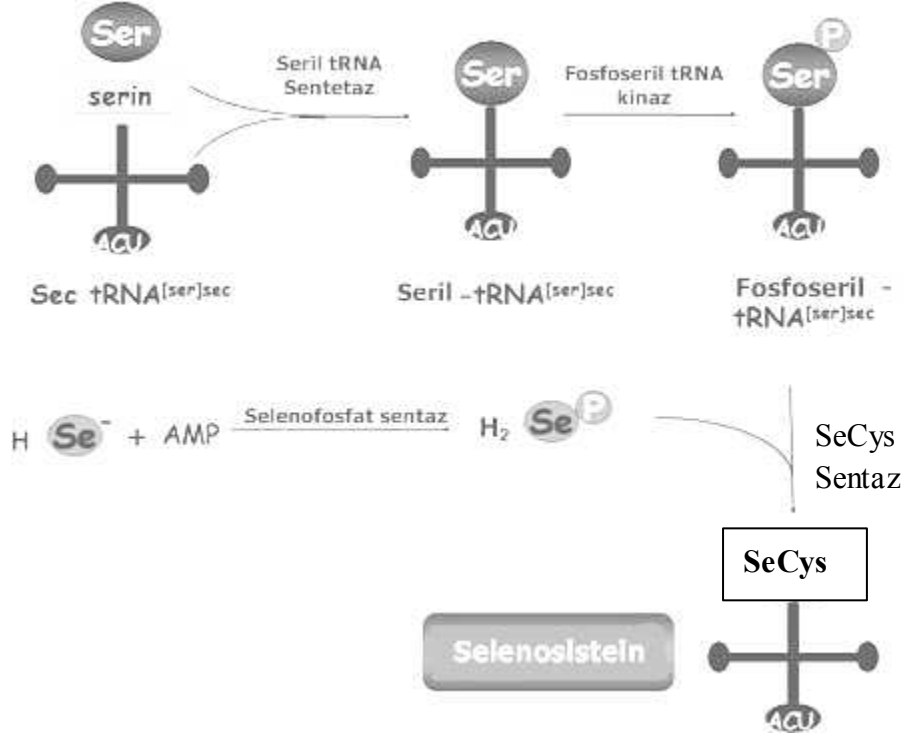
Selenyum (Se), atom numarası 34 atom ağırlığı 78,96 g olan ve Se simgesiyle ifade edilen 6A grubu bir elementtir. İsveçli araştırmacı Jacob Berzelius tarafından 1817'de keşfedilen Se'un, atom çekirdeği kükürttten ( $S^{+2}$ ) büyük olmasına karşın, bu iki elementin kimyasal özellikleri benzerlik gösterir. Eser miktarda selenyum'un organizmaların metabolizmasında önemli rol oynadığı ve hayvan hücrelerinin birçok fonksiyonu için gerekli bazı enzimlerin yapısına katıldığı, ancak yüksek miktarlarda alındığında toksik etki yaptığı bilinmektedir (Ellis ve Salt, 2003). Selenyum, kükürt ile olan benzerliğinden dolayı proteinlerin yapısına katılmakta olup, hayati öneme sahip işlevsel ve yapısal proteinlerin 3 boyutlu yapılarında farklılıklara neden olabilmektedir. Bu benzerlik canlılarda Se'un neden olduğu toksik etkiyi açıklamaktadır (Terry ve diğ. 2000).

Selenyumun önemi ilk olarak 1957'de Schwarz and Foltz tarafından ortaya konmuştur. Eser miktarda selenyumun metabolizma için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. 1973 yılında, selenyumun glutatyon peroksidaz gibi önemli antioksidan enzimlerin yapısına katıldığı kanıtlanmıştır (Rotruck ve diğ., 1973). Selenyum, yaşlanma ve kanser araştırmalarında, antioksidasyon mekanizmalarındaki etkinliği sebebiyle özellikle son 20 yılda araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. Asya ve Çin'de, 1979'da, selenyum eksikliğinde görülen bir hastalık olan, Keshan hastalığında, besinle alınan selenyumun insan sağlığında rolü olduğu saptanmıştır. Böylece selenyumun insan beslenmesi için önemi ortaya konmuştur. Metil selenik asit, metilselenosistein ve selenometionin gibi bazı düşük moleküler ağırlıktaki selenyumlu bileşiklerin hayvan ve *in vitro* model çalışmalarında antitümörojenik ajanlar olarak etkili oldukları gösterilmiştir (Medina ve diğ. 2001; Mckenzie ve diğ. 2009).

## 2.2. SELENYUM VE SAĞLIK

Selenyum besin zincirine selenyumu topraktan alan bitkiler aracılığı ile katılır. Asidik, volkanik topraklar ve bunların demir veya alüminyum ile karışımı Avrupa'nın birçok bölgesinde selenyumun bitkiler tarafından alınımını azaltmaktadır. Bu durum 1950'lerden bu yana hayvan gelişimi üzerinde olumsuz etkiler yaratarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Pilon-Smits ve Quinn, 2010). İnsanların besinlerden aldığı Se miktarı coğrafik bölgelere göre değişmektedir. Selenyum eksikliğine bağlı olarak görülen hastalıkların en önemlileri Keshan hastalığı, endemik kardiyomyopati, Kashin-Beck hastalığı ve eklem iltihabıdır. Bu hastalıklardan Keshan, Çin'in selenyumca fakir bölgesi olan Keshan'da görülmesi nedeniyle bu ismi almıştır. Selenyumun önemli işlevlere sahip selenoproteinlerin yapısında yer alması nedeniyle bu elementin eksikliği insan ve hayvan sağlığı açısından hayati sonuçlar doğurmaktadır (Pilon-Smits ve Quinn, 2010).

Selenoproteinler, selenyum içeren selenosisteinin translasyon sırasında genetik şifrenin yeniden okunması mekanizması ile proteinlerin yapısına katılarak oluşur. Standart genetik şifre hücrelerin sadece 20 aminoasidi kullanarak proteinleri üretmesine izin verir. Fakat bakteriler, arkeler ve ökaryotlar translasyon düzeyinde yeniden okuma yoluyla uzayan polipeptit zincirine doğrudan girebilen selenosisteini içerirler. Selenosistein (SeCys), kükürt atomunun yerini alan bir Se atomu sayesinde sisteine benzer bir yapıya sahiptir. Normalde translasyon durdurucu sinyal için kullanılan UGA kodonu ile baz eşleşmesi yapan özel bir tRNA molekülüne bağlı serinden üretilir (Şekil 2.1). Özelleşmiş bir tRNA molekülü, normal seril-tRNA sentetaz tarafından serin (Ser) ile yüklenir ve serin daha sonra enzimatik olarak selenosisteine dönüşür. mRNA molekülünde sap ve ilmek yapısı oluşturan özel diziler selenosisteinin polipeptit zincirine katılacağı UGA kodonunu işaret eder. Bu olay bakterilerde SelB adı verilen selenosisteine özgü bir translasyon faktörünün katılımını gerektirir. Memelilerde ise bu görevi eEFsec adı verilen bir protein kompleksi üstlenir (Hattfield ve diğ. 2006, Squires ve Berry, 2008).



**Şekil 2.1.** Selenosistein biyosentez yolu

İnsan selenoproteomu 17 selenoprotein ailesi içerir ve bunların bazıları çoklu gen aileleridir (Kryukov ve diğ. 2003, Reeves ve Hoffmann, 2009). Bunlar glutatyon peroksidaz (GPx, 5 gen), tiyoredoksin redüktaz (TrxR, 3 gen) selenofosfat sentataz 2 (SPS2) ve iodotironin diodinaz (DIO, 3 gen) dir. Geri kalan selenoproteinler 15k-Da büyüklüğündeki Sep15 i ve alfabetik sırayla adlandırılan SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelO, SelP, SepP, SelR, SelS, SelT, SelV ve SelW yi içermektedir. Bu proteinlerden sadece birkaç tanesi fonksiyonel olarak tanımlanmıştır. İnsan selenoproteomuna ait proteinler Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Tablo 2.1** İnsan Selenoproteomundaki Selenoproteinler

<b>Selenoprotein</b>	<b>Görevi</b>
15kDa	Endoplazmik retikulum içinde protein katlanmasının kontrolü
D11	Tiroid hormon olgunlaşması
D12	Tiroid hormon olgunlaşması
D13	Tiroid hormon olgunlaşması
GPx1	Serbest radikal indirgenmesi
GPx2	Serbest radikal indirgenmesi
GPx3	Serbest radikal indirgenmesi
GPx4	Okside fosfolipid indirgenmesi
GPx6	Serbest radikal indirgenmesi
H	Bilinmiyor
I	Bilinmiyor
K	Bilinmiyor
M	Bilinmiyor
N	Bilinmiyor
O	Bilinmiyor
P	Nitrit redüktaz
S	Bilinmiyor
SPS2	Seleno fosfat sentaz
T	Bilinmiyor
TR1	Sitoplazmik tioredoksin redüktaz
TR2	Mitokondriyal tioredoksin redüktaz
V	Bilinmiyor
W	Bilinmiyor
MsrA	Metionin S-sülfoksit redüktaz
R (MsrB)	Metionin R-sülfoksit redüktaz

Enzim aktivitesine sahip selenoproteinlerde selenosistein, enzimlerin aktif bölgelerinde yer alır. Selenyum redoks merkezi olarak bir takım fonksiyonlara sahiptir. Örneğin, tiyoredoksin redüktaz selenoenzimi DNA sentezinde nükleotidleri indirgeyerek hücre içi redoks durumunun kontrolüne yardımcı olur. Ayrıca selenyum bağımlı iyodotironin deiyonidaz aynı şekilde inaktif öncül bileşenlerden aktif tiroid hormonu üretir. Redoks fonksiyonunun en iyi bilinen örneği, hidrojen peroksit, lipid ve fosfolipid hidroperoksitlerinin selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz ailesi tarafından zararsız ürünlere (su ve alkol) dönüştürülmesidir. Bu fonksiyon membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur, prostatiklin üretimini korur ve oksidatif hasarın ateroskleroz ve kanser gibi artan risk koşulları ile ilişkili DNA, lipid ve lipoprotein gibi biyomoleküllere yayılma olasılığını azaltır. Selenyum bunun yanında özellikle fertilité, immun yanıt ve kanserden korunma ile ilgili sağlık etkilerine sahiptir (Sunde, 1997, Pilon-Smits ve Quinn, 2010).

Fazladan selenyum takviyesi yapılması aktif T hücrelerinin artışına, bağışıklık sisteminin stimülasyonuna yol açmıştır. Günde 200 µg selenyum (sodyum selenit olarak) takviyesi yapılan gönüllü bireylerin lenfositlerinde, antijen stimülasyonuna cevapta, sitotoksik lenfosit gelişiminde ve kanser hücrelerinin zarara uğratılmasında artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca doğal öldürücü hücrelerin (“natural-killer-cell”) aktivisinde de artış saptanmıştır. Selenyum ilavesi ile tümör sitotoksitesinde % 118 oranında, doğal öldürücü hücrelerin aktivitesinde % 82 oranında artış belirlenmiştir. Bu mekanizmanın selenyumun aktif lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerin yüzeyindeki büyüme düzenleyici sitokin interlökin-2 reseptörlerinin anlatımını artırma, böylelikle bu hücrelerin interlökin-2 ile etkileşimini kolaylaştırma yeteneği ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Kiremidjian-Schumacher ve diğ. 1994).

Ayrıca selenyum immün sistem hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için bir gereksinimdir. Aktif T hücreleri, hücresele fonksiyonları ve immun yanıtın kontrolü için öneme sahip selenoproteinlerin gerekli parçası olan selenosistein sentezini sağlayan selenofosfat sentaz aktivitesini yüksek oranda göstermektedir. T hücreleri ile ilişkili birkaç genin (interlökin-2-reseptör, α-altünite, CD4) fonksiyonel selenoproteinleri kodlayabileceği ortaya konmuştur. Bu durum selenyumun immün sistemdeki rolünün



tahmin edilenden daha çeşitli olabileceğine işaret etmektedir (Taylor ve Nadimpalli, 1999).

Selenyum eksikliği bazı viral enfeksiyonlarda hastalığın ortaya çıkışı, virulansı ve ilerleme süreci ile bağlantılıdır (Taylor ve diğ.1997). Beck ve arkadaşları (1998) konağa zarar vermeyen virüslerin, selenyum eksikliği taşıyan bireylerde virulent olabileceğini, bu durumun Keshan hastalığının gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Selenyum eksikliği olan fareler “coxsackie virus” un iyi huylu suşu (CVB3/0) ile inokule edildiğinde genomda mutasyonlar meydana gelmiş ve miyokardite yol açan kardiyovirulent virüs formu ortaya çıkmıştır (Beck ve diğ. 1995). Ayrıca bu farelerdeki virüs yeterli miktarda selenyum eksikliği yaşamayan farelere aktarıldığında kalp hasarının devam ettiği görülmüş ve geri dönüşümsüz bir mutasyon olduğu sonucuna varılmıştır. “Coxsackie virus” incelendiğinde konakta miyokardite yol açan virulans gelişimi ile beraber altı nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Glutasyon peroksidaz sentezleyemeyen farelerde yapılan benzer bir çalışma bu enzimin miyokardit mutasyonları ile sonuçlanan viral RNA genomundaki oksidatif hasarın önlenmesi için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Beck ve diğ. 1998). Keshan hastalığını taşıyan insanların dokularından ve kanlarından izole edilen “Coxsackie virus” un kardiyomiyopatinin gelişiminde ko-faktör gibi iş gördüğü düşünülmektedir. Selenyumun HIV taşıyan hastalar için de gerekli bir element olduğu bilinmektedir. Selenyum *in vitro* HIV replikasyonunun potansiyel inhibitörüdür. HIV gelişimi sırasında bağışıklık sistemi hücreleri olan CD4 T'lerin sayısında azalma görülür (Beck ve diğ. 1998). Plazmada selenyum miktarındaki azalma HIV enfeksiyonunda CD4 T hücrelerinin kaybı ile paralellik göstermektedir. Selenyumdaki bu azalma hastalığın erken evrelerinde gerçekleşir. Plazmadaki selenyum HIV enfeksiyonunu belirlemede güçlü bir araçtır. Baum ve diğ. (1997) selenyum eksikliği taşıyan HIV hastalarının normal miktarda selenyum taşıyanlara oranla ölüme 20 kat daha eğilimli olduklarını göstermiştir. Selenyum eksikliği bu araştırmacılar tarafından 85 µg/l veya altında bir plazma konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. HIV ile enfekte olmuş çocuklarda, düşük seviyelerde plazma selenyumunun ölüm riskini ve hastalığın ilerleme sürecini arttırdığı da belirlenmiştir (Baum ve diğ., 1997).

Selenyumun ayrıca karaciğer kanserinin gelişmesine karşı hepatit virüsü (B veya C) ile enfekte bireylerde koruyucu olduğu gösterilmiştir (Yu ve diğ. 1997, Yu ve diğ. 1999). Virüsler konağın sahip olduğu selenyumunu viral selenoproteinlere dönüştürür, böylece konağın etkili immün yanıt oluşturmasını engeller. Taylor ve diğ. (1997) yeterli selenyum varlığında hücrel immünitenin yüksek olacağını ve konak hücrenin apoptoz ile kaybının azalacağını belirtmiştir.

Selenyumun fertilité üzerinde olumlu etkileri vardır. Selenyumun hayvanlarda sağlıklı üreme için gerekli olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (Underwood, 1977). İdiyopatik düşük probleminin selenyum eksikliği ile ilişkili olduğu koyunlar üzerindeki veteriner çalışmaları ile gösterilmiş ve selenyum ilavesinin düşükleri engellediği ortaya konmuştur (Stuart ve Oehme, 1982). Bu durumun insanlarda görülen düşükler ile ilgili olup olmadığını araştıran Barrington ve arkadaşları (1996) ilk üç aylık dönemde veya tekrarlanan düşüklerde kadınların serumlarında çok düşük miktarda selenyum barındırdıklarını bulmuşlardır. Bu araştırmacılar erken evrelerde görülen düşükleri, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz miktarının az olması sebebiyle DNA ve biyolojik membranlarda antioksidan korumasının azalması ile ilişkilendirmişlerdir. Testosteron biyosentezi ve normal spermatozoa gelişimi için gerekli olduğundan selenyum erkek verimliliği için de önemlidir (Behne ve diğ., 1996). Seminal plazmadaki selenyum konsantrasyonunun Norveçli bir grup erkek üzerinde yapılan çalışmalarda spermatozoa konsantrasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Oldereid ve diğ. 1998). Hayvanların selenyum eksikliği olan besinlerle beslenmelerinin, spermlerde hareket zayıflığı ve kuyruk kısmının kopması ile ilişkili olan böylece döllenme şansını düşüren spermin orta kısmında yapısal anormalliklere yol açtığı Ursini ve arkadaşları (1999) tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar glutatyon peroksidazın bir formunun (GPx4), olgun spermatozoaları oksidatif strese karşı koruduğunu saptamışlardır.

Selenyumun beyin fonksiyonları için önemli olduğuna dair birçok bulgu vardır. Selenyum ile beslenmenin çocuklarda şiddetli epilepsi krizlerini azalttığı görülmüş, yaşlı bireylerde ise plazmada bulunan düşük selenyum konsantrasyonunun bunama ve kavrama kaybı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Alzheimer hastalarının beyin selenyum konsantrasyonlarında % 60 oranında azalma olduğu saptanmıştır (Weber ve diğ. 1991, Ramaekers ve diğ. 1994).

Ruhsal durum üzerinde selenyum varlığının yararlı etkileri gösterilmiştir. Düşük selenyum varlığının depresyon, bunalım, bilinç bulanıklığı ve agresiflik ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Berr ve diğ. 2000). Yapılan çalışmalardan birinde selenyum eksikliğinin depresif ve sınırlı davranışlara yol açtığı belirlenmiştir (Finley ve Penland, 1998). Bireylerin 15 hafta boyunca düşük miktarda selenyumla beslendiği çalışmada bilinç bulanıklığı ve depresiflik derecelerinde önemli artışlara rastlanmıştır (günlük alınan düşük selenyum miktarı 32.6 µg, İngiltere’de ise 29-39 µg arasındadır) (Hawkes ve Hornbostel, 1996). Bu bulguların aksine yüksek selenyum alımının ruhsal durumu iyileştirdiği başka bir çalışmada ise 226.5 µg/gün selenyumla beslenen bireylerde bilinç bulanıklığı ve depresiflik derecelerinde önemli düşümlere rastlanmıştır (Finley ve Penland 1998).

Selenyum kalp damar hastalıklarına karşı koruyucudur. Bu koruyuculuğun glutatyon peroksidazın lipitlerin oksidatif modifikasyonu ile mücadele ve trombosit agregasyonunu azaltma yeteneğinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Neve, 1996). Glutatyon peroksidazın bir formu olan GPx4, fosfolipidlerin ve lipoproteinler ile ilişkili kolesterol esterlerinin hidroperoksitlerini azaltarak, damar duvarlarındaki oksitlenmiş lipoproteinlerin birikimini düşürür (Reeves ve Hoffmann, 2009). Selenyum eksikliğinde hidroperoksitlerin artışı, damar genişletici prostasiklinin endotelyum tarafından üretiminden sorumlu prostasiklin sentetaz enzimini inhibe eder, ancak damar büzülmesi ve trombosit birikimi ile ilişkili tromboksan üretimini stimüle eder (Nichol ve diğ. 1998). Kalp-damar hastalıkları ve ölüm ilişkisinin farklı serum selenyum konsantrasyonları ile test edildiği çalışmalarda selenyum miktarının önemli olduğu bulunmuştur (Salonen ve diğ. 1988, Virtamo ve diğ.1985, Suadicani ve diğ.1992).

Selenyumun pankreatit üzerinde koruyucu etkisinin olduğuna dair bulgular vardır. “Manchester Royal Infirmary” merkezinde yapılan araştırmada diğer antioksidanlar ile birlikte 600 µg selenyum alımının kronik ve nükseden pankreatit hastalarında ağrıyı ve kriz sıklığını azalttığı belirlenmiştir. Bu uygulama pankreatit hastaları için cerrahi müdahale gerekliliğini ortadan kaldırdığı için devrimsel bir nitelik taşımaktadır (McCloy, 1998). Selenyumun ayrıca akut pankreatit için yararları söz konusudur. Hastalara damar içi yolla selenyum uygulaması ile pankreatit ve buna bağlı ölüm oranında % 89 oranında azalma belirlenmiştir (Kuklinsky ve Schweder, 1996).

Yetişkinlerde günlük selenyum alımı ile astım arasındaki ilişki Londra'da geniş bir popülasyonu kapsayan vaka kontrol çalışması ile ortaya konmuştur (Shaheen ve diğ. 1999). Nefes darlığı problemi olan Yeni Zelandalı çocuklar üzerinde gerçekleştirilen çalışma sonucunda yetersiz miktarda selenyum alımı olduğunda astımın daha yaygın görüldüğü saptanmıştır (Shaw ve diğ. 1994).

1970'den beri yapılan epidemiyolojik çalışmalar selenyum alımı ve kanser nedeniyle ölüm arasında ilişki olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. Schrauser ve arkadaşarı (1977) yaptıkları çalışmada 27 ülkede selenyumla kanser arasında bağlantı olduğunu bulmuştur. Farklı konsantrasyonlarda selenyum alımının kanser türleri açısından olumlu ve olumsuz etkileri saptanmıştır. 1980lerde ve 1990ların başlarında 8000-34000 bireyi kapsayan çalışmalarda düşük selenyum alımının prostat ve akciğer kanseri vakaları ve ölüm oranında artışa yol açtığı belirlenmiştir (Combs ve Gray, 1998, Kok ve diğ. 1987, Knekt ve diğ. 1998, Yoshizawa ve diğ. 1998). Hepatocellular karsinomada (HCC) ise 7342 Taiwan'lı erkek üzerinde yapılan çalışmada kronik Hepatit B ve C virusu enfeksiyonunda, plazmadaki yüksek selenyum konsantrasyonlarının HCC'nin gelişimi için risk faktörü oluşturduğu belirlenmiştir (Yu ve diğ. 1999).

Selenyumun insan ve hayvan sağlığı üzerindeki koruyucu etkileri antioksidan enzimlerin yapısına katılarak biyomoleküllerin zarar görmesini engelleyebilme özelliğinden kaynaklanır. Selenyum glutatyon peroksidaz aracılığı ile gerçekleştirdiği antioksidan rolü ile hidrojen peroksit, lipid ve fosfolipit hidroperoksitlerini azaltır ve böylece serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin miktarlarını düşürür (Ellis ve Salt, 2003). Ayrıca hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılması ve süperoksit üretiminin azaltılması ile solunuma bağlı sorunları düzenler. Artan oksidatif stres ve iltihap ile ilgili bir durumların (romatoid artrit, pankreatit ve astım) selenyum miktarı ile değişebileceği Finlandiyalı kadın ve erkekten oluşan hasta grubuna yönelik bir çalışmada ortaya konmuştur. Romatoid artrit vakasının görüldüğü hasta grubu ile yapılan denemede 200 µg selenyumun maya formunda üç ay boyunca alımının eklem ağrılarını önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (Knekt ve diğ. 2000).

Son yıllarda bitkilerdeki Se bileşenlerinin antikarsinojenik aktivitelerini tanımlamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Araştırmacıların üzerinde yoğunlaştığı

bitkiler sarımsak, soğan ve brokolidir. Finley ve arkadaşları (2001) Sprague-Dawley sıçanlarının 3 µg Se/g içeren besinler (örneğin yüksek Se içeren brokoli) ile beslendiklerinde, 0.1 µg Se (selenit olarak) alan farelere göre çok düşük oranda meme tümörlerine rastlandığını belirtmişlerdir (Finley ve diğ., 2001). Bir diğer çalışmada Fisher F344 farelerini 2 µg Se/g selenyumu brokoli çiçeği veya brokoli filizleri ile beslediğinde, 0.1 veya 2 µg Se/g (selenit) düşük selenyum içerikli brokoli ile beslenen farelere göre daha az anormal kolon kriptlerine (küçük kör kese) rastlanmıştır (Finley ve diğ., 2001). Bu veriler yüksek selenyum içerikli brokolinin memeli kanserlerine yönelik koruyucu etkisi olduğunu ve brokolinin kolon kanserine karşı koruyucu formunun filizlerden Se alınımı ile arttığını göstermektedir. Ayrıca 2003'de Roberge ve arkadaşları HPLC-ICP-MS kullanarak brokolideki primer selenyum bileşeninin metilselenosistein olduğunu bulmuşlardır. Ip ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada sarımsak ve mayadaki Se miktarının çoğunluğunun sırasıyla % 73 ve % 85 oranlarında γ-glutamil-metilselenosistein ve selenometionin formunda olduğunu göstermiştir.

Selenyumlu bileşiklerin (Şekil 2.2) antikarsinojenik aktiviteleri bu bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır. Ayrıca kansere karşı aktif olan Se bileşeninin selenometiyonin olduğu varsayımı değişmiştir. Metilselenosistein'in selenometiyoninden daha faydalı olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Sadece 1-3 mg/kg metilselenosistein'in selenometiyonin veya selenite göre daha etkin bir kemopreventif etmen olduğu rapor edilmiştir (Ip ve Ganther, 1990, 1992a). Yapılan bir çalışmada metilselenosistein'in selenometiyonin'e göre iki kat daha etkin olduğu kanıtlanmıştır. Metilselenosistein'in kemiricilerde meme kanserinde tümör oluşumunu % 50 geriletmediği, buna karşın selenometiyonin'in aynı tümör oluşumunu % 20 geriletmediği bulunmuştur (Ip ve Ganther, 1992b). Metil selenol selenyumun kansere karşı koruyucu olmasının sebebi ve çok yüksek oranda reaktiftir. Bu sebeple bu maddenin *in vitro* test edilmesi mümkün değildir. Ancak dolaylı olarak öncüllerini kullanarak hücre içinde dönüşümünü sağlamak mümkündür. Metilselenosistein, karaciğer'de böbrekte ve bağırsakta var olan β-liyaz enzimi ile metil selenole dönüştürülür. Selenometiyonin ise çok basamaklı sülfür metabolik yolunda metabolize edilir. Selenometiyonin, metil selenol oluşturmada metilselenosistein kadar başarılı değildir. İnsan popülasyonunda genetik polimorfizm sebebiyle enzimatik aktiviteler arasında farklılıklar görülebilir. Bundan dolayı selenometiyonine verilen yanıt daha geç ve zor olabilir. Ayrıca selenometiyoninin



### 2.3. BİTKİLER VE SELENYUM

Bitkiler, dokularında selenyumu biriktirebilmeleri açısından farklılık gösterirler. Selenyum biriktiricileri olarak bilinen bitkilerin kök, gövde, yaprak ve tohumlarında selenyum biriktirdikleri saptanmıştır. En önemli Selenyum biriktirici bitkiler *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oonopsis* ve *Xylorhiza* bitkilerine ait türlerdir (Terry ve diğ. 2000). Diğer yandan birçok yenebilen bitki selenyum biriktiremez. Selenyumlu topraklarda yetişen bitki türlerinin selenyum biriktirme kapasitelerinin farklı olduğu bilinmektedir. Örneğin kuru ağırlık olarak *Astragalus bisulcatus*'un 5530 mg Se/kg, *Stanleya pinnata*'un 1190 mg Se/kg, *Atriplex nuttallii*'nin 300 mg Se/kg biriktirebildiği bildirilmiştir (Pilon-Smits ve Quinn, 2010).

Selenyum içeren topraklarda yetişebilen bitkilerin tümü selenyum biriktiricisi değildir. Örneğin, *Astragalus* türleri içinde selenyumlu topraklarda yetişen hem biriktirici hem de biriktirici olmayan bitkiler vardır. Selenyumu biriktiren bitkiler için bir alt sınıflandırma yapılmıştır. Ayrım katsayısı ( $DC_i$ ) 1'den büyük olanlar primer biriktiriciler, 1'den küçük olanlar ise sekonder biriktiriciler olarak sınıflandırılmıştır. Kuru ağırlıkta 25 mg/kg (bazı durumlarda 100 mg/kg) ve daha az selenyum içeren bitkiler de selenyumu biriktirmeyenler (non-akümülatör), olarak sınıflandırmadaki yerini alır (Pilon-Smits ve Quinn, 2010).

$$DC_i = \frac{[Se/S]_{bitki}}{[Se/S]_{agar \text{ veya } solusyon}} \quad DC_i: \text{Ayrım Katsayısı (Ellis ve Salt, 2003)}$$

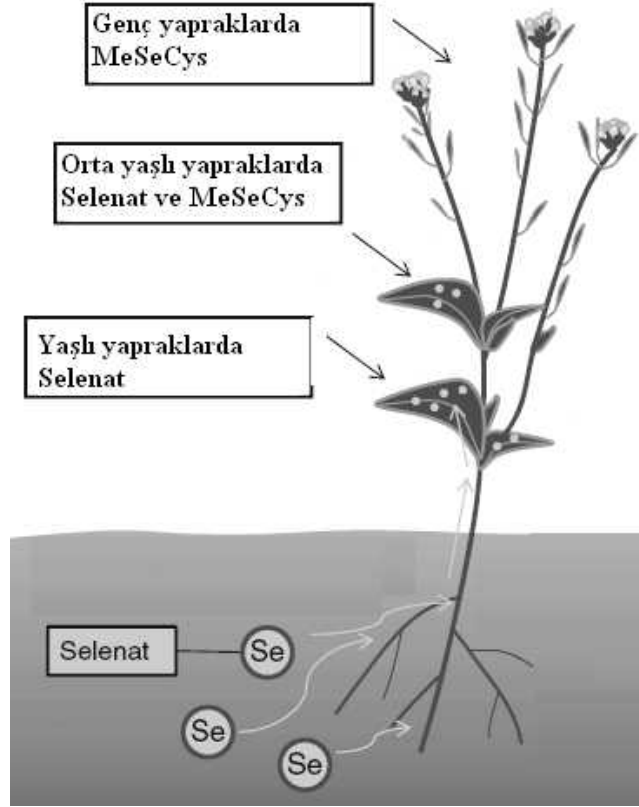
Kara bitkilerinin bugüne kadar besinsel Se ihtiyacı olduğu ile ilgili hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Ancak Se hayvanlar, mikroorganizmalar ve diğer bazı ökaryotlar için temel mikro besindir (Birringer, 2002). Normal üreme ve gelişme gibi fonksiyonlar için Se'a ihtiyaç duyan organizmalar, temel polipeptid iskeletlerinde birkaç adet SeCys taşıyan birçok selenoprotein üretirler. Bu selenoproteinlerden bazıları glutatyon peroksidaz (Mullenbach ve diğ. 1987), format dehidrogenaz (Zinoni ve diğ. 1987) ve selenofosfat sentetazdır (Lacourciere ve Stadtman 2001). Bu proteinlerde SeCys katalitik bölgede yer almaktadır.

Bitki hücreleri selenyumu ortamdan selenat, selenit gibi inorganik formda, selenometionin (SeMet) gibi organik formda ya da gaz halinde alabilirler. Selenat aktif

taşıma ile bitki hücrelerine girer ve sülfat alımıyla yarışır. Her iki anyon da bitki kök hücrelerinin plazma membranlarındaki sülfat taşıyıcıları ile hücreye taşınır. Selenit ise hücreye difüzyon ile girmektedir. Bitkiler ayrıca selenyumun selenometionin gibi organik formlarını ve aynı zamanda dimetil selenid formunda uçucu selenyumunu yaprak yüzeyinden absorpsiyon yoluyla hücre içine alabilmektedir (Terry ve diğ. 2000). Zieve ve Peterson <sup>75</sup>Se-DMSe (dimetilselenid)'yi kullanarak *Agrostis tenuis*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon esculentum* ve *Raphanus sativus*'un Se'nin gaz halinde dokulara alınabildiğini belirtmişlerdir (Zieve ve Peterson, 1984).

Bitkilerin çeşitli bölgelerinde selenyumun dağılımı türe, gelişim evresine ve fizyolojik duruma göre değişkenlik gösterir. Selenyum biriktirebilen bitkilerde, büyümenin ilk aşamalarında element genç yapraklarda birikir (Şekil 2.3). Bitkiler üreme dönemlerine ulaştıklarında ise tohumlardaki selenyum konsantrasyonu yükselirken, yapraklarda giderek azalır. Selenyum biriktirmeyen olgun bitkilerde ise selenyum içeriği tohumda ve kökte aynıdır ancak az miktarlarda selenyum gövde ve yapraklarda da bulunur. Selenyumun bitkideki dağılımı, bitkiye verilen selenyumun formuyla ve konsantrasyonu, ortamda bulunan diğer bileşiklerin konsantrasyonlarıyla da ilgilidir (Terry ve diğ. 2000).





**Şekil 2.3.** Selenyum biriktiren bitkilerde selenat alımı ve Se birikimi

Sulfatın köklerden absorblanması sırasında selenatla yarıştığı gözlenmiştir (Ulrich ve Shrift 1968). İki anyonun da sülfat taşıyıcıları tarafından hücre içine alındığı, mayalarla yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Breton ve Surdin-Kerjan 1977, Takahashi ve diğ. 1997, Shibagaki ve diğ. 2002). Hem selenat hem de sülfat, kök epidermal hücrelerinin plazma membranlarından içeri elektrokimyasal gradientlerine karşı taşınırlar. Taşıma işlemine her iyon için üç protonun ko-transportu eşlik eder (Lass ve Ullrich-Eberius 1984, Hawkesford ve diğ. 1993).

İlk bitki kökenli sülfat taşıyıcı proteini kodlayan gen tropikal *Sylosanthes hamata* bitkisinden izole edilmiştir (Smith ve diğ. 1995). Daha sonra bu gen *Arabidopsis thaliana*, soya, arpa ve mısır gibi çeşitli bitkilerde de tanımlanmıştır. Sülfat taşıyıcı genler mantarlara ve hayvanlara ait proton/sülfat ko-taşıyıcılarına işlevsel olarak akrabalık göstermektedir (Leustek ve Saito 1999). Bitki sülfat taşıyıcı proteinlerin

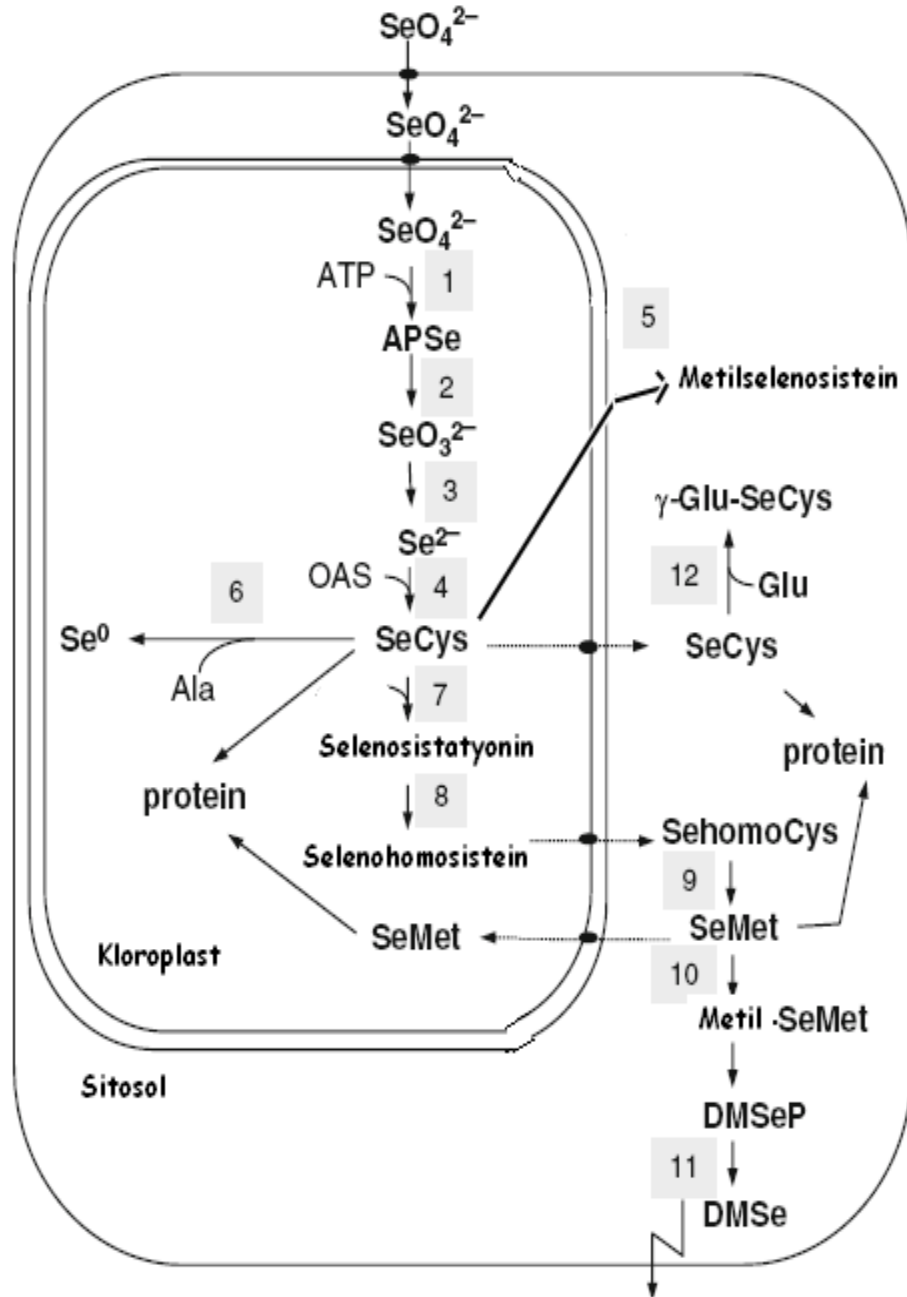
tahmini ikincil yapıları 12 adet transmembran domen içerdiklerini ortaya koymaktadır (Smith ve diğ. 1995, Smith ve diğ. 1997, Takahashi ve diğ. 1997). Yapılan çalışmalar Se hiperbiriktiricilerinin sülfat yerine selenat absorbladıklarını, biriktirmeyenlerin ise sülfatı hücre içine almayı tercih ettiklerini ortaya koymuştur (Bell ve diğ. 1992).

Selenat, selenit gibi inorganik ve SeMet gibi organik bileşiklerin hücre içinde metabolize edilmelerinde farklılıklar vardır. Asher ve arkadaşları (1977) kesilmiş domates köklerine selenat uygulayarak ksilem içinde selenatın besi ortamından 6-13 kat daha fazla olduğunu saptadılar. Diğer taraftan selenit uyguladıklarında, selenit miktarının ortamdaki selenit miktarından daha az olduğunu ve selenyumun bitki içinde daha çok selenat ve selenotrisülfat şeklinde olduğunu belirlediler. Benzer sonuçlar <sup>75</sup>Se-selenat ve <sup>75</sup>Se-selenit uygulanmış Se hiperbiriktiricisi olan *Astragalus crotalariae* ve Se biriktirmeyen *Astragalus lentiginosus*'ta da gözlenmiştir (Shrift ve Ulrich 1969). Bu bitkilere 1 saat boyunca selenat uygulandığında bitkilerde bulunan Se'un % 98'i selenat olduğu saptanmış, selenit uygulandığında ise *A. crotalariae*'nin % 4 selenit, % 2 selenat ve % 92 MeSeCys içerdiği belirlenmiştir. Buna karşın, *A. lentiginosus*'da % 51 selenit, % 23 selenat ve % 19 SeMet bulunmuştur. Bütün bu bulgular selenitin selenattan daha hızlı biçimde organik bileşiklere indirgenliğini göstermiştir.

İnorganik Se bileşenlerinden selenat ve selenitin metabolize edilmesini takiben bitki dokularındaki dağılımı ve bu dağılımın bitki gelişim aşamalarına göre değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Selenatın köklerden gövdeye taşınımı selenitten ve organik selenyum bileşiklerinden daha kolay olmaktadır. Selenatın yaşlı dokularda biriktiği gözlemlenirken, MeSeCys gibi organik bileşiklerin genç dokularda biriktiği bulunmuştur (Pickering ve diğ. 2000). Pickering ve arkadaşları çalışmalarında selenat ve sülfatın *A. bisulcatus*'un yaşlı yapraklarında vakuollerde biriktiğini saptamışlardır. Bitkinin genç yapraklarında ise indirgenmiş Se ve S bileşikleri bulunduğu belirlenmiştir. Dahası, genç yapraklar Se ve S bileşiklerini sırasıyla %99 ve %48 oranında içerirler. Bu araştırmalar sülfatın bitkilerde (kökler hariç) en çok bulunan S formu olduğunu göstermiştir. Bu bilgiler ışığında gelişim sırasında Se hiper biriktiricilerinde Se içeren organik bileşiklerin (çoğunlukla MeSeCys) genç dokulardan daha genç dokulara taşındığı söylenebilir. Daha önceki çalışmalar Se'un daha çok köklerde ve tohumlarda biriktiğini gösterse de HPLC-ICPMS (High Performance

Liquid Chromatography- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) çalışmaları selenat uygulanmış *B. juncea* bitkilerinde selenyumun % 80 oranında gövdede biriktiğini ortaya koymuştur. Selenyum hiperbiktiricilerinde selenatın biriktirmeyenlere kıyasla farklı dağılımı bu bileşiğin organik bileşiklere indirgenmesinin birikim ve tolerans için gerekli basamak olduğunu düşündürmektedir.

Bugüne kadar yapılan hiçbir çalışmada selenatın kloroplastlara taşındığı saptanmamıştır. Ancak sülfat asimilasyonu kloroplastlarda gerçekleşmektedir. Bu nedenle selenatın da bu organelle taşındığı düşünülmektedir. ATP sülfürilaz (APS, E.C. 2.7.7.4) bitkilerde sülfat asimilasyon metabolik yolunun ilk enzimidir (Leustek ve diğ. 1994). Bu enzimin hem adenzin 5'- fosfo sülfat hem de adenzin 5' fosfo selenat (APSe) oluşumunu katalizlediği bilinmektedir (Shaw ve Anderson, 1974, Murillo ve Leustek, 1995). APSe kararsız bir bileşiktir ve *in vitro* olarak hemen AMP (Adenzin mono fosfat) ve selenata parçalanır bu işleme selenoliziz denir. ATP sülfürilaz aktivitesi de bu şekilde ölçülür (Renosto ve diğ. 1993) (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Bitkilerde Se Metabolizması (1) ATP sülfürlaz, (2) APSe redüktaz, (3) Glutasyon, (4) OAS tiol liyaz, (5) SMT, (6) Selenosistein liyaz, (7) sistatyonin- $\gamma$ -sentaz, (8) sistatyonin- $\beta$ -liyaz, (9) metionin sentaz, (10) metionin metiltransferaz, (11) DMSP liyaz, (12)  $\gamma$ -glutamilsistein sentaz

*Schizosaccharomyces pombe* ATP sülfürlaz geninde yapılan ‘null’ mutasyonları selenat toleransını artırmış ve 10 kata kadar fazla selenyum birikimini tetiklemiştir (Banszky ve diğ. 2003, Raspor ve diğ. 2003). Bu mutantlar çok düşük düzeyde ATP sülfürlaz aktivitesi gösterir. Bu çalışma ile potansiyel toksik organo-selenyum bileşiklerinin ATP sülfürlaz aktivitesi olmayınca üretilmediği ve hücrelerin selenata bu sayede direnç

kazandığını gösterilmiştir. Selenat uygulaması ayrıca selenatın sülfatla yarışması sebebiyle sülfat açlığına yol açabilir ve böylece sülfat taşıyıcılarını aktive ederek daha çok selenat birikimine sebep olabilir. ATP sülfürilazın yüksek miktarda anlatımı ise *B.juncea* da glutasyon birikimini 2 kat artırmış ve yapraklarda 2-3 kat fazla Se birikimine neden olmuştur. Ayrıca selenat indirgenmesi % 50 oranında artmıştır (Pilon-Smits ve diğ. 1999). Sors ve arkadaşları (2005) aynı gen *Arabidopsis thaliana*'da yüksek anlatım yaptığında selenat indirgenme oranının yükseldiği sonucuna ulaşmışlardır. Ancak bu araştırmacılar bitkide selenat toleransının ve birikiminin azaldığı sonucuna varmışlardır. *Arabidopsis thaliana*'ya ait APS2 geni tütün bitkilerine aktarılmış ve bu transgeniklerde selenat toleransında farklılık saptanmamıştır. Selenyum hiper biriktiricilerinden ve biriktirmeyen bitkilerden izole edilen ATP sülfürilaz geninin kodladığı enzimin kinetik özellikler bakımından farklı olmadığı saptanmıştır.

APS redüktaz (E.C. 1.8.99.2) APSe'nin sülfite indirgenmesini katalizleyen enzimdir ve sülfat asimilasyonunu kontrol eden enzim olduğu düşünülmektedir (Setya ve diğ. 1996, Suter ve diğ. 2000). APSe selenite indirgendiğinde selenide dönüşüm glutasyon tarafından enzimatik olmayan yolla yapılır (Şekil 2.4). Bunun kanıtı *in vitro* SeCys sentezidir. OAS (o-asetilserin), selenit, sistein sentaz, glutasyon redüktaz, glutasyon ve NADPH (Nicotinamid adenin dinükleotid fosfat) varlığında selenid oluşumu sadece enzimatik olmayan dönüşüm ile gerçekleşebilir (Ng ve Anderson, 1978). Bu bilgiler ışığında selenit indirgenmesinin enzimatik olmadığı söylenebilir. APS redüktaz transkript seviyesi ve enzimatik aktivitesi, Se açlığı (Maruyama-Nakshita ve diğ. 2003), Cd uygulaması (Heiss ve diğ. 1999, Lee ve Leustek, 1999) ve oksidatif stresle (Bick ve diğ. 2001) düzenlenebilir. Bitkilerde APS redüktaz enzimi gerekliliği, ATP sülfürilaz reaksiyonu ürünleri APSe ve pirofosfat, sülfat aktivasyonun ilerlemesi için hemen metabolize edilmesi nedeniyle APS redüktazın Se toleransı ve birikimindeki rolü araştırılmıştır (Muller ve diğ. 1997, Saito, 2004). *Pseudomonas aeureginosa*'ya ait APS redüktaz geninin *A.thaliana*'da anlatımı ile sülfat indirgenme kapasitesinin arttığı kanıtlanmıştır (Tsakraklides ve diğ. 2002). Selenat uygulandığında ise bitkiler % 65 – 79 oranında selenat indirgenmesinde artış sağlamışlardır. Bu sonuçlar bitkide APS redüktazın APSe'yi indirgeme kapasitesinin olduğunu ortaya koymuştur (Sors ve diğ. 2005). Aynı çalışmada selenyum biriktirme ve tolere etmede farklılık gösteren sekiz *Astragalus* türünde APS redüktaz aktivitesinin farklılık göstermediğini ortaya

koymuştur. Bu sonuçlar ile APSe'nin indirgenmesinin APS ile aynı yolu izleyip izlemediğinin açık olmadığı saptanmıştır.

Sistein üretiminde son metabolik basamaklar serin asetil transferaz (SAT, E.C.2.3.1.30) ve o-asetilserin tio-lyaz (OAS-TL, E.C.4.2.99.8) ile katalizlenir. SAT, serinden ve asetil-Coadan o-asetilserin (OAS) oluşumunu katalizler. OAS-TL, sistein oluşturmak üzere sülfidi OAS ile asimile eder. Bitkilerde ve bakterilerde SAT ve OAS-TL sistein sentezi için kompleks bir yapı oluşturur ve sistein sentaz (E.C.2.5.1.47) olarak isimlendirilir (Şekil 2.4) (Kredich 1992, Bogdanova ve Hell, 1997). Ng ve Anderson (1978) Se hiperbiriktiricilerinden ve biriktirmeyen bitkilerden izole ettikleri Cys sentaz enzimlerinin katalitik kapasitelerinin farklı olmadığını ortaya koymuştur. SAT reaksiyonu sistein tarafından 'feedback' inhibisyon ile kontrol edilir (Noji ve diğ. 1998, Saito ve diğ. 2000, Berkowitz ve diğ. 2002, Noji ve Saito, 2002). *A.thaliana*'ya ait SAT-A'nın transgenik tütünde anlatımı OAS seviyesinde, sisteinde ve glutasyon seviyesinde yükselmeye sebep olmuştur. Ancak bu bitkiler selenyum birikiminde ve toleransında farklılık göstermemiştir ayrıca selenyum hiper biriktiricisi *Astragalus*larda da Se birikiminin SAT aktivitesi ile ilişkili olmadığı ortaya konmuştur (Wirtz ve Hell, 2003, Sirko ve diğ. 2004).

Sistein ve/veya selonosistein metiyonin biyosentez yoluna metiyonin/selenometiyonin oluşturmak üzere, sistasyonin ve/veya selonosistasyonin ve homosistein/selenohomosistein olarak katılabilir (Lauchli, 1993). O-fosfohomoserin ile selonosisteğinin selonosistasyonine dönüşümünü katalizleyen enzim sistasyonin  $\gamma$  sentaz (Cgs E.C. 2.5.1.48) enzimidir. Dawson ve Anderson'un çalışmaları (1988) ıspanak sistasyonin  $\gamma$  sentazının SeCys'e sisteinden daha çok afinite gösterdiğini ispatlamıştır. Selenosistasyonin bazı selenyum hiperbiriktirici bitkilerde ve biriktirmeyen bitkilerde bulunabilir (Martin ve diğ. 1971). Bu metabolik basamak SeCys ve Cys (sistein) için aynıdır. Selenyum hiperbiriktiricisi olan *Stanleya pinnata* total selenyumun % 17 sine kadar selenosistasyonine sahip olabilir (Shrift ve Virupaksha, 1965, Kotrebai ve diğ. 2000). Selenyum biriktiren ve biriktiremeyen *Astragalus*lar arasında yapılan çalışmada her iki gruptan elde edilen Cgs enziminin benzer özelliklere sahip olduğu saptanmıştır (Dawson ve Anderson, 1989). Yine bu çalışmada selenyum birikimi ve toleransının bu enzimle ilişkili olmadığı ortaya konmuştur. *B.juncea*'da Cgs anlatımının selenyumun

uçucu bileşiklerinin 2-3 kat artmasına sebep olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışma ile bitkilerde uçucu selenyumlu bileşiklerin oluşturulmasının kısıtlayıcı basamağının Cgs enzimi olduğu ortaya konmuştur (Van Husyen ve diğ. 2003).

Sistasyonin  $\beta$ -liyaz selenosistasyoninin selenohomosisteine dönüşümünü katalizler. Bu enzim selenyum biriktirmeyen bitkilerde sistasyonin ve selenosistasyonini birbirinden ayıramaz (McCluskey ve diğ. 1986). *A. bisulcatus*, *A. racemosus* ve *N. amplexicaulis* gibi hiperbiriktirici bitkilerde yapılan çalışmalarda çok düşük miktarda sistasyonin  $\beta$ -liyaz aktivitesi saptanmıştır. Bu bulgular S ve Se'un aynı metabolik yolu paylaştığını doğrular (McCluskey ve diğ. 1986). Metionin biyosentezinin son basamağı metionin sentaz tarafından katalizlenir (Şekil 2.4). Bu enzim sitosolde lokalize olmuştur (Hesse ve diğ. 2004). Ancak bir izoformu *A. thaliana*'da kloroplastlarda saptanmıştır. Bu izoformun homosistein metilasyonu yoluyla metionin *de novo* sentezinde görev aldığı düşünülmektedir (Ravanel ve diğ. 2004). Metionin sentaz N<sup>5</sup>- metiltetrahidrofolatı metil verici olarak kullanır. SeMet, hiperbiriktiricilerde çok düşük miktarda üretilir. Bu sayede selenyum proteinlere katılmayan MeSeCys, GGMeSeCys ve selenosistasyonin üretiminde kullanılır (Ellis ve Salt, 2003).

SeMet sentezlendikten sonra, metil grubu eklenerek dimetil selenid'e (DMSe) dönüştürülebilir (Lewis ve diğ. 1974). Bu bileşik Se biriktirmeyen bitkilerde en sık oluşturulan uçucu bileşiktir. Metionin metiltransferaz (MMT, E.C.2.1.1.12) enzimi SeMet'e metil grubu eklenmesini katalizleyen enzimidir. Bu enzim bitkilerde ayrıca S-metilmetionin (SMM) oluşumunu katalizler (Pimenta ve diğ. 1998). Bu bileşik SMM hidrolaz enzimi ile dimetil sülfid'e çevrilir. SMM hidrolaz ayrıca SeMet'nin DMSe'ye dönüşümünü de katalizler. DMSe üretiminin alternatif yolu, SeMet'nin ara metabolit olan dimetil selenoniopropionat'a (DMSeP) dönüştürülmesidir. Selenat uygulanmış *Spartina alterniflora*'da taze ağırlıkta 0,4  $\mu$ mol DMSeP/g üretilmiştir (Ansele ve diğ. 1999).

Bitkiler ayrıca selenyumu dimetildiselenid şeklinde uçucu hale getirebilirler. Kükürt biriktirebilen *Brassica* ve *Allium* gibi bitkiler dimetildisülfid (DMDS) sentezleyebilirler. Bu bileşik metilsistein-sülfoksitten (MeCysSo) oluşturulur. MeCysSo bu bitkilere karakteristik tatlarını ve kokularını verir (Whitaker 1976, Benevenga ve diğ. 1989,

Kubec ve diğ. 1998). Hall ve Smith (1983), sistein-sulfoxid liyaz (C-S liyaz, E.C.4.4.1.4) enziminin kabakta MeCysSo'yu oksitleyerek *in vitro* metanetiol oluşturabildiğini saptamışlardır. Bu enzimin *Brassica* ve *Allium*da da bulunması metaneseleniol ve DMDSe oluşumunu sağlayabileceğini düşündürmektedir. Se hiperbiriktircisi olan ve yüksek miktarda MeSeCys birtiren *Astragalus racemosus*'da DMDSe varlığı görülmüştür (Griffiths ve diğ. 2002).

Selenyum biriktirici bitkilerde metabolizmasında, selenosistein proteinlere katılmayan aminoasitlere metabolize edilir. Selenyum biriktiricisi olan *Astragalus* türlerinde selenosistein'e metil bağlanır ve metilselenosistein (MeSeCys) oluşturulur. Metilselenosistein daha sonra gaz halindeki dimetildiselenide ya da glutaminle birleşerek  $\gamma$ -glutamil Se-metil-selenosisteine çevrilebilir. Diğer biriktirici bitkilerde ise selenosistein, selenosistatona dönüştürülür (Terry ve diğ. 2000). Selenosistein metiltransferaz (SMT) enzimi selenosistein'den metilselenosistein oluşturulmasını katalizleyen enzimdir. İlk olarak *Astragalus bisulcatus*'tan izole edilen ve bitkilerde selenyum birikiminden sorumlu olan SMT enzimi, 338 aminoasitten oluşur ve sentezinden sorumlu cDNA dizisi 1447 bç. uzunluktadır (Neuhierl ve diğ. 1999). Yapılan klonlama çalışmaları sonucunda *Arabidopsis thaliana*'ya, *Astragalus*'un selenosistein metiltransferaz enzimini kodlayan SMT (SMTA) geni aktarılmış ve doğal olarak selenyum biriktiricisi olmayan *Arabidopsis thaliana*'dan selenyum biriktiren *A. thaliana* hatları elde edilmiştir (Ellis ve diğ. 2004). Bu sonuç SMTA geninin kodladığı selenosistein metiltransferaz enziminin selenyum birikiminden sorumlu olduğunu göstermektedir. Bu enzim *in vitro* koşullarda SeCys'ye Cys'den daha çok afinite gösterir. *A.thaliana*'da bu genin yüksek miktarda anlatımı ile hem MeSeCys hem de MeCys oluştuğu gözlenmiştir. Bu gözlem bu enzimin her iki metaboliti de metillediğini göstermiştir. SMT proteini *E. coli*'deki yagD proteinine %40'ın üzerinde benzerlik göstermektedir. YagD homosistein, selenohomosistein ve selenosisteini metilleyebilmektedir. Ayrıca protein veritabanlarında yapılan araştırmalar SMT proteinin aminoasit dizisinin *A.thaliana* ve *Oryza sativa* homosistein metiltransferazlarına sırasıyla % 70 ve % 65 oranında benzediğini göstermiştir. SMT ve HMT'nin (homosistein metiltransferaz) benzer yapı ve fonksiyona sahip oldukları, sistein ve homosisteini ve bunların selenyum analoglarını metilleyebilmeleriyle saptanmıştır. *A.thaliana*'da SMT'nin sürekli anlatımı ile MeSeCys, MeCys ve bunların



türevleri GGmeSeCys/GGMeCys (gamaglutamil-metilselenosistein/gamaglutamilmetilsistein) üretilmiştir (Ellis ve diğ. 2004, LeDuc ve diğ. 2004). Bu bilgiler *Astragalus* 'ta SMT'nin hem MeCys hem de MeSeCys'nin biyosentezini yaptığını göstermiştir. *Astragalus bisulcatus* metabolize ettiği Se'un % 90'ından fazlasını MeSeCys'e çevirir. 8 *Astragalus* türünde yapılan çalışmada SMT aktivitesinin değişkenlik gösterdiği ve Se birikimiyle doğrudan bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Sors ve diğ. 2005). *A.bisulcatus*'dan SMTA geninin izolasyonunu takiben SMTA ile aynı görevi gören, SMT'lerin diğer bitkilerdeki varlığına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır ve *Brassica oleracea* ile *Camellia sinensis*'de de SMT geninin varlığı belirlenmiştir (Lyi ve diğ. 2005, Zhu ve diğ. 2008).

#### 2.4. FİTOREMEDİYASYON VE SELENYUM

Toprakta ortalama 0.4 mg/kg olan Se konsantrasyonu bölgeden bölgeye değişkenlik göstermektedir (Fordyce, 2005). Birçok canlı için Se esas element olduğu için dünya genelinde Se'a olan ilgi giderek artmaktadır. İnsanlar ve hayvanlar için Se eksikliği ve toksisitesi konsantrasyon değerleri arasında dar bir aralık bulunmaktadır. Her iki durum da dünyanın çeşitli bölgelerinde gözlenmektedir (Fordyce ve diğ, 2005).

Se içeren kayaların zaman içinde aşınması, elektrik santralleri, rafineri atıkları ve endüstriyel atık sular selenyumun doğaya salınmasına yol açar. Bu durum tarımsal açıdan dünyada önemli sorunlara yol açmaktadır (Terry ve diğ. 2000). Doğada yüksek miktarda bulunan ve potansiyel olarak toksik olan selenyumun, kontamine olmuş sulardan ve topraktan temizlenmesi çok önemlidir. "Fitoremediyasyon", kirlilik yaratan maddelerin bitkiler kullanılarak temizlenmesi, stabilize edilmesi veya detoksifiye edilmesi anlamına gelmektedir (Eapen ve D'Souza, 2005). Selenyum ve sülfür kimyasal olarak benzer yapıda olduklarından bitkiler selenyumu topraktan özütleyebilmekte ve temizleyebilmektedir. Bazı *Astragalus* türlerinin Se biriktirici olması, bu bitkilerin fitoremediyasyon amacıyla kullanılmasını gündeme getirmiştir. Ancak bu bitkilerin yavaş büyümesi ve çetin doğa şartlarına uygun yapıda olmaması bu fikri pratikte mümkün kılmamaktadır. Toprakların bitkilerle temizlenebilmesi için ideal bitki türleri yüksek miktarda Se biriktirebilmeli ya da selenyumu uçucu bileşiklerin yapısına katıp atmosfere salılabilmelidir (Zhu ve diğ. 2009). Bitkilerde Se metabolizması

ile yapılan genetik çalışmalar şimdiye kadar selenat indirgenmesi ve SeCys'nin proteinlere katılımının engellenmesi üzerine olmuştur. Selenatın selenite indirgenmesi bu metabolizmada ana basamaklardan biridir. Se metabolizmasında bu basamağın ATP sülfürlaz (APS) enzimi ile aşılabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. *Arabidopsis thaliana*'da bu enzimi şifreleyen gen *Brassica juncea*'ya aktarılmış ve sonuçta oluşturulan transgeniklerin Se'un organik formlarını biriktirirken yabani tiplerin selenat biriktirdikleri gözlenmiştir. İlginç olan bu transgenik bitkilerin yabani tip bitkilere oranla 2-3 kat fazla Se biriktirmeleridir. Bunun sebebinin artmış Se asimilasyonu olduğu ve Se'a kontrol bitkilerinden daha fazla tolerans göstermeleri olduğu saptanmıştır (Pilon-Smits ve diğ. 1999). ATP sülfürlaz selenat indirgenmesinde rol oynar ve selenatın organik Se formlarına dönüşümünde kısıtlayıcı basamak olduğu bilinmektedir.

Transgenik bitkilerde yüksek miktarda APS anlatımı Se'un uçucu formlarına dönüştürülmesini sağlamadığından metabolizmada bu işlevi üstlenmiş diğer enzimlerin kullanılması gündeme gelmiştir. Fizyolojik volatilizasyon çalışmaları SeCys'nin SeMet'e dönüşümü üzerinedir çünkü SeMet'in SeCys'den daha hızlı uçucu bileşiklere dönüştüğü saptanmıştır. SeCys'nin SeMet'e dönüşümü sistasyon gama sentaz (CgS) tarafından yapılmaktadır. *A. thaliana*'nın CgS geni *B. juncea* bitkilerine aktarılmış, ve bu bitkilerin yabani tiplere göre 2-3 kat daha fazla uçucu formda Se'lu bileşikler saldıkları saptanmıştır. Kontrol bitkilerine göre % 40 daha az Se biriktiren bu bitkiler, Se'a daha toleranslı hale gelmişlerdir (Van Husyen ve diğ. 2003).

Se toksisitesi çoğunlukla SeCys'nin proteinlere katılması ve proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını bozması olarak tanımlanır. Bu sebeple, SeCys'nin proteinlere katılmayan başka formlara dönüştürülmesi ile Se toleransının artabileceği düşünülmüştür. SeCys'nin metillenmesi bir hiperbiriktirici olan *Astragalus bisulcatus* tarafından yapılmaktadır. Se hiperbirikiminden sorumlu SMT enzimi SeCys'yi metiller ve MeSeCys oluşturarak toleransı artırır. Bu non-protein aminoasit hücrelerde biriktirilebilir (LeDuc ve diğ. 2004). Bu bileşik daha sonra uçucu formlara dönüştürülebilir. *A. bisulcatus* SMT geni iki farklı bitkiye aktarılmış (*Arabidopsis thaliana* ve *Brassica juncea*) ve her iki bitki de yüksek miktarda selenite maruz bırakılmıştır. Bu transgeniklerin SeCys'i MeSeCys'e çevirdikleri saptanmış ve bu

yetenek sayesinde Se biriktirme kapasitelerinin arttığı gözlenmiştir. Transgenik *A. thaliana*'nın kuru ağırlıkta 1000 mg/kg, *B. juncea*'nın ise 4000 mg/kg Se biriktirdiği belirlenmiştir (LeDuc ve diğ. 2004).

Biriktirilen Se'un elementel Se olarak çöktürülmesi birçok bakteri tarafından kullanılan bir detoksifikasyon mekanizmasıdır. Buna ek olarak SeCys'nin elementel Se'e dönüşümü Se'a ihtiyacı olan organizmalarda Se'un proteinlere katılımı için ilk basamaktır (Mihara ve diğ. 2002). SeCys'i alanin ve elementel Se'a dönüştüren enzimler SeCys liyazlar (SL) olarak bilinirler. Bu bileşiğin alanin ve elementel Se'a yıkılması bitkilerde Se toleransını artırmak amacıyla kullanılmıştır. Fare SL enzimini kodlayan gen *A. thaliana*'ya ve *B. juncea*'ya aktarılmıştır. Bu genin yüksek miktarda anlatım yapması Se'un proteinlere katılımını azaltmıştır (Pilon-Smith ve diğ. 2002, Garifullina ve diğ. 2003).

İkili transgenik *B. juncea* bitkileri APS transgenikleri ve SMT transgeniklerinin çaprazlanması ile oluşturulmuşlardır. APSxSMT transgenikleri yabani tip kontrol bitkilerine göre 8 kat daha fazla MeSeCys biriktirmişlerdir (LeDuc ve diğ. 2006). Bu sonuca göre 2 enzimin birlikte kullanımı hem Se alınımı hem de indirgenmesi ve birikimi açısından daha faydalıdır.

Se biriktirme kapasitesi artırılmış transgenik bitkiler fitoremediyasyon için kullanılabilir. Bu kapasitelerinin araştırılması için toprakta yetiştirme çalışmaları mutlaka yapılmalıdır. Yapılan sera çalışmalarında saksıda yetiştirilen APS geni aktarılmış transgenik *B. juncea* bitkileri kontrol bitkilerine göre 3 kat fazla Se biriktirmişlerdir. Aynı bitkinin CgS geni içeren transgeniklerinin ise yabani tiplere göre % 40 daha az Se içerdikleri saptanmıştır. Bu sonuçlar laboratuvar çalışmalarını doğrular niteliktedir (Van Husyen ve diğ. 2004). San Joaquin Vadisinde (California, USA) yapılan tarla çalışmalarında ise APS geni aktarılmış transgenik *B. juncea* bitkileri kontrol bitkilerine göre 4 kat fazla Se biriktirmişlerdir (Banuelos ve diğ. 2007). Bu sonuçlar hem laboratuvar hem de sera çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

## 2.5. REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ ve GEN İZOLASYONU

Rekombinant DNA teknolojisi genlerin ait oldukları canlının genomundan izolasyonuna ve sayısının çoğaltılmasına (klonlama), yapı ve işlevlerinin araştırılmasına, değişik türlere ait organizmalara aktarılmasına ve ürünlerinin bol miktarda elde edilmesine olanak verir. Rekombinant DNA teknolojisi, bir organizmadan herhangi bir yolla izole edilen bir genin (DNA parçasının) uygun bir konağın içine aktarılarak orada çoğaltılmasını ve bazen de anlatım yapmasını amaçlayan çalışmalara ait tekniklerin toplamıdır. İzlenen olay dizisi genelde bir organizmadan elde edilen ve içinde istenilen geni taşıyan DNA parçalarının, taşıyıcı özellikte bir DNA molekülüne (vektör) bağlanarak rekombinant DNA oluşturulması, rekombinant DNA moleküllerinin uygun bir konak hücreye aktarılmasıyla orada çoğaltılmasıdır. Gen klonlaması olarak adlandırılan bu süreçte konak hücreler çoğaldıkça rekombinant DNA molekülleri döllerle geçerler ve yavru hücrelerde de kopya sayılarını artırırlar. Buna göre, gen klonlaması (ya da DNA klonlaması) tek bir genden (DNA molekülü parçasından) kökenlenen ve hepsi birbirinin aynı olan bir DNA popülasyonu elde etmektir. Bu teknolojiye ayrıca çoğu kez klonlanmış bir genin kendisi için yeni konakta anlatımının sağlanmasıyla ürününün elde edilmesi de amaçlanmaktadır (Temizkan, 1994, Griffiths ve diğ. 1999). Gen klonlamasına yönelik olarak ve ardışık aşamaları kapsayan çalışmaların her evresinde araştırmacının amacına ve tercihinin uygun olarak çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır. Genellikle kullanılan yöntemlerden biri, bir organizmadan izole edilip saflaştırılmış DNA moleküllerini, çift zincirli yapılarını bozmadan parçalamaktır. Klonlanması istenen gen bu parçalardan birinin içinde bulunur. DNA yı parçalamada önceleri bir ölçüde mekanik yöntemlerden de (kontrollü çalkalama, ultrasonik ses dalgaları uygulaması vb.) yararlanılmakla birlikte DNA yı parçalara ayırma işleminde en başarılı sonuçlar restriksiyon enzimleriyle alınmıştır. Gen izolasyonunda diğer bir yöntem ise DNA kopyasının (cDNA) elde edilmesidir. Bunun için, hücrelerden klonlanması amaçlanan genin transkripsiyon ürününü de içeren RNA izole edilir. Daha sonra, ters transkriptaz enzimiyle bu RNA moleküllerinin tamamlayıcısı olan DNA kopyaları çıkarılır. Meydana gelen RNA/DNA melezinin RNA kısmı enzimin ribonükleaz H aktivitesiyle hidroliz edilip yok edilir, daha sonra, DNA polimeraz aktivitesiyle cDNA çift zincirli biçime getirilir. Bu yöntem özellikle fazla miktarda DNA içeren, karmaşık gen yapısı gösteren ve çoğu geninde intron bulunan ökaryotik organizmalardan gen

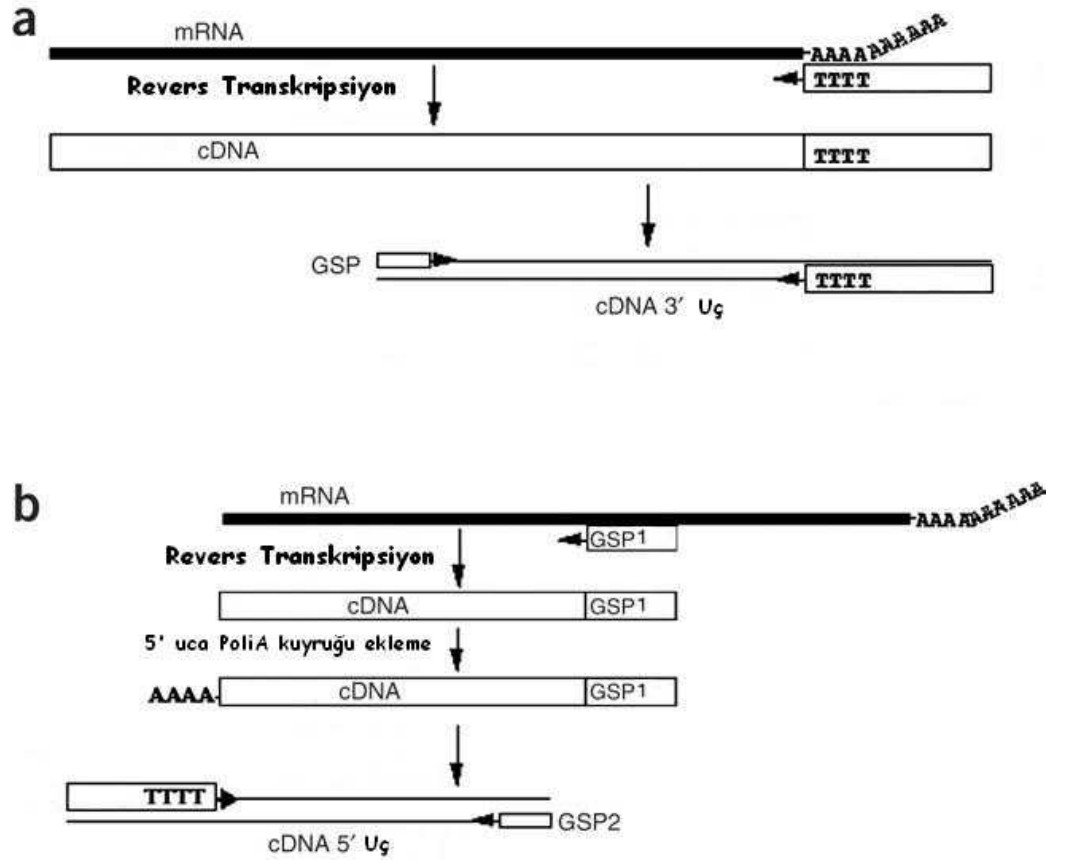
izolasyonunda kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile son yıllarda gen izolasyonunda çok başarılı sonuçlar alınmaktadır. 1986 yılında geliştirilmiş olan PZR yöntemi DNA moleküllerindeki özel dizilerin (örneğin istenilen bir genin) canlı hücre içine sokulmadan izole edilip çoğaltılmasına olanak vermektedir (Griffiths ve diğ. 1999). Bunun için sadece, bu dizinin (aynı organizmadaki ya da yakın bir başka organizmadaki) az da olsa bir kısmının daha önceden bilinmesi gereklidir. İzole edilen geni taşıyan DNA parçalarının çoğalmasını sağlamak üzere onlara taşıyıcılık görevi yapacak uygun DNA moleküllerine bağlanmasıyla elde edilen moleküllere rekombinant DNA adı verilmektedir. Genlerin bulunduğu DNA parçalarının bağlandığı ve vektör (taşıyıcı) olarak adlandırılan DNA moleküllerinin, kolaylıkla hücre içine girebilmeleri ve bağımsız replikasyon yapabilme özellikleri olması gerekir. Rekombinant DNA parçalarının hücre içine sokulmalarını takiben, bu DNA molekülünü almış hücrelerin seçimi gereklidir. Bu amaçla çeşitli işlemler uygulanır. Konak hücrelerde vektörün varlığı işaret genler yardımıyla olur. Aynı zamanda plazmit izolasyonu ve koloni PZR gibi yöntemler, vektörün ve aktarılan genin hücre içine girip girmediği hakkında doğrudan bilgi verebilir. Konak hücrelerden rekombinant DNA'yı alanlar doğrudan nükleik asit melezleme yöntemleri (Southern Blotlama) ile de seçilebilir. Daha sonra klonlanan genin dizisi analiz edilerek internet üzerindeki gen bankası veritabanları ile kıyaslamalar sayesinde homoloji analizleri yapılır. Yabancı genlerin anlatımları için bazen sadece transkripsiyon düzeyinde kontrol edilen ekspresyon vektörleri kullanılabilir (Griffiths ve diğ. 1999). Geliştirilmiş en basit ekspresyon vektörleri sadece *E. coli* genlerinden birinin promotörünü taşırlar. Bu vektörlerde bir *E. coli* genine ait promotör yabancı DNA parçasının gireceği tek restriksiyon yerinin hemen önüne yerleştirilir; böylece, restriksiyon yerine aktarılan DNA parçasındaki gen bu promotörün kontrolü altında bakteride transkripsiyon yapabilir. Sadece bir *E. coli* promotörünü taşıyan, yani sadece transkripsiyon aşamasında kontrol edilen, ekspresyon vektörlerinin rekombinant DNA teknolojisinde birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Ekspresyon vektörü geliştirilirken indüksiyon ya da represyon mekanizmasıyla düzenlenen promotörlerin kullanılması mümkündür (Griffiths ve diğ. 1999).

Herhangi bir organizmaya ait bir genin klonlanmasına ilişkin çalışmalarda, genellikle ilk önce bir kitaplık (genom veya cDNA kitaplığı) oluşturulabileceği gibi cDNA sentezi ve PZR gibi yöntemlerin bir arada kullanılması ile de gen izolasyonu yapılabilir. Son

yıllarda cDNA sentezi ve PZR'yi bir arada kullanarak gen izolasyonu yapma işlemi daha kısa süre içinde gerçekleştirilebildiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu işlemler için önceden araştırılan gene ait bir kısım dizi bilgisi gerekir (Griffiths ve diğ. 1999). Bir gene ait önceden bilinen dizi bilgisi sayesinde, genin transkriptinin uç kısımlarını elde etmeye olanak veren yöntem Rapid Amplified cDNA Ends (RACE) olarak adlandırılır ve son yıllarda genlerin izolasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **2.5.1. RACE (Rapid Amplified cDNA Ends)**

RACE (Rapid Amplified cDNA Ends), ilgilenilen genin RNA transkripti aracılığıyla bütün dizisini bulmaya yönelik olarak kullanılan bir yöntemdir (Frohman ve diğ. 1988). Yöntem, ilgilenilen RNA dizisinin cDNA kopyasının çıkarılmasıyla başlar. Bu işlem Revers Transkriptaz enzimi ile yapılmaktadır ve bu basamağı, sentezlenen cDNA'nın çoğaltılması için PZR işlemleri izler. Çoğaltılan cDNA kopyaları daha sonra dizilenir ve veribankasında daha önce başka organizmalarda tanımlanmış olan genin dizileriyle karşılaştırılır. RACE yöntemi RNA transkriptinin içinde bilinen kısa bir dizi sayesinde genin 3' ve/veya 5' uçlarının bulunmasını sağlar. Bu kısa dizi bilgisi ile 3' ve 5' uçlara ait, her bir uca doğru tasarlanan gene özgü primerler ile yapılan PZR işlemleri sonucunda, genin bilinmeyen dizilerinin çoğaltılması sağlanır. Genin 5' ucuna ait dizi bilgisine sahip olmak için izlenmesi gereken yol, 5' uca terminal transferaz enzimi sayesinde takılan poliA kuyruğuna tamamlayıcı oligoT ve tasarlanan gene özgü primerler ile PZR reaksiyonları yapmaktır. 3' uçta ise gene özgü primerlerin yanında halihazırda varolan poliA kuyruna tamamlayıcı oligoT ile PZR yapılır (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** a) 3', b) 5' RACE reaksiyonlarının akış şeması (GSP: Gene özgü primer, GSP1: Gene özgü primer 1, GSP2: Gene özgü primer 2)

## 2.6. *ASTRAGALUS*

18.000 türle yüksek yapılı bitkilerin üçüncü en kalabalık grubunu oluşturan *Astragalus* (Geven) cinsi bitkiler Leguminosae'nin Papilionaceae alt ailesine üyedirler. *Astragalus* cinsi özellikle Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika kıtalarında geniş dağılım gösterirler (Rios ve Waterman, 1997). Türkiye'de 400'den fazla türü bulunan ve bunların yaklaşık % 45'inin endemik türlerden oluştuğu bilinen (Akan ve Civelek, 2001) *Astragalus*ların, içerdikleri sekonder metabolitlerinin kardiovasküler, hipotensif, yatıştırıcı, analjezik, antimutajenik (Rios ve Waterman, 1997; Ebrahimzadeh ve diğ., 1999), diüretik (Shirataki ve diğ., 1997; Semmar ve diğ., 2001), antiinflamatuvar, karaciğer koruyucu, antiviral (Rios ve Waterman, 1997; Pistelli ve diğ., 2002), immunostimulant (Kurashige

ve diğ., 1999; Duan ve Wang, 2002), antimikrobiyal, sitotoksik (El-Sbakhy ve diğ., 1994; Karagöz ve diğ., 2007) ve antifungal (Pistelli ve diğ., 2002) gibi önemli farmakolojik aktivitelere sahip oldukları saptanmıştır. Geleneksel tıpta yüzyıllar boyunca yorgunluk, halsizlik, ateş, terleme, kas ağrısı, soğuk algınlığı, ishal belirtilerinin giderilmesinde, yaraların iyileştirilmesinde, astım, diabet, nefrit hastalıklarının (Çalış ve diğ., 1996), lösemi ve uterus kanserlerinin (Anulov ve diğ., 1995; Çalış ve diğ., 1996; Pistelli ve diğ., 2002) tedavisinde ilaç olarak kullanılmışlardır. Tıpta kullanımlarının yanısıra birçok *Astragalus* türü gıda sanayinde içecek ve katılaştırıcı ajan, tekstil sektöründe iplik, deri ve kumaşların işlenmesinde, hayvan yetiştiriciliğinde yem olarak halen kullanılmaktadır (Rios ve Waterman, 1997).

Yapılan analizler sonucunda *Astragalus* türlerinin kimyasal içerikleri bakımından benzerlikler gösterdikleri belirlenmiştir ve bu kimyasal maddeler birkaç ana grupta toplanmıştır (Rios ve Waterman, 1997). Bunlardan biri farmakolojik aktivitelerden sorumlu metabolitler olan polisakkaritler [galaktomannan (Anulov ve diğ., 1995), tragakantin, astragalanlar, astraglukanlar (Sinclair, 1998)] ve bir diğeri saponinler [triterpenoidler (Yahara ve diğ., 2000)], astragalosidler, astramembraininler (Yahara ve diğ., 2000; Hirotani ve diğ., 1994)] dir. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılan deneyler sonucunda polisakkaritlerin antikanser etki gösterdiği ve immun sistemi güçlendirdiği, saponinlerin ise antinflamatuar, analjezik, diüretik, hipotensif ve yatıştırıcı aktivitelere sahip oldukları saptanmıştır (Anulov ve diğ., 1995). *Astragalus*'larda bulunan diğeri önemli bir metabolit grubu da, fenolik bileşikler [kaempferol, quercetin (Semmar ve diğ., 2001), flavonoid glikozidler, flavonol glikozidler (Bedir ve diğ., 2000) ve izoflavonlar (Shirataki ve diğ., 1997)] dir. Fenolik bileşiklerden izoflavonların (kalikosin, afromormosin, isorhamnetin, ramnositrin, formononetin, odoratin) antiviral ve antioksidan aktivitelerden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Toda ve Shirataki, 1998).

İçerdikleri önemli kimyasal maddelerin yanı sıra *Astragalus* bitkilerinin kitle zıncığı (yapışkan özelliğe sahip öz su) nedeniyle ülkemiz açısından ayrı bir ekonomik önemi vardır. Yapışkan, sıkılaştırıcı, emülsifiye edici ve katılaştırıcı ajan olarak tıp, diş hekimliği, tekstil ve gıda endüstrisinde kullanılan kitle zıncığı, pek çok ülkeye ihraç edilmesi dolayısıyla Türkiye'nin önemli ekonomik bitkisel ürünlerinden biridir. Türkiye, İran ile birlikte hemen hemen tüm dünyanın ihtiyacını karşılayacak ölçüde



kitre zankı üretmektedir (Doğan ve diğ., 1985; Baytop, 1999). Türkiye’de *Astragalus* kökleri ayrıca antiperspirant, diüretik, tonik olarak ve diabet, nefrit, lösemi ve uterus kanserlerinin tedavisinde geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır (Bedir ve diğ., 1998).

### 2.6.1. *Astragalus chrysochlorus*

Çeşitli tez ve araştırma projeleri kapsamında, on yılı aşkın süre boyunca araştırma grubumuz tarafından üzerinde çalışılan *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae) bitkisinin (Şekil 2.6) bugüne kadar doku kültürü sistemleri kurulmuş (Turgut-Kara ve Arı, 2008; Hasaıçebi ve diğ. 2011), transgenik kök kültürleri elde edilmiş (Hasaıçebi, 2003), sitotoksik, antioksidan ve fagositik aktiviteyi artırıcı etkileri belirlenmiş (Hasaıçebi, 2003; Karagöz ve ark., 2007), bir elisitör olan maya özütü etkisiyle süspansiyon kültürlerinde PAL (fenilalanin amonyak liyaz) enzim aktivitesi ve total fenolik içeriğinin (Çakır ve Arı, 2009) arttığı saptanmış, maya özütünün kullanıldığı biyotik stres çalışmasında “differential display” metodu ile hücre süspansiyon kültürlerinde C4H (sinnamat-4-hidroksilaz) geninde anlatım farklılığı belirlenmiş (Turgut-Kara, 2007) ve *Astragalus chrysochlorus*’un sekonder selenyum biriktiricisi olduğu saptanmıştır (Arı ve ark., 2010).



**Şekil 2.6.** Sertavul-Mersin’de yetişen *Astragalus chrysochlorus* bitkisi

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ MATERYALİ VE DOKU KÜLTÜRÜ

Bitkisel materyal olarak kullanılan *Astragalus chrysochlorus* Boiss & Kotschy tohumları Haziran 2004 yılında Sertavul'dan (Karaman-Mut arası 35 km; 1600-1610 m) toplanmış ve Prof. Dr. Tuna Ekim tarafından teşhis edilmiştir (ISTF no: 40006).

**Familiya:** *Leguminosae (Fabaceae)*

**Cins:** *Astragalus*

**Tür:** *Astragalus chrysochlorus*, Boiss & Kotschy

##### 3.1.1. Besiyeri ve Kültürleme Koşulları

Bu tez kapsamında SMT geninin varlığı moleküler düzeyde araştırıldı. Bu amaçla bitkiler doku kültürü koşullarında 1 ppm, 5 ppm ve 25 ppm konsantrasyonda sodyum selenat içeren ve kontrol olarak sodyum selenat içermeyen MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerlerinde yetiştirildi.

*A. chrysochlorus*'un doku kültürü için kullanılan MS temelli besiyerleri Tablo 3.1'de verildi. MS besiyerleri hazırlanırken, inorganik tuzlar için Sigma'nın (M-5524) toz halindeki preparatları kullanıldı. 4.4 g'lık MS preparat içerikleri 900'er ml distile su kullanılarak tamamen çözündürüldükten sonra bu çözeltilere 30 g sukroz ilave edildi ve distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı. Çözeltilerin pH'ları 0.1 ve 1 N NaOH ile pH-metre yardımıyla 5.7-5.8'e ayarlandı ve bu çözeltilere % 0.8 agar ilave edildi. Hazırlanan katı besiyerleri otoklavda (121°C, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dakika) steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri çözeltileri 50-60 °C'ye kadar soğutuldu ve üzerlerine 0.22 µm por açıklığına sahip Millipore (Millex-GS) filtre ile steril edilmiş 1 mg/ml derişimdeki stok vitamin çözeltisi (Sigma M-3900)'den 1 ml eklendi. Su içinde

100 ppm konsantrasyonda hazırlanmış sodyum selenat stok çözeltisinden uygun miktar otoklavlanmadan önce besiyerlerine eklendi.

Bitkilerin yetiştirilmesi için bitki büyütme kabini [ $25\pm^{\circ}\text{C}$ , 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux (Heraeus, Vötsch, No: 440/0026/86)] kullanıldı.

**Tablo 3.1.** *Astragalus chrysochlorus* doku kültürü için kullanılan MS temelli besiyerlerinin kimyasal içeriği (besiyerlerinin pH'ları 5.7-5.8 dir)

İÇERİK	MS (mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.0
KNO <sub>3</sub>	1900.0
CaCl <sub>2</sub>	332.2
MgSO <sub>4</sub>	180.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0
Na <sub>2</sub> EDTA	37.26
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.80
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
Thiamin.HCl	0.1
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin.HCl	0.5
Glisin	2.0
Myo-inositol	100.0
Sukroz	30000
Agar	8000

### 3.1.2. Tohumların Çimlendirilmesi

*A. chrysochlorus* tohumları yüzey sterilizasyonundan önce bir gece saf suda bekletildi. Yüzey sterilizasyonu için tohumlar sırasıyla % 70'lik etil alkolde 1 dakika, % 5'lik ticari çamaşır suyunda (% 2'lik sodyum hipoklorid içeren) 15 dakika bırakıldı. Sodyum hipokloridin uzaklaştırılması için ise tohumlar en az 15'er dakika olmak üzere 3 kez steril distile su ile yıkandı. Bu şekilde steril edilen tohumlar, 1, 5 ve 25 ppm sodyum selenat içeren MS besiyerlerine ve besiyerlerinden su kaybını engellemek için Parafilm ile kuşatılan 9 cm çaplı Petri kaplarına 10'ar adet ekilip, bitki büyütme kabini içinde çimlenmeye bırakıldı.

## 3.2. RNA İZOLASYONU

1, 5 ve 25 ppm sodyum selenat içeren ve sodyum selenat içermeyen (kontrol) besiyerlerinde çimlendirildikten sonra 30 gün inkübe edilmiş bitkiler RNA izolasyonunda kullanıldı. RNA izolasyonunda RNaz aktivitesini inhibe etmek için izolasyonda kullanılacak pipet uçları, mikro tüpler gibi plastik ve diğer malzemeler iki kez otoklavlandı. Çözeltilere ise % 0.1 v/v oranında RNaz inhibitörü olan Dietil pirokarbonat (DEPC, Sigma, D-5758) ilave edildi. DEPC'li çözeltiler bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.

RNA izolasyonu "One Step RNA Reagent" (Bio Basic Inc., BS409) kullanılarak üreticinin önerdiği işlemlere göre aşağıdaki gibi yapıldı.

### 3.2.1. Homojenizasyon

Farklı konsantrasyonlarda sodyum selenat içeren besiyerinde 30 gün inkübe edilmiş bitkilere ait ve -70 °C'da saklanan örnekler soğuk havan ve sıvı nitrojen kullanılarak toz haline getirildi. Toz haline getirilen örnekler 100 mg doku örneği başına 1 ml "One Step RNA Reagent" kullanılacak şekilde homojenize edildi.

### 3.2.2. Faz Ayrımı

Homojenize edilen örnekler, nukleoprotein komplekslerinin tamamen ayrılması için oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Daha sonra her 1 ml "One Step RNA Reagent" için 0.2 ml kloroform eklendi. Tüplerin kapakları parafilm ile sıkıca kapatıldıktan sonra 15 saniye elle ters düz edildi ve oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi. Örnekler 12.000 xg de 4 °C'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra karışım üç faza ayrıldı; alt faz (fenol kloroform fazı), orta faz (beyaz ara faz) ve RNA'yı içeren sulu üst faz. 100 mg doku üzerine 1 ml Tripure reagent eklendi ve homojenize edildi. Karışım 12.000 xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir tüpe alındı. Örnek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kullanılan her 1 ml Tripure reagent için 0,2 ml kloroform eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. Tüpler oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübe edildikten sonra 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Renksiz üst faz yeni bir tüpe alındı. 0,5

ml izopropanol eklendi. Tüpler birkaç kez ters çevrilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi. 12000 xg'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı uzaklaştırıldı ve pellet DEPC'li suda çözüldü.

### 3.2.3. RNA'nın Çöktürülmesi

RNA'yı içeren sulu üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. Sulu fazdaki RNA, izopropil alkol ile karıştırılarak çöktürüldü. "One Step RNA Reagent"ın her 1 ml'si için 0.5 ml izopropil alkol kullanıldı. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 12.000 xg'de 4 °C'da 10 dakika santrifüj edildi. Çökelen RNA, tüpün dibinde jel görünümü çökelti oluşturdu.

Çökelmiş RNA'yı içeren tüplerden üst sıvı atıldıktan sonra RNA çökeltisi % 75 etil alkol ile bir kez yıkandı. Kullanılan her 1 ml "One Step RNA Reagent" için 1 ml % 75 etil alkol kullanıldı. Daha sonra, RNA çökeltisi tüplerin kapakları açık olacak şekilde oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika kurutuldu. Kurutma işleminden sonra RNA üzerine DEPC'li steril ddH<sub>2</sub>O ilave edildi. Daha sonra RNA'nın çözünmesi için tüpler 55 °C'lık su banyosunda 10 dakika inkübe edildikten sonra nazikçe karıştırılarak süspanse edildi.

### 3.2.4. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

RNA örnekleri DEPC'li ddH<sub>2</sub>O ile toplam 200 µl olacak şekilde 1/100 oranında sulandırıldı. Daha sonra spektrofotometre cihazı (Microquant spektrofotometre, Biotech) 260 ve 280 nm dalga boylarına ayarlandı ve 96 kuyucuklu mikro plate kullanılarak (Thermo, 05460115) absorbans değerleri ölçüldü. RNA'ların miktar tayini, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine göre yapıldı. RNA'ların konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım kat sayısı} \times 40$$

Saflık kontrolü için ise  $A_{260}/A_{280}$  oranı kullanıldı.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1.8-2.0 olan RNA'lar saf olarak kabul edildi.

### 3.3. AGARUZ-FORMALDEHİT JEL ELEKTROFOREZİ

RNA örneklerinin miktar ve saflık tayini yapıldıktan sonra total RNA'nın bütünlüğünün değerlendirildiği kalitatif analizler için % 1 agaroz-formaldehit jel elektroforezi kullanıldı. RNA'nın denatüre koşulda, yürütülmesi için formaldehit içeren MOPS [3-(Nmorfolino) propansülfonik asit] tampon sistemi kullanıldı. İşlem Maniatis ve diğ. (1982)'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Jel içeriği 40 ml hacimli jel için aşağıdaki gibidir.

- Agaroz (Sigma, A-5073) 0.4 g
- DEPC'li ddH<sub>2</sub>O 29.6 ml
- 20XMOPS 2 ml
- Formaldehit (Sigma, F-8775) 7 ml

0.4 g agaroz 29.6 ml DEPC'li distile su içinde mikrodalga fırında eritildikten sonra 50-60 °C'a kadar soğutuldu. Üzerine 2 ml 20x MOPS, 7 ml formaldehit ve 2 µl EtBr (10 mg/ml) ilave edilerek karıştırıldı (Tablo 3.2). 20 µl hacimli kuyucuk oluşturan tarak yerleştirilerek hazırlanmış jel kaseti (6x9 cm) (Thermo, EC320) içerisine jel karışımı dökülerek, çeker ocak içinde polimerize olması için bekletildi.

Polimerize olan jel, yürütme tamponunun bulunduğu tanka alındı. 5 µl RNA örneği, üzerine 5 µl RNA denatürasyon tamponu eklendikten sonra 65°C'da yaklaşık 10 dakika denatüre edildi. Bu süre sonunda hemen buza alınan örnekler burada yaklaşık 2 dakika bekletildi. Daha sonra RNA örnekleri 2 µl yükleme tamponu (Fermentas, R0641) ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara yüklendi (kuyucuk başına 5 µl). Elektroforez işlemi 40 V sabit güçte, 1,5 saat süresince gerçekleştirildi. Yürütme işleminde kullanılan tampon çözeltiler **Tablo 3.2**'de verildi.

**Tablo 3.2.** Agaroz-Formaldehit jel sisteminde kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri

Tampon/Kiymasal adı	İçerik	Miktar/Konsantrasyon	Marka ve Kod No.
20x MOPS tamponu (pH 7.0)	MOPS	400 mM	Sigma, M-3183
	Sodyum asetat	160 mM	Sigma, S-2889
(pH ayarlaması 1N NaOH ile yapılmış ve tampon çözelti otoklavda steril edilmiştir)	EDTA	20 mM	Sigma, E-5134
RNA denatürasyon tamponu	Formamid	10 ml	Sigma, F-7508
	Formaldehit	3.5 ml	Sigma, F-8775
	10x MOPS tamponu	1.5 ml	
Etidyum Bromür	Etidyum Bromür	10 mg/ml	Sigma, E-7637
Yürütme tamponu	10x MOPS	30 ml	
	Formaldehit	5.4 ml	Sigma, F-8775
	DEPC'li distile su	264.6 ml	

### 3.4. SMT GENİ ÇOĞALTIMI İÇİN cDNA SENTEZİ

Farklı konsantrasyonlarda sodyum selenat içeren besiyerlerinde yetiştirilen *A. chrysochlorus* bitkilerinden izole edilen RNAlar kullanılarak iki çeşit cDNA sentezi yapıldı. Bunlar;

A- 5' RACE PZR için sentez edilen cDNA'lar,

B- 3' RACE PZR, 5' PZR ve SMT geninin tamamının çoğaltılması için kalıp olarak kullanılan cDNA'lar olarak sınıflandırıldı.

Bu tez çalışmasında sentezlenen cDNA çeşitleri ve bu cDNA'lar kullanılarak yapılan PZR'ler şekil 3.1'de şematize edildi.





### 3.4.1. 5' RACE PZR için cDNA Sentezi

SMT geninin 5' bölgesinin çoğaltılması amacıyla yapılan 5' RACE polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılmak üzere, cDNA sentezi, 5'/3' RACE (Rapid Amplified cDNA Ends Kit, 2nd Generation, Roche, 03 353 621 001) kiti kullanılarak, üreticinin önerdiği işlemlere göre yapıldı. cDNA sentezi reaksiyonunda kullanılan bileşen miktarları ve reaksiyon aşamaları Tablo 3.3'de belirtildi. Bileşenler tüplere ilave edilme sırasına göre verildi (Tablo 3.3). Reaksiyonda kullanılan bileşenler 500 µl'lik PZR tüpünde karıştırıldı.

**Tablo 3.3.** cDNA sentez tüplerinde bulunan bileşenler, bu bileşenlerin içerikleri ve reaksiyon sırasında kullanılan miktarları.

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>5' RACE için Bileşen miktarları</b>	<b>3' RACE ve Diğer Polimeraz Zincir Reaksiyonları için Bileşen miktarları</b>
cDNA sentez tamponu (250 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl <sub>2</sub> , 150 mM KCl, 5 mM Dithiotreitol, pH 8.5)	4 µl	4 µl
Deoksinükleotid karışımı (10 mM)	2 µl	2 µl
1. primer (sp1)	1 µl	-
2. primer (oligo T)	-	1 µl
total RNA (2 µg)	1 µl	1 µl
Revers Transkriptaz	1 µl	1 µl
Distile su	11 µl	11 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

Sp1 primerine ait dizi Tablo 3.5'de verilmiştir.

- 55°C'da 60 dakika RT (Revers transkripsiyon) reaksiyonu gerçekleştirildi.
- 85 °C'da 5 dakikada reaksiyon sonlandırıldı ve örnekler buza alındı.

5' RACE PZR için sentez edilen cDNA'lar 'High Pure PCR Product Purification Kit'(Roche, 11 732 668 001) ile üreticinin önerdiği yöntemle saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Sentez edilen cDNA karışımına 100 µl bağlanma tamponu eklendi ve karıştırıldı.
2. Elde edilen karışım 'High pure filter tube' kolonu içine aktarıldı ve 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, süzüntü atıldı.

3. Tüplere 500 µl 'yıkama tamponu' eklendi ve tüpler 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, süzüntü atıldı.
4. Tüplere 200 µl 'yıkama tamponu' eklendi ve tüpler 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi, süzüntü atıldı.
5. Kolonlar elusyon tüplerine alındı.
6. Tüplere 50 µl elusyon tamponu eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından DNA'nın saflaştırma işlemi tamamlanmış oldu.

Bütün işlemler için Wisespın CF-10 masaüstü mikrosantrifüj kullanıldı.

#### 3.4.1.1. 5' RACE PZR için Sentez Edilen cDNA'lara PoliA Kuyruğu Eklenmesi

Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi sentez edilen ve saflaştırılan cDNA'ların 5' RACE polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılabilmesi için 5' uçlarına poliA kuyruğu eklendi. Bu reaksiyonda kullanılan bileşen miktarları Tablo 3.4'de ve reaksiyon aşamaları aşağıda belirtildi.

**Tablo 3.4.** 5' RACE PZR'de kullanılacak cDNA'lara poliA kuyruğu eklenmesi için gerekli bileşenler, bu bileşenlerin içerikleri ve reaksiyon sırasında kullanılan miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Bileşen miktarları
Reaksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 500 mM KCl, pH 8.3)	2.5 µl
dATP (2 mM)	2.5 µl
Bölüm 3.4.1.de saflaştırılan cDNA	19 µl
Toplam	24 µl

- Karışım 94°C'de 3 dakika inkübe edildi.
- Örnekler buza alındı.
- 1 µl terminal transferaz (80 U/ µl) eklendi.
- 37 °C' de 20 dakika inkübasyonun ardından sıcaklık 70 °C'ye çıkarıldı. Örnekler 10 dakika bu sıcaklıkta tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

Bu reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA'lar 5' RACE PZR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

### **3.4.2. 3' RACE ve Diğer Polimeraz Zincir Reaksiyonları için cDNA Sentezi**

SMT geninin 3' bölgesinin çoğaltılması amacıyla yapılan 3' RACE polimeraz zincir reaksiyonlarında, aynı genin 5' bölgesinin (5' PZR) ve genin tamamının (SMT PZR) çoğaltılması amacıyla yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılmak üzere cDNA sentezi '5'/3' RACE (Rapid Amplified cDNA Ends Kit, 2nd Generation, Roche, 03 353 621 001) kiti kullanılarak, üreticinin önerdiği işlemlere göre yapıldı. cDNA sentezi reaksiyonunda kullanılan bileşen miktarları ve reaksiyon aşamaları Tablo 3.3'de belirtildi. Reaksiyonda kullanılan bileşenler 500 µl'lik PZR tüpünde karıştırıldı.

### **3.5. SMT GENİ SENTEZİ**

SMT geninin sentezi için 3.4.1 ve 3.4.2 bölümlerinde anlatıldığı biçimde sentezlenen cDNA'lar kullanıldı. Bu cDNA'lar ile yapılan PZR'lerde kullanılan primerler Tablo 3.5'de verildi. Bu primerlerden 5' RACE PZR, 3' RACE PZR, 5' PZR ve SMT PZR için kullanılanlar, NCBI veritabanında bulunan *Astragalus bisulcatus*, *A. racemosus*, *A. pectinatus*, *A. drummondii*, *A. ceramicus* ve *A. leptocarpus* bitkilerine ait SMT genlerinin ortak dizilerinden ve *A. chrysochlorus*'da Arı ve diğ. (2010) tarafından belirlenmiş SMT geni parçasından yararlanılarak tasarlandı.

**Tablo 3.5.** PZR 'de kullanılan primer dizileri

5' RACE	<b>Gene özgü birinci primer (sp1)</b>	<b>Gene özgü ikinci primer (sp2)</b>
	5' GCTTGATAAGATGCTGTG 3'	5'CTAGATAATCAAGATGCTCC 3'
3' RACE	<b>Primer 1</b>	<b>Primer 2 (oligoT)</b>
	5' TAGTGGTGATTCAATAGAGG 3'	5'GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTT TTTTTV3' V= A, C, G
5' PZR	<b>Primer 3</b>	<b>Primer 4</b>
	5'ATGTCGTCGTCATTGATAACC 3'	5'GCCAAATAAGCGCCATAGCTC 3'
SMT Genini çoğaltmak için tasarlanan primerler	<b>İleri</b>	<b>Geri</b>
	Primer A: 5' ATGTCGTCGTCATTGATAACCGATTT C 3' Primer B (Klonlama için kullanılan): 5' CACCATGTCGTCGTCATTGATAACCG 3'	Primer C: 5' TCACTTTGCAGAAAAAGTAGGAGATTGAC 3' Primer D: 5' TCACTTTGCAGAAAAAGGAGATTGACCGCT 3' Primer E: 5' TCACTTTGGCAAGAGCAGGAGATTGACC 3'
T7 promotor bölgesine ait primer	5' TAA TAC GACTCA CTA TAG GG 3'	
Aktin Primerleri	İleri- 5' TGGTGT CATGGTTGGTATGG 3'	Geri- 5' TACATGGCAGGGACATTGAA 3'

### 3.5.1. RACE Polimeraz Zincir Reaksiyonları

1 ppm sodyum selenat içeren besiyerinde 30 gün süreyle bitki büyütme kabini içinde inkübe edilmiş bitkilerden izole edilen RNA'lar ters transkripsiyon ("reverse transcription") ile cDNA'ya çevrildi ve polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kalıp olarak kullanıldı. PZR işlemleri toplam hacim 25 µl olacak şekilde reaksiyon bileşenlerinin (Tablo 3.6) 0.5 ml'lik mikrotüplere konması ve tüplerin PZR cihazında uygun sıcaklık derecelerinde tutulmasıyla gerçekleşti. PZR işlemini gerçekleştirmek amacıyla tüplere sırasıyla steril distile su, 10x reaksiyon tamponu, MgCl<sub>2</sub>, dNTP karışımı, primerler (5' RACE için sp2 ve primer2, 3' RACE için primer1 ve primer2), kalıp cDNA (5' RACE için Bölüm 3.4.1'de, 3' RACE için Bölüm 3.4.2'de sentezlenen) eklendikten sonra PZR cihazı uygun program ile çalıştırıldı (Tablo 3.7). PZR işlemleri "5'/3' RACE (Rapid Amplified cDNA Ends) Kit, 2nd Generation" (Roche, 03 353 621 001) kullanılarak üreticinin önerdiği işlemlere göre yapıldı.

**Tablo 3.6.** PZR tüplerinde bulunan bileşenler, bu bileşenlerin içerikleri ve reaksiyon sırasında kullanılan konsantrasyon/miktarları

Reaksiyon Bileşenleri ve Konsantrasyonları	3' RACE PZR Konsantrasyon/Miktar	5' RACE PZR Konsantrasyon/Miktar	5' PZR Konsantrasyon/Miktar	SMT ve Aktin PZR Konsantrasyon/Miktar
Su	25 µl'yetamamlayacak kadar	25 µl'yetamamlayacak kadar	25 µl'yetamamlayacak kadar	25 µl'yetamamlayacak kadar
10x PZR Reaksiyon tamponu [10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, %0,01 (w/v) Jelatin]	2,5 µl (1x)	2,5 µl (1x)	2,5 µl (1x)	2,5 µl (1x)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	1-1,5-2-2,5-3 µl	3 µl	3 µl
dNTP karışımı	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
İleri primer	10 pmol (primer 1)	10 pmol (sp2)	10 pmol (primer3)	10 pmol (primerA) *Aktin ileri primeri
Geri primer	40 pmol (primer 2)	40 pmol (primer 2)	10 pmol (primer4)	10 pmol (primer C veya primer D veya primer E) *Aktin geri primeri
Kalıp	1 µl	1 µl	2 µl	1 µl
Taq DNA Polimeraz veya 'Phusion' polimeraz** (5 u/ µl)	0,1µl	0,1µl	0,2 µl	0,2 µl**

\* Aktin PZR için kullanılan primerler

**Tablo 3.7.** PZR koşulları

PZR Basamağı	3' RACE PZR Koşulları	5' RACE PZR Koşulları	5' PZR Koşulları	SMT ve Aktin PZR Koşulları
Ön Denatürasyon (94 °C)	2 dakika	2 dakika	2 dakika	30 saniye
Denatürasyon (94 °C)	30 saniye	30 saniye	30 saniye	5 saniye
Primer Bağlanma	49 °C' de 30 saniye	49-57 °C' de 30 saniye	52 °C' de 30 saniye	55 °C' de 30 saniye
Uzama (72 °C)	30 saniye	30 saniye	30 saniye	30 saniye
Döngü	30	30	30	30
Son Uzama (72 °C)	10 dakika	10 dakika	5 dakika	5 dakika

### 3.5.2. Selenosistein Metiltransferaz Geninin 5' Ucuna Yönelik Gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1 ppm sodyum selenat içeren besi ortamında 30 gün süreyle yetiştirilen *Astragalus chrysochlorus* tohumlarından elde edilen RNA'lar kullanılarak, Bölüm 3.4.2.'de sentezlenen cDNA'lar PZR'de kalıp olarak kullanıldı. Reaksiyonda kullanılan primerler, primer3 ve primer4, *A. bisulcatus*, *A. racemosus*, *A. pectinatus*, *A. drummondii*, *A. ceramicus* ve *A. leptocarpus* bitkilerine ait SMT genlerinin ortak dizilerinden yararlanarak tasarlandı (Tablo 3.5). PZR 500 µl'lik tüplerde gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları ve kullanılan bileşenler Tablo 3.6'da ve Tablo 3.7'de verildi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforeziyle analiz edildi.

### 3.5.3. SMT Geninin PZR ile Çoğaltımı

SMT geninin tamamını çoğaltmak amacıyla yapılan PZR 500 µl'lik PZR tüplerinde gerçekleştirildi. PZR'de kalıp olarak 1, 5, 25 ppm sodyum selenat varlığında yetiştirilen *Astragalus chrysochlorus* tohumlarından elde edilen RNA'lar aracılığıyla sentezlenen cDNA'lar kullanıldı. Reaksiyonda ileri primer A, geri primer olarak sentezlenen 3 farklı primer (primer C, primer D, primer E) kullanıldı (Tablo 3.5). Reaksiyonda kullanılan bileşenler Tablo 3.6'da, reaksiyon koşulları Tablo 3.7'de verildi. DNA polimeraz olarak 'proofreading' (hataları düzeltme) özelliği olan Phusion polimeraz (NEB, F-530) kullanıldı.

Bütün PZR reaksiyonları "Techne TC-3000" marka PZR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforeziyle analiz edildi.

## 3.6. AGARUZJEL ELEKTROFOREZİ

PZR ürünlerinin kalitatif analizi için % 1'lik agaroz jel elektroforezinden yararlanıldı. DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için 1XTAE tampon sistemi kullanıldı (Tablo 3.8). İşlem Maniatis ve diğ. (1982)'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

**Tablo 3.8.** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan yürütme tampon çözeltisi ve içeriği

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>	<b>Marka ve Kod numarası</b>
Yürütme tampon çözeltisi [5X/1 L, Tris-asetat (TAE) tampon çözeltisi pH 8.0] (pH ayarlaması 1N NaOH ile yapılmıştır.)		
Tris-base	242 g	Sigma, T-8524
Glasiyel asetik asit	57.1 ml	Sigma, A-9967
0.5 M EDTA pH 8.0	100 ml	Sigma, E- 5134

0.4 g agaroz (Sigma, A-5073) 40 ml 1XTAE içinde mikrodalga fırında çözdürüldükten sonra 50-60 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra üzerine 2 µl EtBr (10 mg/ml) ilave edilerek karıştırıldı. 40 µl hacimli kuyucuk oluşturan tarak yerleştirilerek hazırlanmış (6x9 cm) (Thermo, EC 320) jel kasetine jel karışımı dökülerek soğumaya bırakıldı.

Polimerize olan jel, yürütme tampon çözeltisinin (1XTAE) bulunduğu tanka alındı. PZR ürünlerinin 5 µl'si 1 µl yükleme tamponu (Fermentas, R0611) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi 80 V sabit güçte, 40 dakika süresince gerçekleştirildi.

### 3.7. PZR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

PZR sonucu elde edilen ürünler (20 µl) agaroz jele yüklendi ve elektroforez işlemi ile ayrıştırıldı. Çoğaltılan bantlar UV altında görüntüledikten sonra agaroz jelden geri alınarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi, "FavorPrep<sup>TM</sup> Gel Purification Mini Kit" (Favorgen, FAGPK001) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre aşağıdaki gibi yapıldı:

1. DNA bantları, steril bir bistüri ucu ile kesilerek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildikten sonra her bir örnek için tüplere 300 µl 'FAGP tamponu' eklendi ve tüpler 15 dakika 55 °C'lik su banyosunda bekletildi.
2. Elde edilen karışım FAGP kolonuna yüklendi ve 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, süzüntü atıldı.
3. Tüplere 750 µl 'yıkama tamponu eklendi ve tüpler 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, süzüntü atıldı.

4. Tüpler 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
5. Tüpün altında kalan sıvı atıldı ve kolonlar elusyon tüplerine alındı.
6. Tüplere 30-40 µl elusyon tamponu eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından DNA'nın saflaştırma işlemi tamamlanmış oldu.

Bütün işlemler için Wisepin CF-10 masaüstü mikrosantrifüj kullanıldı.

### **3.8. SELENOSİSTEİN METİL TRANSFERAZ (SMT) GENİNE AİT POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) ÜRÜNLERİNİN DİZİ VE HOMOLOJİ ANALİZLERİ**

1 ppm sodyum selenat içeren besiyerinde 30 gün süresince yetiştirilen bitkilerden izole edilen RNA'lar ters transkripsiyon ("reverse transcription") ile cDNA'ya çevrildi ve polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanıldı. PZR ürünlerinin dizi analizi, reaksiyonda kullanılan primerler aracılığı ile 'ABI PRISM 310 Genetic Analyser' aleti kullanılarak IONTEK tarafından gerçekleştirildi ve dizi bilgileri 'Chromas 3' programı ile elde edildi. Dizileme sonuçlarından elde edilen gen dizilerinin homolojileri, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) analizi yapılarak tespit edildi. Nükleotit dizilerinin amino asit karşılıklarının farklı okuma çerçeveleri ile yapılan karşılaştırmaları sonucu, dizilerin hangi organizmada, hangi proteinlerle benzerlik gösterdikleri araştırıldı. Aminoasit dizilerinin belirlenmesi için EMBL sitesinde bulunan 'TRANSEQ' programı kullanıldı. Aminoasit dizilerinin karşılaştırılması için ise öncelikle NCBI'nin sitesindeki "protein BLAST" programı kullanılarak elde edilen aminoasit dizilerine benzerlik ve homoloji gösteren diziler belirlendi. Ayrıca 'clustalw' programı kullanılarak SMT geninin hem DNA hem de aminoasit dizilerine yönelik homoloji analizleri yapıldı. AcSMT olarak adlandırılan *Astragalus chrysochlorus*'a ait olası SMT proteininin 3 boyutlu yapısı ise bilgisayar ortamında SWISS-MODEL Web-based tool (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php>, Guex ve Peitsch, 1997, Schwede ve diğ. 2003, Arnold ve diğ. 2006) ile elde edildi.

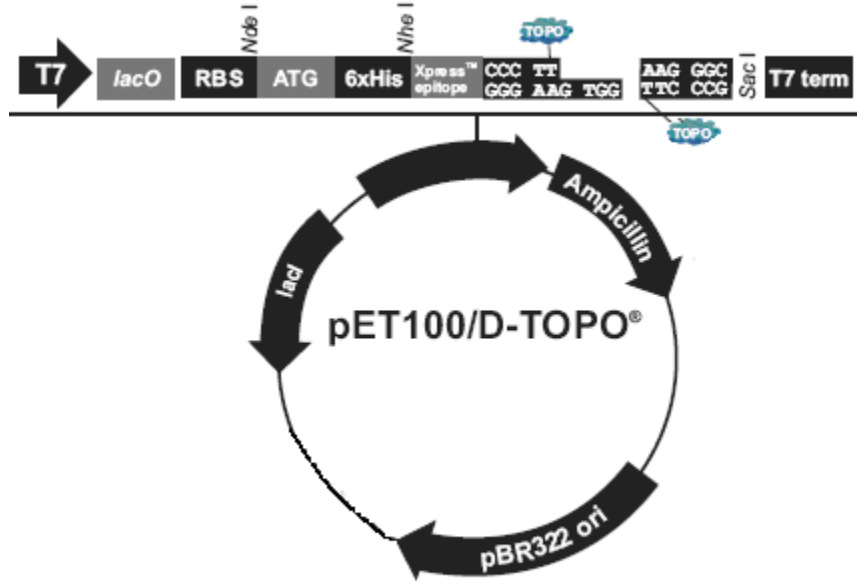


### **3.9. SMT GENİNİN FARKLI SODYUM SELENAT KONSANTRASYONLARINDA ANLATIMININ ANALİZİ**

SMT genine ait dizi saptandıktan sonra, 1, 5 ve 25 ppm konsantrasyonda sodyum selenat içeren ve kontrol bitkilerinden izole edilmiş RNAlardan Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi sentezlenen cDNA’lar ile PZR yapıldı. Farklı sodyum selenat konsantrasyonlarının SMT geninin anlatımı üzerindeki etkileri araştırıldı. PZR işlemlerinde kullanılan koşullar ve bileşenlerin konsantrasyonları Bölüm 3.5.3’te verildi. Aynı koşullar kontrol olarak kullanılan aktin geninin çoğaltılması için de kullanıldı. PZR ürünlerinin kalitatif analizi için % 1’lik agaroz jel elektroforezinden yararlandı. Jeller densitometrede (GS-800 Calibrated Densitometer, BIO-RAD) ‘Quantity One® SW’ yazılımı kullanılarak analiz edildi.

### **3.10. cDNA’NIN pET100/D-TOPO® VEKTÖRÜNE KLONLANMASI**

*Astragalus chrysochlorus*’dan izole edilen SMT geni, Champion™ pET Directional Expression Kit (Invitrogen, K100-01) kullanılarak pET100/D-TOPO® vektörüne çoğaltılmak, dizilemek ve anlatım çalışmalarında kullanılmak üzere klonlandı (Şekil 3.2).



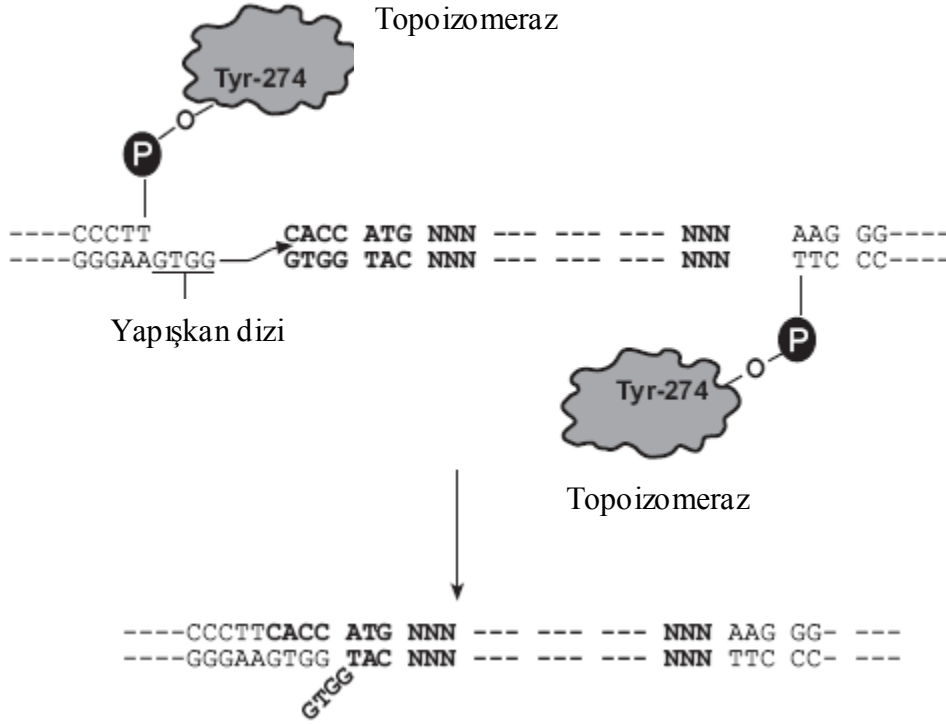
	<u>Bölge</u>
T7 promotor	209-225
Lac operator (lacO)	228-252
Ribozom Bağlanma Bölgesi	282-288
Polihistidin (6xHis) Bölgesi	309-326
Xpress <sup>TM</sup> Epitop	366-389
Klonlama Bölgesi	396-409
T7 terminatör	427-555
Ampisilin direnç geni	955-1815

Şekil 3.2. pET100/D-TOPO<sup>®</sup> vektörünün haritası

### 3.10.1. cDNA'nın pET100/D-TOPO<sup>®</sup> Vektörü ile Ligasyonu

TOPO TA<sup>®</sup> klonlama sisteminde ligasyon topoizomeraz I enzimine dayalı yöntemle gerçekleşir. *Vaccinia* virus topoizomeraz I spesifik olarak 5'-(C/T)CCTT-3' pentamerik dizisini tanır ve 3' timidinin fosfat grubu ile kovalent bağ oluşturur. Topoizomeraz I DNA'nın tek zincirinin kırılmasını sağlar ve DNA'nın gevşemesini kolaylaştırır. Bu şekilde enzim de DNA'dan ayrılır. Topoizomeraz I'in bu özelliklerinden dolayı TOPO<sup>®</sup> vektörü linear bir halde bulunur. Vektörün T7 promotor bölgesinin arkasında GTGG dizisi yapışkan uç olarak bulunmaktadır. PZR ürününün çoğaltılmasında kullanılan ileri primerin uç kısmında CACC dizisi içermesi ile, PZR ürününün vektöre doğru yönde girmesi sağlanır. Bu şekilde, çoğaltımda meydana gelen hataları düzeltebilen bir polimeraz enzimi ile çoğaltılan DNA dizisi vektöre bağlanarak ligasyon gerçekleşir

(Şekil 3.3). Ligasyon işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları **Tablo 3.9**'da verilmiştir. Ligasyon reaksiyonu üreticinin belirttiği işlemlere göre yapılmıştır.



**Şekil 3.3.** Champion™ pET Directional Expression Kitinin işleyiş şeması

**Tablo 3.9.** Ligasyon işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktarları
Taze PCR ürünü	0.5-4 µl
Tuz solüsyonu (4 kat sulandırılmış)	1 µl
Steril su	Toplam hacim 5 µl olacak kadar
TOPO® vektör	1 µl

Ligasyon için öncelikle 6 µl'lik Champion™ pET Directional Expression kiti klonlama reaksiyon karışımını **Tablo 3.9**'a göre hazırlandı.

1. Ligasyon için kullanılan bileşenler Eppendorf tüpler içine sırasıyla ilave edildikten sonra tüpler nazıkçe karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda (ligasyon gerçekleştikten sonra) tüpler buz dolu bir kaba alındı ve transformasyon işlemine kadar hazır halde bekletildi.

2. pET100/D-TOPO<sup>®</sup> vektörüne klonlanan cDNA'lar ve elde edilen rekombinant plazmidler pET100/D-AcSMT olarak isimlendirildi.

### 3.10.2. One Shot<sup>®</sup> TOP10 Electrocomp<sup>™</sup> *E. coli* Hücrelerinin Elektroporasyon Yoluyla pET100/D-AcSMT ile Transformasyonu

Rekombinant plazmitlerin transformasyonu için Invitrogen Champion<sup>™</sup> pET Directional Expression kitinden sağlanan elektrokompentan *E. coli* hücreleri ('One Shot<sup>®</sup> TOP10 Electrocomp<sup>™</sup> *E. coli*') kullanıldı. Transformasyon elektroporasyon yöntemi ile Multiporator (Eppendorf<sup>®</sup>) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Elektroporasyon işlemi aşağıdaki gibi yapıldı.

1. -70 °C'da saklanmış olan kompetan *E. coli* hücreleri buz içinde çözündürüldü.
2. Her bir rekombinant plazmit için bir ölçek kompetan *E. coli* hücresi içeren Eppendorf tüplerine Champion<sup>™</sup> pET Directional Expression kiti klonlama reaksiyonu sonucunda elde edilen, rekombinant plazmit içeren 2 µl klonlama reaksiyon karışımından eklenerek tüpler nazıkçe karıştırıldı ve karışım elektroporasyon küvetine aktarıldı.
3. Örnekler 2.000 V'ta 1 atışlık elektroporasyona uğratıldı ve ardından hemen buza alındı.
4. Hücrelerin üzerine oda sıcaklığında 250 µl klonlama kitinin içerisinde varolan SOC (Hanahan, 1983) besiyeri eklendi ve karışım 15 ml'lik kültür tüpüne alındı.
5. Tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak hücreler, üremeleri amacıyla 37 °C'lık çalkalamalı etüvde 1 saat inkübe edildi.
6. Hücreler daha sonra 100 µg/ml ampisilin (Sigma, A-0166) içeren ve önceden 37 °C'a kadar ısıtılmış LBA (Luria-Bertani Agar) (**Tablo 3.10**) besiyeri içeren Petri kaplarına 10-50 µl olacak şekilde yayma yöntemi ile ekildiler.

**Tablo 3.10.** Luria-Bertani (LB) (pH 7.2) besiyeri yapımında kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	LBA LB		Markası ve Kod No.
	Konsantrasyon (w/v)		
Tripton	% 1	% 1	Difco, 211705
Maya özütü	% 0.5	% 0.5	Sigma, Y-1625
NaCl	% 1	% 1	Sigma, S-3014
Agar	% 0.9	-	Sigma A-5306

*pH 1N NaOH ile ayarlanmış ve besiyeri otoklavda steril edilmiştir.*

7. Petri kapları 37 °C'lık etüvde hücrelerin koloni oluşturması amacıyla bir gece inkübe edildiler.

### 3.10.3. Transformasyonun Koloni PZR ile Kontrolü

Kompetan *E. coli* hücrelerinin klonlanmak istenen cDNA'ları alıp almadıklarının kontrolü için koloni PZR yöntemi kullanıldı. Koloni PZR için LBA besiyerinde 37 °C'lık etüvde bir gecelik inkübasyonun ardından koloni oluşturan bakteri hücreleri transformantların seçimi için kullanıldı. PZR için ilk olarak koloniler rastgele biçimde ve en az 10 koloni olacak şekilde seçildi. Steril bir pipet ucu ile teker teker toplanan kolonilerin her biri, içerisinde 10 µl steril dH<sub>2</sub>O bulunan steril PZR tüpünde nazikçe süspansiyon edildi ve PZR'de kalıp olarak bu süspansiyonun 1 µl'si kullanıldı. Bakteri hücrelerinin parçalanması için PZR'nin ilk basamağı olarak 94 °C'da 10 dakika bekleme aşaması eklendi. Bu PZR yönteminde primer olarak vektöre ait T7 promotor dizileme primeri ve primerE kullanıldı (**Bkz. Tablo 3.5**). PZR, 500 µl'lik PZR tüplerinde gerçekleştirildi. Reaksiyonda kullanılan bileşenler ve reaksiyon koşulları aşağıda verildi:

Koloni PZR Reaksiyon karışımı;

• Steril distile su	12.65 µl
• 10x PCR tamponu	2.5 µl
• 0.2 mM dNTP karışımı	1.25 µl
• 2 mM MgC <sub>2</sub>	1.5 µl
• 0.5 µM T7 promotor primeri	1 µl
• 0.5 µM primerE	5 µl
• Bakteri koloni süspansiyonu	1 µl
• 1 U Taq DNA polimeraz (Finnzyme)	0.1 µl
Toplam	25 µl

Tüpler karıştırıldı ve ardından PZR aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

Hücrelerin parçalanması	94 °C’de	10 dakika	} 30 döngü
Denatürasyon	94 °C’de	30 saniye	
Bağlanma	52 °C’de	30 saniye	
Uzama	72 °C’de	30 saniye	
Uzama	72 °C’de	10 dakika	

Koloni PZR ürünleri % 1’lik agaroz jelde kontrol edildi.

#### 3.10.4. pET100/D-AcSMT Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için öncelikle koloni PZR ile transformant olarak belirlenmiş ‘pozitif’ kolonilere ait *E. coli* hücreleri üretildi. Daha önce koloni PZR’de (Bkz. Bölüm 3.10.3) kalıp olarak kullanılmış 1.5 ml’lik steril santrifüj tüpünde bulunan bakteri süspansiyondan geriye kalan 9 µl’sinin üzerine 1 ml LB besiyeri ve ampisilin (100 µg/ml) ilave edildi ve bir gece 37 °C’da 160 devir/dakika da üretildi. Buradan alınan bakteriler (200 µl) daha sonra plazmit izolasyonunda kullanılmak üzere miktarlarının artırılması amacıyla, 5 ml LB besiyeri ve ampisilin (100 µg/ml) içeren 15 ml’lik steril cam tüplere alındı ve bir gece 37 °C’da 160 devir/dakika da inkübe edildi.

Plazmid izolasyonu GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit (Fermentas, K0501) kullanılarak üreticinin önerdiği işlemlere göre aşağıdaki gibi yapıldı.

1. 37 °C’da 160 devir/dakika da 1 gece çoğaltılan hücreler 1.5 ml’lik steril santrifüj tüplerine alındı.
2. Hücreler 7.000 rpm’de 5 dakika çöktürüldü. Üst sıvı (besiyeri) uzaklaştırıldı.
3. Çöken hücreler 250 µl “Resuspension” solüsyonunda (RNase A ilaveli) tekrar süspanse edildi.
4. Tüpler 250 µl “Lysis” solüsyonu eklendi ve tüpler 4-6 kez ters-düz edilerek karıştırıldı.
5. Ardından 350 µl “Neutralization” solüsyonu da eklenen tüpler, 4-6 kez ters-düz edilerek karıştırıldı.

6. 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra hücresel atık ve kromozomal DNA çöktürüldü.
7. Plazmidi içeren üst sıvı ayrı bir santrifüj tüpündeki GeneJET™ spin kolona aktarıldı.
8. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjden sonra kolonun altına geçen sıvı atıldı.
9. Kolona 500 µl “Wash” solüsyonu eklendi. 30-60 saniye 14.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süzüntü atıldı ve yıkama işlemi tekrarlandı.
10. İkinci yıkamaya ait süzüntü atılarak, kolonun kurutulması için 1 dakika daha santrifüj yapıldı.
11. GeneJET™ spin kolon yeni bir tüpe aktarıldı ve 50 µl “Elution buffer” eklenerek plazmit DNA'sı izole edilmiş oldu.
12. Elde edilen plazmidler **Bölüm 3.6.’da** anlatılan şekilde % 1’lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.
13. Plazmidler kullanılıncaya kadar -20 °C’da saklandı.

### **3.10.5. İzole Edilen pET100/D-AcSMT Plazmitlerinin PZR ve Dizileme ile Kontrolü**

İzole edilen plazmitlerin *Astragalus chrysochlorus* SMT genini taşıdıklarının kanıtlanması amacıyla, genin vektöre girdiği bölgenin ön tarafında bulunan T7 promotor bölgesine ait primer ve primer E ile plazmitler kalıp olarak kullanılarak PZR yapıldı. PZR koşulları ve kullanılan bileşenlerin konsantrasyonları Bölüm 3.10.3’te verilen koşullarla aynıdır. Ayrıca izole edilen plazmitler dizileme ile de kontrol edildi (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, IONTEK).

### 3.11. BL21 STAR™ (DE3) *E. coli* HÜCRELERİNİN PET100/D-AcSMT PLAZMİTİ İLE TRANSFORMASYONU

pET100/D-AcSMT plazmiti ve Invitrogen Champion™ pET Directional Expression kitinden sağlanan  $\beta$ -galaktozidaz geni içeren kontrol pET100/D plazmiti ayrı ayrı protein ekspresyonunun sağlanması amacıyla BL21 Star™ (DE3) *E. coli* hücrelerine aktarıldı. Bu işlem üreticinin önerdiği şekilde, aşağıdaki gibi yapıldı.

1. 70 °C'da saklanmış olan kompetan BL21 Star™ (DE3) *E. coli* hücreleri buz içinde çözündürüldü.
2. Bir ölçek kompetan *E. coli* hücresi içerisine, 2  $\mu$ l plazmit eklenerek tüpler nazikçe karıştırıldı.
3. Karışım 30 dakika buzda inkübe edildi.
4. Hücreler 30 saniye boyunca 42 °C'da tutuldu.
5. Hemen buza alınan hücrelerin üzerine oda sıcaklığına getirilmiş SOC besiyeri eklendi.
6. Tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak hücreler, üremeleri amacıyla 37 °C'lık çalkalamalı etüvde 30 dakika inkübe edildi.
7. Hücreler daha sonra 100  $\mu$ g/ml kanamisin (Sigma, K-1876) içeren ve önceden 37 °C'a kadar ısıtılmış 10 ml sıvı LB besiyerine aktarıldı ve kültür 1 gece boyunca inkübe edildi.

### 3.12. BL21 STAR™ (DE3) *E. coli* HÜCRELERİNDE AcSMT PROTEİNİNİN ANLATIMI

AcSMT proteininin BL21 Star™ (DE3) *E. coli* hücrelerinde anlatımının analizi için sırasıyla total protein izolasyonu, commasie boyama, western blotlama ve enzim aktivitesi analizi yapıldı.

#### 3.12.1. Protein İzolasyonu

pET100D-AcSMT plazmiti aktarılmış *E. coli* BL21 Star™ (DE3) bakterilerinde AcSMT proteininin anlatımını göstermek amacıyla bu hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı. 100  $\mu$ g/ml ampisilin içeren LB besiyerinde 200 rpm'de 37°C'da bir gece boyunca üretilen bakterilerin 500  $\mu$ l'si, 100  $\mu$ g/ml ampisilin içeren 10 ml LB



besiyerine ekildi ve  $OD_{600} = 0.5$  olduğunda kültür ikiye bölündü. Kültürlerden birine son hacimde 1 mM olacak şekilde IPTG (isopropil-beta-D-tiogalaktopiranosid, R0391, Fermentas) ilave edildi, diğerine ise aynı hacimde steril distile su eklendi ve kültürler tekrar üremeye bırakıldı. IPTG hücrelerin gen anlatımını uyarmak için kullanıldı. Uyarımdan sonraki 0., 2., 4. ve 6. saatlerde bütün kültürlerden 500 µl örnek alındı ve 600 nm'de absorbansları ölçüldü. Daha sonra hücreler 4000 rpm'de çöktürüldü. Elde edilen absorbans değerlerinden yararlanılarak hücre yoğunlukları Lizis tamponu (50 mM potasyum fosfat, pH 7.8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% gliserol, 0.5% Triton X-100, 10 mM imidazol) ile birbirine eşitlendi. Daha sonra sıvı azotta dondurulan örnekler 42 °C'de çözüldü. Bu işlem 3-4 kez daha tekrarlandı. Çözülme işleminden sonra örnekler, 5 kez tekrarlanan periyotlarda 20 saniye ultrasonik su banyosu (Ultraclear Industrial, Ultrasonic Water Bath), 20 saniye buz banyosu içinde tutularak parçalandı. Homojenat 4°C'da 15000xg hızda (Eppendorf Centrifuge 5810 R), 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısmı farklı bir tüpe aktarıldı. Süpernatant 2x Örneklem tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 2 ml Gliserol (100%), 0.4 ml β-merkaptotanol, 0.02 g Bromophenol Blue, 0.4 g SDS) ile pellet ise 1x örneklem tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 1 ml Gliserol (100%), 0.2 ml β-merkaptotanol, 0.01 g Bromophenol Blue, 0.2 g SDS) ile karıştırıldı. Bütün işlemler kontrol plazmiti olan ve β-galaktosidaz geni içeren pET100/D aktarılmış hücreler için de tekrar edildi. Örnekler 5 dakika kaynatıldı ve SDS-PAGE analizlerinde kullanılmak üzere -70°C'da saklandı.

### 3.12.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Suda çözünebilir ve çözünemeyen hücresel proteinlerin denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırılmasında Walker (2002) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. İşlem sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.11.'de, jellerin hazırlanması sırasında kullanılan çözelti oranları ve işlem sırası Tablo 3.12.'de verildi. Önce jelin 1. kısmı (ayırma jeli) döküldü ve hava ile teması engellemek üzere jel yüzeyi 1 ml distile su ile kapatıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 1 saat) yüzeydeki su uzaklaştırıldı ve jelin 2. kısmı (yükleme jeli) dökülüp tarak yerleştirildi. Polimerizasyon sonunda (yaklaşık 30 dakika) jel kaseti elektroforez aletine (Mini-PROTEAN 3 Cell, BIO-RAD) yerleştirildi ve her bir cebe 30 µl örnek olacak şekilde uygulandı.

**Tablo 3.11.** SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler

<b>Çözeltiler</b>	<b>Bileşenleri</b>
Stok akrilamid çözeltisi	Akrilamid.....30 g Bis.....0.8 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz.....45.43 g 3 N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz.....14.54 g 3 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	SDS.....10 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
%10 Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı, taze hazırlanır)	Amonyum Persülfat.....0.1 g Distile su ile 1 ml'ye tamamlandı
1 x Yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3)	Tris.....3.03 g Glisin.....14.4 g SDS.....1 g Distile su ile 1 litreye tamamlandı
Örnek yükleme tamponu	0.6 M Tris-HCl (pH 6.8)..5 ml SDS.....5 g Sukroz.....5 g β-Merkaptoetanol.....0.25 ml Bromofenol mavis i (% 0.5 stok).5 ml Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı

**Tablo 3.12.** SDS-PAGE'de kullanılan jel in hazırlanması

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Ayırma jeli (%10 Akrilamid)</b>	<b>Yükleme Jeli (% 5 Akrilamid)</b>
Stok akrilamid solüsyonu	13.3 ml	1.35 ml
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	8.0 ml	-
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	-	1.0 ml
%10 SDS	0.4 ml	0.1 ml
Su	18.1 ml	7.5 ml
%10 Amonyum persülfat (APS)	0.2 ml	0.05 ml
Karışımın havası alındı		
TEMED (tetrametiletildiamin)	14 µl	14 µl
Jel kasetine döküldü		

Elektroforez işlemi sabit voltajda (200 V) gerçekleştirildi. Bromfenol mavisine ait bant jelin alt kenarına ulaşana dek (~40 dakika) ayırım sürdürüldü. İşlem sonunda akım kesilerek jel kaset arasından çıkarıldı ve bantlar Coomassie parlak mavisi ile görünür hale getirildi.

### 3.12.3. Coomassie Boyama

Elektroforez sonunda jelde ayrılmış proteinler Coomassie Boyama yöntemi ile görünür hale getirildi. Jel, alkole ve aside dayanıklı plastik bir kaptaki boyama çözeltisi [50:10:40 hacim oranlarındaki MeOH (Metanol):AcOH (Asetik asit):H<sub>2</sub>O karışımı içinde hazırlanmış, % 0.05 (w/v) Coomassie parlak mavisi ("Coomassie brilliant blue" R-250)] içinde 2 saat, 37°C'da çalkalandı. Daha sonra fazla boyayı uzaklaştırma ("destaining") çözeltisi [5:7:88 hacim oranlarında hazırlanmış MeOH:AcOH:H<sub>2</sub>O karışımı] içinde 12 saat süreyle, 50 devir/dakika hızda çalkalayarak bekletildi. Bu çözelti jelin alt zemini boyadan tamamen arıncaya kadar, sık sık değiştirildi ve yıkama işlemi tekrarlandı.

### 3.12.4. İmmünolojik Belirleme

Bu analizlerde, Bölüm 3.11’de anlatıldığı gibi elde edilen hücrelerden, Bölüm 3.12.1’de verilen yöntemle göre elde edilen protein ekstratları kullanıldı. %10 poliakrilamid içeren SDS-PAGE (Walker, 2002) ile ayrılan proteinler, elektroblot yöntemi ile polivinilidinden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Membran % 5 (w/v) süt tozu [% 0.05 Tween-20 (P-1379, Sigma) içeren PBS (Fosfat Salin Tamponu, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) içinde hazırlandı] ile bloke edildikten sonra, bloklama solüsyonu içinde uygun oranlarda hazırlanan primer antikorla (**Tablo 3.13**) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

**Tablo 3.13.** İmmünolojik analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikorlar, kaynakları, elde edildikleri organizmalar ve dilüsyonları

Antikor	Mono/Poliklonal	Firma-Kaynak	Elde edilen organizma	Dilüsyon
Primer Antikor: AntiSMT	Monoklonal	Dr. Martin Thanbichler Max Planck Institute, Almanya	Tavşan	1:150
Sekonder Antikor: Keçi anti-tavşan IgG (Fab), HRPO işaretli	Poliklonal	Stressgen	Keçi	1:1000

Membran, yıkama solüsyonu (% 0.05 Tween-20 içeren PBS) 15 dakika aralıklarla değiştirilerek 1 saat yıkandıktan sonra, bloklama solüsyonu içinde hazırlanan sekonder antikor ile [keçi anti-tavşan IgG (Fab), HRPO (yaban turpu peroksidazı) ile işaretli konjuge antikor (Stressgen), 1:1000; oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membran yıkama solüsyonu ile tekrar yıkandıktan sonra, spesifik protein bantları “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)” kullanılarak röntgen filmi (Hyperfilm) üzerine yansıtıldı.

### 3.12.5. SMT Enzim Aktivitesi

SMT enziminin aktivitesini göstermek için Bölüm 3.12.1’de anlatıldığı gibi üretilen ve uyarılan *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) bakterilerinden total protein izolasyonu yapıldı ve izole edilen proteinlerin konsantrasyonları ölçüldükten sonra reaksiyon gerçekleştirildi.

#### 3.12.5.1. SMT Enzim Aktivitesi Analizi için Protein İzolasyonu

Bölüm 3.12.1’de anlatıldığı şekilde üretilen ve IPTG ile uyarılan pET100D-AcSMT plazmiti aktarılmış BL21 Star (DE3) hücrelerinden uyarımdan sonraki 0., 2., 4., 6. saatlerde 500 µl örnek alındı ve hücreler 4000 devir/dakika’da 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler 50 µl 50 mM sodyum sitrat tamponunda [pH 6.0, 0.2 mM EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit), 2 mM DTT (Ditiotreitol), % 10 w/v gliserol içeren] süspansiyon edildi. Sıvı azotta dondurulan örnekler 25 °C’de eritildi. Bu işlem 3-4 kez daha tekrarlandı. Eritme işleminden sonra örnekler, 5 kez tekrarlanan periyotlarda 20 saniye ultrasonik su banyosu (Ultraclear Industrial, Ultrasonic Water Bath), 20 saniye buz banyosu içinde tutularak parçalandı. Elde edilen özütlerde protein konsantrasyonu saptandı.

#### 3.12.5.2. Protein Konsantrasyonunun Saptanması

Hazırlanan protein ekstratlarının konsantrasyonlarının belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Asidik boya (Bradford belirteci), 25 mg Coomassie brilliant blue G-250’nin, 12.5 ml %95 etanolde (EtOH) çözündürülüp, 25 ml % 85 fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) eklendikten sonra, 250 ml’ye tamamlanıp Whatman No.1 filtreden geçirilmesiyle hazırlandı ve kullanılmadan önce 5 kez sulandırıldı.

5 ml belirteç üzerine 0.1 ml örnek (1x, 10x ve 100x sulandırmalarda hazırlanmış protein ekstresi) hızla eklenip vorteks ile karıştırıldı. Standart olarak 0.1-1.5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”, BSA çözeltileri, kör örnek olarak protein ekstresinin hazırlandığı tampon, kör standart olarak saf su kullanıldı. Karışımlar 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 595 nm’de köre karşı absorbans ölçümü yapıldı. Standartların protein çözeltilerinin konsantrasyonları ile absorbans değerleri kullanılarak standart grafik hazırlandı. Örneklerin protein konsantrasyonu bu grafikte elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplandı.

### 3.12.5.3. SMT Enzim Aktivitesi Reaksiyonu

Reaksiyonda kullanılan selenosistin (S-1650, Sigma) 50 mM sodyum borohidrid (S-9125, Sigma) ile reaksiyon öncesi indirgendi. Reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 3.14). İnce Tabaka Kromatografi (İTK) için sabit faz olarak hazır silika jel plaklar (Merck Katalog no:5554) kullanıldı. Reaksiyon karışımı 30 dakika 30 °C’de inkübe edildikten sonra her bir reaksiyondan yaklaşık 3 µl örnek kapiller cam pipetler kullanılarak bu plakların üzerine uygulandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Hareketli faz olarak ise n-butanol-asetik asit-H<sub>2</sub>O (4:1:1) kullanıldı. Bu çözücü sisteminde yürütülen plaklar, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra ninhidrin belirteci (0.2% w/v ninhidrin, 6% aseton içinde) plaklara püskürtüldü ve plaklar ısıtılarak oluşan lekeler değerlendirildi.

**Tablo 3.14.** SMT enzim aktivitesi reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Bileşen	Stok Solüsyon	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
Sodyum Sitrat Tamponu	500 mM	5	50 mM
Magnezyum Asetat Tamponu	100 mM	5	10 mM
DTT	50 mM	5	5 mM
Ultra Saf Su	-	50 µl’ye tamamlayacak kadar	-
Selenosistein (taze hazırlanmış)	5 mM	5	0,5 mM
Protein Özütü	-	5 µg protein içerecek kadar	-
S-Adenozilmetionin	5 mM	5	0,5 mM

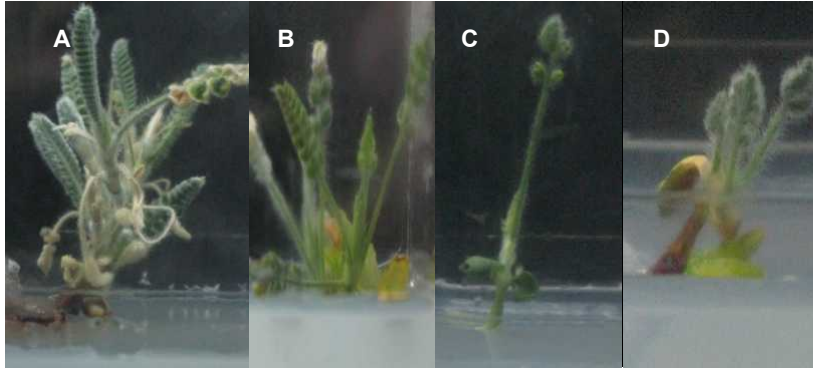
### 3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

SMT geninin anlatım analizlerine ait tüm sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak  $P < 0.05$  olarak kabul edildi. Bu istatistiksel işlemler GraphPad Prism 4.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. TOHURLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ

*Astragalus chrysochlorus* tohumları uygulanan koşullarda başarıyla çimlendirildi ve bu tohumlardan elde edilen bitkicikler, 30 gün süreyle, 1, 5 ve 25 ppm konsantrasyonlarda sodyum selenat ( $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Se}$ ) içeren ve içermeyen MS besiyerlerinde yetiştirildi (Şekil 4.1). Sodyum selenat içeren besiyerlerinde yetiştirilen bitkilerden, cDNA sentezlemek amacıyla, RNA izolasyonu yapıldı.



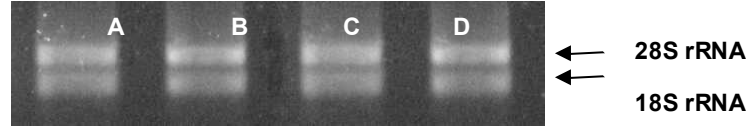
**Şekil 4.1.** A) Kontrol B)1 ppm C) 5 ppm D) 25 ppm sodyum selenat içeren MS besiyerinde yetişen 30 günlük *Astragalus chrysochlorus* bitkileri

### 4.2. SELENOSİSTEİN METİLTRANSFERAZ (SMT) GENİNİN SENTEZİ

*A. chrysochlorus* SMT geninin tüm nükleotid dizisi, total RNA'nın izolasyonu ve bu RNA'lardan cDNA'ların sentezini takiben, genin 3' ucunun 3' RACE PZR ve 5' ucunun 5' RACE PZR, 5' PZR ve SMT PZR yöntemlerinin uygulanmasıyla sentezlendi.

#### 4.2.1. Total RNA İzolasyonu

Selenyum varlığında anlatım yapan genlere ait mRNA havuzunun elde edilmesi için 1, 5 ve 25 ppm sodyum selenat içeren ve kontrol amacıyla sodyum selenat içermeyen MS besiyerinde *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş 30 günlük *A. chrysochlorus* bitkilerinden total RNA başarı ile izole edildi ve OD<sub>260</sub>'da ölçüm alındı. Elde edilen değer Bölüm 3.2.4'te verilen formüle uygulanarak RNA miktarı hesaplandı. RNA miktarının yaklaşık 2000 µg/ml olduğu belirlendi. Total RNA'nın O.D<sub>260</sub>/O.D<sub>280</sub> değeri 1.8-2 aralığında olduğundan saf olarak elde edildiği saptandı. % 1 Agaroz-formaldehit jel elektroforezi ile total RNA'nın 5 µl'si ayrıştırıldı ve RNA'nın izolasyon sırasında yıkılmamış olduğu da doğrulandı (Şekil 4.2).

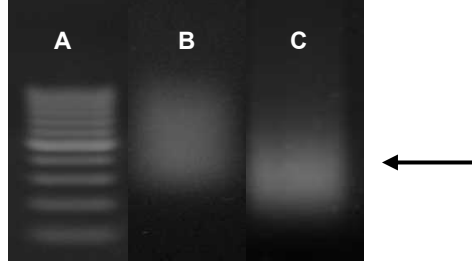


**Şekil 4.2.** A) Kontrol bitkisinden ve B) 1 ppm C) 5 ppm D) 25 ppm sodyum selenat uygulanmış *A. chrysochlorus* bitkilerinden izole edilen bütünlüğü bozulmamış nitelikteki total RNA.

#### 4. 2. 2. cDNA Sentezi

Sodyum selenat varlığında anlatım yapan genlere ait mRNA'ların DNA kopyalarının çıkarılması amacı ile cDNA sentezi yapıldı. 3' RACE PZR, 5' PZR, SMT PZR ve 5' RACE PZR'de kalıp olarak kullanılmak üzere, izole edilen total RNA'dan ters transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA başarıyla sentez edildi ve cDNAlar agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.3). % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen sürüklenme görüntüsü ile total RNA'dan başarı ile cDNA sentez edildiği kanıtlandı (Şekil 4.3).





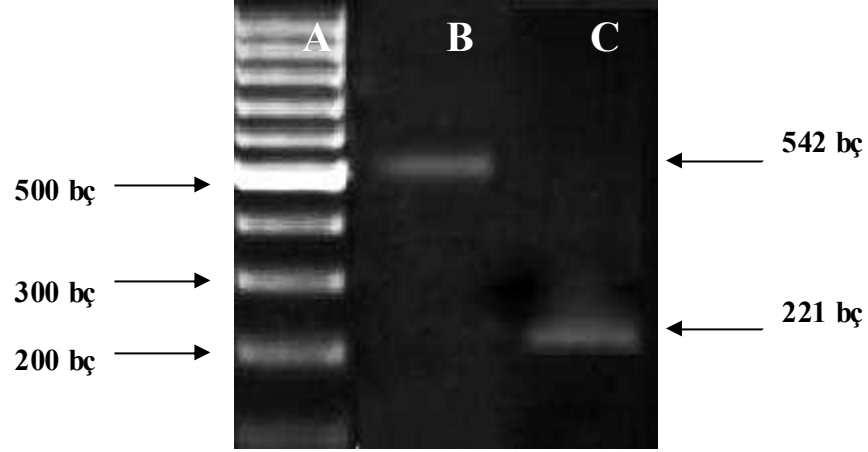
**Şekil 4.3.** 1 ppm sodyum selenat uygulanmış *A. chrysochlorus* bitkilerinden izole edilen bütünlüğü bozulmamış nitelikteki total RNA'lerden sentezlenen cDNA'lar A) Markır (100 bp, Fermentas), B) 3' RACE PZR, 5' PZR, SMT PZR için sentezlenen cDNA'lar, C) 5' RACE reaksiyonları için sentezlenen cDNA'lar.

#### 4. 2. 3. SMT Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonları

SMT geninin 3' ve 5' uçlarına ait dizi bilgisinin elde edilmesi ve genin tamamının çoğaltılması, tasarlanan primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

##### 4. 2. 3. 1. RACE Polimeraz Zincir Reaksiyonları

SMT geninin 3' ve 5' bölgelerinin moleküler analizi amacıyla, Bölüm 4.2.2'de anlatıldığı gibi başarı ile sentez edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı. Arı ve arkadaşları (2010) tarafından *A. bisulcatus* SMT genine % 92 oranında dizi benzerliği gösteren 211- 806 nukleotidler arası 595 bç.lik *A. chrysochlorus* SMT gen bilgisi belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında bu dizi bilgisinden yararlanılarak, SMT geninin 5' ucu için sp1 ve sp2, 3' ucu için primer1 tasarlandı. Primer1 ve poliA kuyruğunun tamamlayıcısı primer2 (oligoT) kullanılarak gerçekleştirilen 3' RACE PZR reaksiyonları sonucunda 542 bç. boyutunda DNA parçası elde edildi (Şekil 4.4-B). Bu DNA'nın daha sonra dizi analizi yapıldı. 5' RACE PZR reaksiyonları ile farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının (1, 1.5, 2, 2.5, 3 mM) ve primer bağlanma sıcaklıklarının (49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 °C) kombinasyonlarının denenmesine rağmen SMT geninin 5' ucu çoğaltılamadı. Bu nedenle SMT geninin 5' ucunu çoğaltmak için 5' PZR reaksiyonları yapıldı.



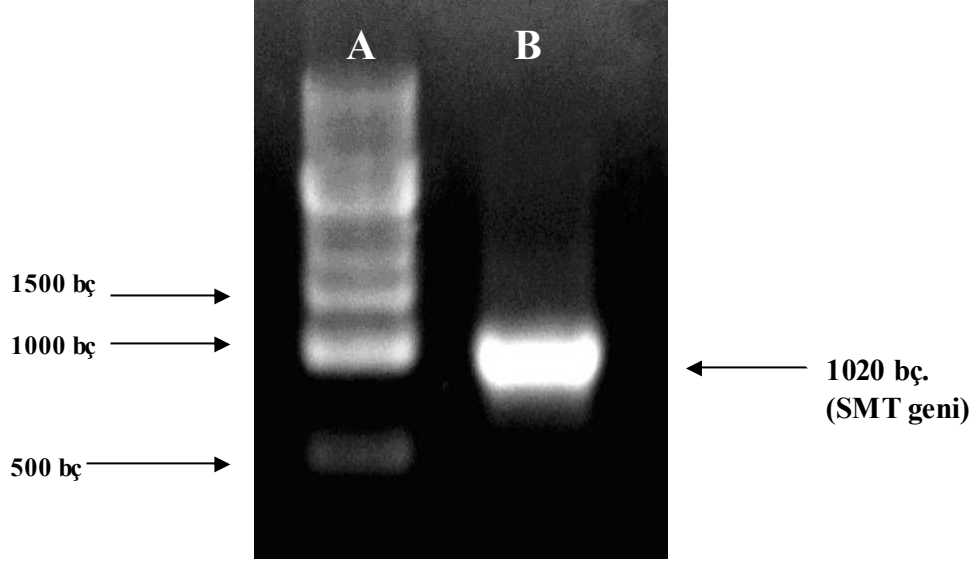
**Şekil 4.4.** PZR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **A.** Markır (100 bp, Fermentas), **B.** 3' RACE ile elde edilen PZR ürünü, **C.** 5' PZR ile elde edilen PZR ürünü.

#### 4. 2. 3. 2. SMT Geninin 5' Bölgesine Ait 5' PZR

SMT geninin 5' bölgesinin moleküler analizi amacıyla, Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi sentez edilen cDNA lar kalıp olarak kullanıldı. Genin 1. bazından itibaren, *A. bisulcatus*, *A. racemosus*, *A. pectinatus*, *A. drummondii*, *A. ceramicus* ve *A. leptocarpus* bitkilerine ait SMT genlerinin ortak dizilerinden tasarlanan primer3 ile *Astragalus chrysochlorus*'da SMT geninin tanımlanmış (Arı ve diğ. 2010) 595 bç'lik bölgesine ait DNA dizi bilgisinden yararlanarak tasarlanan primer4 ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonları sonucunda 221 bç. boyutunda DNA parçası elde edildi (Şekil 4.4-C). Bu DNA'nın daha sonra dizi analizi yapıldı.

#### 4. 2. 3. 3. SMT Geninin Çoğaltılması

SMT geninin tamamı, Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı şekilde sentezlenen cDNA lar kalıp olarak kullanılarak primerA ve primerE yardımıyla çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürününün 1020 bç olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5). SMT geni daha sonra jelden geri alınarak diğer çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı. Genin tamamını çoğaltmak için denenen diğer primerler (primerC ve primerD) ile sonuç elde edilemedi. PrimerA ve primerE ile çoğaltılan *A. chrysochlorus* SMT geninin +1. nükleotidinden başlayan ve stop kodonunun sonuna kadar olan bölümü elde edildi.



**Şekil 4.5.** PZR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **A.** Markır (1 kb Amresco), **B.** SMT geni

#### 4. 3. PZR ÜRÜNLERİNİN DİZİ ve HOMOLOJİ ANALİZLERİ

5' PZR, 3' RACE PZR ve SMT PZR sonucu SMT genine ait sırasıyla 221, 542, 1020 bç.'lik diziler elde edildi. 221 bç.'lik dizi Şekil 4.6'da, 542 bç.'lik dizi Şekil 4.7'de, 1020 bç.'lik dizi Şekil 4.8'de, bu üç dizinin karşılaştırılması ile elde edilen genin +1. nükleotidinden başlayıp 3' UTR'sinin (untranslated region: translyasyona uğramayan bölge) sonuna kadar olan dizi (1242 bç.) ve bu dizinin aminoasit karşılıkları Şekil 4.9'da verildi. Bu genin, dizi analizi sonucunda elde edilen dizi bilgisi ile yapılan BLAST analizleri, bu dizinin veribankalarında *Astragalus* SMT genleri ile yüksek oranda homoloji gösterdiğini ortaya konmuş ve AcSMT adı verilmiştir (Şekil 4.10).

ATGTCGTCGTCATTGATAACGGATTTCTCCATCAAAATGGCGGAACGGC 50  
 CGTCATTGACGGCGGTTTGGCGACGGA GCTTGAACGTCATGGTGCCGATC 100  
 TCAACGATCCTCTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTCCTCTCCTCA CCTCA 151  
 TTCGCCAGGTGCATCTTGA TTATCTAGAAAATGGTGCA GATATTATTATCA 202  
 CAGCATCTTATCAAGCTAC 221

**Şekil 4.6.** *A. chrysochlorus* SMT 5' PZR ile elde edilen nukleotid dizisi (221 bç.)

GCGGTTGGAATCAACTGTACCCCA CCTAGATTTATACATGATCTGATACT 50  
 TCTGCTTAA GAA GGTGA CTGCAAAACCAATTGTTATATATCCAAATA GCG 100  
 GGGAAACTTATGATGGTATCCGAAAA GA GTGGATGCAAAATTCA GGTGTT 150  
 ACAGATGAA GATTTTGTCTCATATGTTGATAAATGGTGTGA GTCA GGGGC 200  
 TTCCCTTGTA GGTGGCTGTTGCA GAACGACCCCGATA CTATTA GA GGGGA 250  
 TATACAAAATACTCTCCA GCGGTCAATCTCCTGCTCTTGCCACAAA GTGA 300  
 CGTCAATCTCTGCTCTTGCCACAAAGTGA CCCCCCTGT CATCAGAAACGA 350  
 GGCAAATGTGCAAACAAATCTACTAGTAATTTCCATGTCAA GAA GGCA GG 400  
 TAGCTGAACTGGGTTGTGTTGCCACTTTGCTGAGATGGGAA GATAAACAT 450  
 GGTTAGCTGCACTAATAACAACAGTAGCAACATGATGTTTTCAACA CACT 500  
 CATTAATTTAATAGGGTGAAA GATAACGGGTCTAATTTTTTTT 542

**Şekil 4.7.** *A. chrysochlorus* SMT 3' RACE PZR ile elde edilen nukleotid dizisi (542 bç.)

ATGTCGTCGTCATTGATAACGGATTTCTCCATCAAAATGGCGGAACGGC	50
CGTCATTGACGGCGGTTTGGCGACGGA GCTTGAACGTCATGGTGCCGATC	100
TCAACGATCCTCTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTCCTCTCCTCACTC	150
ATTCGCCAGGTGCATCTTGATTATCTAGAAAATGGTGCA GATATTATTAT	200
CACAGCATCTTATCAA GCTACCATTCAA GGTTTTAAGGC GAAA GGCTTTT	250
TGATGAA GAA GGTGAA GCCCTGCTAAGGA GAA GTGTTGA GATTGCTCGC	300
GAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCTCTTCAGATAA	350
TAATGGGGATGATAGTAGAATCCTCAA GCAACGACCTATCCTAATTGCGG	400
GATCAGTAGGGA GCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGAGTACAGT	450
GGGAATTATGGTGATGCTATCAA GTTGGAAACTCTTAAAGATTTTCACAG	500
GAGAA GAGTTCAAATTTTGGCAGATTCA GGTGCGGACCTGCTTGCA TTTG	550
AAACAATTCCAAATAAGCTTGAA GCTCAGGCTTATGCA GACCTTCTGGAA	600
GAA GAGAA CATAACTACTCCAGCATGGTTTACGTTTAACTCTAAGGATGG	650
AACTAATGTTGTAGTGGTGATTCAATA GAGGAATGTGGTTCTATTGCTG	700
AATCGTGCAACAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCCACTTGA	750
TTTATACATGATCTGATACCTCTGCTTAA GAA GGTGACTGCAAAAACCAAT	800
TGTTATATATCCAAATA GCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGAAAAGAGT	850
GGATGCAAAAATTCA GGTGTTACAGATGAA GATTTTGTCTCATATGTTGAT	900
AAATGGTGTGAGTCA GGGGCTTCCCTTGTAGGTGGCTGTGCA GAA CGAC	950
CCCCGATAC TATTA GAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGTCAATCTC	1000
CTGCTCTTGCCACAAAGTGA	1020

**Şekil 4.8.** *A. chrysochlorus*'dan SMT PZR ile elde edilen nukleotid dizisi (1020 bç.)

```

ATGTCGTCGTCATTGATAACGGATTTCCCTCCATCAAAAATGGCGGAACGGCCGTCATTGAC      60
  M S S S L I T D F L H Q N G G T A V I D
GGCGGTTTGGCGACGGAGCTTGAACGTCATGGTGCCGATCTCAACGATCCTCTTTGGAGC      120
  G G L A T E L E R H G A D L N D P L W S
GCCAAATGCCTCCTTTTCCCTCCTCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTATCTAGAA      180
  A K C L L S S P H L I R Q V H L D Y L E
AATGGTGCAGATATTATTATCACAGCATCTTATCAAGCTACCATTCAAGGTTTTAAGGCG      240
  N G A D I I I T A S Y Q A T I Q G F K A
AAAGGCTTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTAAGGAGAAGTGTGAGATTGCTCGC      300
  K G F S D E E G E A L L R R S V E I A R
GAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCCTCTTCAGATAATAATGGGGAT      360
  E A R D L Y Y Q R C A E S S S D N N G D
GATAGTAGAATCCTCAAGCAACGACCTATCCTAATTGCGGGATCAGTAGGGAGCTATGGC      420
  D S R I L K Q R P I L I A G S V G S Y G
GCTTATTTGGCTGATGGATCAGAGTACAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTTGGAA      480
  A Y L A D G S E Y S G N Y G D A I K L E
ACTCTTAAAGATTTTTACAGGAGAAGAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGCGGACCTG      540
  T L K D F H R R R V Q I L A D S G A D L
CTTGCATTTGAAACAATTCCAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGACCTTCTGGAA      600
  L A F E T I P N K L E A Q A Y A D L L E
GAAGAGAACATAACTACTCCAGCATGGTTTACGTTTAACTCTAAGGATGGAACATAATGTT      660
  E E N I T T P A W F T F N S K D G T N V
GTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGTTCTATTGCTGAATCGTGCAACAAAGTAGTT      720
  V S G D S I E E C G S I A E S C N K V V
GCGGTTGGAATCAACTGTACCCACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAG      780
  A V G I N C T P P R F I H D L I L L L K
AAGGTGACTGCAAAACCAATTGTTATATATCAAATAGCGGGGAACTTATGATGGTATC      840
  K V T A K P I V I Y P N S G E T Y D G I
CGAAAAGAGTGGATGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATATGTTGAT      900
  R K E W M Q N S G V T D E D F V S Y V D
AAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCCTTGTAGGTGGCTGTTGCAGAACGACCCCCGATACT      960
  K W C E S G A S L V G G C C R T T P D T
ATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGTCAATCTCCTGCTCTTGCCACAAAAGTGA      1020
  I R G I Y K I L S S G Q S P A L A T K *
CGTCAATCTCTGCTCTTGCCACAAAGTGACCCCTGTCATCAGAAACGAGGCAAATGTGCAAAACA      1066
  AATCTACTAGTAATTTCCATGTCAAGAAGGCAGGTAGCTGAACTGGGTTGTGTTGCCACTTT1128
  GCTGAGATGGGAAGATAAACATGGTTAGCTGCACTAATAACAACAGTAGCAACATGATGTTTCAA      1194
  CACACTCATTAAATTTAATAGGGTGAAAGATAACGGGTCTAATTTTTTTT      1242

```

**Şekil 4.9.** *A. chrysochlorus* SMT cDNA dizisi ve aminoasit dizisi (Sistein = C, Histidin = H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin =V, Alanin = A, Glisin = G, Lösin =L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin = N, Aspartat = D, Glutamat = E, Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin =Y , Triptofan = W) (1021-1242. bazlar arası 3' anlatım yapmayan bölgedir.)

'Clustalw' programı kullanılarak *Astragalus bisulcatus* (accession numarası: AJ131433.1, Neuhierl ve diğ..1999), *Astragalus racemosus* (accession numarası: GQ398501.1), *Astragalus pectinatus* (accession numarası: GQ398502.1), *Astragalus drummondii* (accession numarası: GQ398504.1), *Astragalus ceramicus* (accession numarası:

GQ398503.1) ve *Astragalus leptocarpus* (accession numarası: GQ398505.1) (Sors ve diğ., 2009) bitkilerine ait SMT genleri, *Astragalus chrysochlorus*'a ait SMT DNA dizisi ile karşılaştırıldı (Şekil 4.10).

Ar SMT	-----	
AbSMT	AGGAAATCAGAAATATTTTCATAAAACCCACCCTTCCTCCTTCCGTTTCGGG	50
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----	
-		
Ar SMT	-----ATGTCGTCGTCATTGATAACCGATTTCCTCCATCAGGCTGGGC	43
AbSMT	TATCGAAATGTCGTCGCCATTGATAACCGATTTCCTCCATCAGGCTGGGC	100
ApSMT	-----ATGTCGTCGTCATTGATAACCGATTTCCTCCGTCAGGCTGGGC	43
AlSMT	-----ATGTCGTCGTCATTGATAACCGATTTCCTCCATCAGGCTGGGC	43
AceSMT	-----ATGTCGTCGTCATTGATAACCGATTTCCTCCATCAGGCTGGGC	43
AdSMT	-----ATGTCGTCGTCATTGATAACCGATTTCCTCCATCAGGCTGGGC	43
AcSMT	-----ATGTCGTCGTCATTGATAACCGATTTCCTCCATCAAAATGGCG	43
-		
Ar SMT	GAACGGCTATCATCGCCGGCGGTTTAGGGACGGAGCTTGGACGTCATGGC	93
AbSMT	GAGCGGCTGTCATCGCCGGCGGTTTAGGGACGGAGCTTCAACGTCATGGC	150
ApSMT	GACCGGCTATCATCGCCGGCGGTTTAGGGACGGAGCTTGAACGTCATGGC	93
AlSMT	GAACGGCTGTCATCGCCGGCGGTTTAGGGACGGAGCTTGAACGTCATGGC	93
AceSMT	GAACGGCTGTCATCGCCGGCGGTTTAGGGACGGAGCTTGAACGTCATGGC	93
AdSMT	GAACGGCTGTCATCGCCGGCGGTTTAGGGACGGAGCTTGAACGTCATGGC	93
AcSMT	GAACGGCTGTCATCGGGGGCGGTTTAGGGACGGAGCTTGAACGTCATGGC	93
-		
Ar SMT	GCCGACCTCAACGATCCACTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTTCCTCCC	143
AbSMT	GCCGACCTCAACGATCCACTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTTCCTGCCC	200
ApSMT	GCCGACCTCAACGATCCACTTTGGAGCGCCAAATGCCTCTATTTCCTCCC	143
AlSMT	GCCGACCTCAACGATCCACTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTTCCTCCC	143
AceSMT	GCCGACCTCAACGATCCACTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTTCCTCCC	143
AdSMT	GCCGACCTCAACGATCCACTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTTCCTCCC	143
AcSMT	GCCGATCTCAACGATCCTCTTTGGAGCGCCAAATGCCTCCTTTTCCTCTCC	143
-		

**Şekil 4.10:** Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT,: *Astragalus bisulcatus*, ArSMT: *Astragalus racemosus*, ApSMT: *Astragalus pectinatus*, AdSMT: *Astragalus drummondii*, Ace: *Astragalus ceramicus* ve AlSMT: *Astragalus leptocarpus*, CsSMT: *Camellia sinensis*, BoSMT: *Brassica oleracea var italica* ve AcSMT: *Astragalus chrysochlorus*)

Ar SMT	TCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTACCTAGAAAAATGGTGCAGATA	193
AbSMT	TCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTACCTAGAAAAATGGTGCAGATA	250
ApSMT	TCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTACCTAGAAAAATGGTGCAGATA	193
AlSMT	TCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTACCTAGAAAAATGGTGCAGATA	193
AceSMT	TCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTACCTAGAAAAATGGTGCAGATA	193
AdSMT	TCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTACCTAGAAAAATGGTGCAGATA	193
AcSMT	TCACCTCATTGCGCCAGGTGCATCTTGATTATCTAGAAAAATGGTGCAGATA	193
Ar SMT	TTATTATTACAGCATCTTATCAAGCCACCATTCAAGGTTTTAAAGCGGAAA	243
AbSMT	TTATTATTACAGCATCTTATCAAGCCACCATTCAAGGTTTTAAAGCGGAAA	300
ApSMT	TTATTATTACAGCATCTTATCAAGCCACCATTCAAGGTTTTAAAGCGGAAA	243
AlSMT	TTATTATTACAGCATCTTATCAAGCCACCATTCAAGGTTTTAAAGCGGAAA	243
AceSMT	TTATTATTACAGCATCTTATCAAGCCACCATTCAAGGTTTTAAAGCGGAAA	243
AdSMT	TTATTATTACAGCATCTTATCAAGCCACCATTCAAGGTTTTAAAGCGGAAA	243
AcSMT	TTATTATCACAGCATCTTATCAAGCTACCATTCAAGGTTTTAAAGCGGAAA	243
Ar SMT	GGCTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTTAGGAGAAGTGTGAGAT	293
AbSMT	GGCTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTTAGGAGAAGTGTGAGAT	350
ApSMT	GGCTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTTAGGAGAAGTGTGAGAT	293
AlSMT	GGCTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTTAGGAGAAGTGTGAGAT	293
AceSMT	GGCTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTTAGGAGAAGTGTGAGAT	293
AdSMT	GGCTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTTAGGAGAAGTGTGAGAT	293
AcSMT	GGCTTTTCTGATGAAGAAGGTGAAGCCCTGCTTAGGAGAAGTGTGAGAT	293
Ar SMT	TGCCCCGCGAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTT	343
AbSMT	TGCCCCGCGAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTT	400
ApSMT	TGCCCCGCGAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTT	343
AlSMT	TGCCCCGCGAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTT	343
AceSMT	TGCCCCGCGAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTT	343
AdSMT	TGCCCCGCGAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTT	343
AcSMT	TGCTCGCGAGGCTCGTGATTTGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTT	343

**Şekil 4.10 (devam):** Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT: *Astragalus bisulcatus*, ArSMT: *Astragalus racemosus*, ApSMT: *Astragalus pectinatus*, AdSMT: *Astragalus drummondii*, Ace: *Astragalus ceramicus* ve AlSMT: *Astragalus leptocarpus*, AcSMT: *Astragalus chrysochlorus*)



Ar SMT	CAGATAAT---GGGGATGATAGTAGAATCCTTAAGCAACGGCCTATCCTA	390
AbSMT	CAGATAAT---GGGGATGATAGTAGAATCCTTAAGCAACGGCCTATCCTA	447
ApSMT	CAGATAAT---GGGGATGATAGTAGAATCCTTAAGCCACGGCCTATCCTA	390
AlSMT	CAGATAAT---GGGGATGATAGTAGAATCCTTAAGCAACGGCCTATCCTA	390
AceSMT	CAGATAAT---GGGGATGATAGTAGAATCCTTAAGCAACGGCCTATCCTA	390
AdSMT	CAGATAAT---GGGGATGATAGTAGAATCCTTAAGCAACGGCCTATCCTA	390
AcSMT	CAGATAAATAATGGGGATGATAGTAGAATCCTCAAGCAACGACCTATCCTA	393
-		
Ar SMT	ATTGCGGGATCAGTAGGGAGCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGA	440
AbSMT	ATTGCGGGATCAGTAGGGAGCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGA	497
ApSMT	ATTGCGGGATCAATAGGGAGCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGA	440
AlSMT	ATTGCGGGATCAGTAGGGAGCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGA	440
AceSMT	ATTGCGGGATCAGTAGGGAGCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGA	440
AdSMT	ATTGCGGGATCAGTAGGGAGCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGA	440
AcSMT	ATTGCGGGATCAGTAGGGAGCTATGGCGCTTATTTGGCTGATGGATCAGA	443
-		
Ar SMT	GTTACAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTTGGAACTCTTAAAGATT	490
AbSMT	GTTACAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTCGGAACTCTTAAAGATT	547
ApSMT	GTTTAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTTGGAACTCTTAAAGATT	490
AlSMT	GTACAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTTGGAACTCTTAAAGATT	490
AceSMT	GTACAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTTGGAACTCTTAAAGATT	490
AdSMT	GTACAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTTGGAACTCTTAAAGATT	490
AcSMT	GTACAGTGGGAATTATGGTGATGCTATCAAGTTGGAACTCTTAAAGATT	493
-		
Ar SMT	TTCACCGGAGAAAAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGTGGACCTGCTT	540
AbSMT	TTCACCGGAGAAAAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGTGGACCTGCTT	597
ApSMT	TTCACCGGAGAAAGAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGTGGACCTGCTT	540
AlSMT	TTCACCGGAGAAAGAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGTGGACCTGCTT	540
AceSMT	TTCACCGGAGAAAGAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGTGGACCTGCTT	540
AdSMT	TTCACCGGAGAAAGAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGTGGACCTGCTT	540
AcSMT	TTCACAGGAGAAAGAGTTCAAATTTTGGCAGATTCAGGTGCGGACCTGCTT	543

**Şekil 4.10 (devam):** Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT: *Astragalus bisulcatus*, ArSMT: *Astragalus racemosus*, ApSMT: *Astragalus pectinatus*, AdSMT: *Astragalus drummondii*, Ace: *Astragalus ceramicus* ve AlSMT: *Astragalus leptocarpus*, AcSMT: *Astragalus chrysochlorus*)

Ar SMT	GCATTTGAAGCAGTTCCAAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGATCT	590
AbSMT	GCATTTGAAGCAGTTCCAAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGATCT	647
ApSMT	GCATTTGGAGCAGTTCCAAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGATCT	590
AlSMT	GCATTTGAAGCAGTTCCAAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGATCT	590
AceSMT	GCATTTGAAGCAGTTCCAAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGATCT	590
AdSMT	GCATTTGAAGCAGTTCCAAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGATCT	590
AcSMT	GCATTTGAAAACAATTCCAAAATAAGCTTGAAGCTCAGGCTTATGCAGACCT	593
Ar SMT	TCTGGAAGAAGAGAACATGATTACTCCAGCATGGTTTGCCTTTAACTCTA	640
AbSMT	TCTGGAAGAGGAGAACATAATTACTCCAGCATGGTTTGCCTTTACCTCTA	697
ApSMT	TCTGGAAGAAGAGAACATAATTACTCCAGCATGGTTTGCCTTTAACTCTA	640
AlSMT	TCTGGAAGAAGAGAACATAATTACTCCAGCATGGTTTGCCTTTAACTCTA	640
AceSMT	TCTGGAAGAAGAGAACATAATTACTCCAGCATGGTTTGCCTTTAACTCTA	640
AdSMT	TCTGGAAGAAGAGAACATAATTACTCCAGCATGGTTTGCCTTTAACTCTA	640
AcSMT	TCTGGAAGAAGAGAACATAACTACTCCAGCATGGTTTACCTTTAACTCTA	643
Ar SMT	AGGATGGAACATAATGTTGTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGCTCT	690
AbSMT	AGGATGGAATAATGTTGTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGCTCT	747
ApSMT	AGGATGGAACATAATGTTGTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGCTCT	690
AlSMT	AGGATGGAACATAATGTTGTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGCTCT	690
AceSMT	AGGATGGAACATAATGTTGTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGCTCT	690
AdSMT	AGGATGGAACATAATGTTGTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGCTCT	690
AcSMT	AGGATGGAACATAATGTTGTTAGTGGTGATTCAATAGAGGAATGTGGTTCT	693
Ar SMT	ATTGCTGAATCATGCGACAAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCC	740
AbSMT	ATTGCTGAATCATGCGACAAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCC	797
ApSMT	ATTGCTGAATCATGCGACAAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAGCTGTACCCC	740
AlSMT	ATTGCTGAATCATGCGACAAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCC	740
AceSMT	ATTGCTGAATCATGCGACAAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCC	740
AdSMT	ATTGCTGAATCATGCGACAAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCC	740
AcSMT	ATTGCTGAATCGTGCAACAAAAGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCC	743

**Şekil 4.10 (devam):** Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT: *Astragalus bisulcatus*, ArSMT: *Astragalus racemosus*, ApSMT: *Astragalus pectinatus*, AdSMT: *Astragalus drummondii*, Ace: *Astragalus ceramicus* ve AlSMT: *Astragalus leptocarpus*, AcSMT: *Astragalus chrysochlorus*)

Ar SMT	ACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAGAAGGTGACTGCAA	790
AbSMT	ACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAGAAGGTGACTGCAA	847
ApSMT	ACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAGAAGGTGACTGCAA	790
AlSMT	ACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAGAAGGTGACTGCAA	790
AceSMT	ACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAGAAGGTGACTGCAA	790
AdSMT	ACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAGAAGGTGACTGCAA	790
AcSMT	ACCTAGATTTATACATGATCTGATACTTCTGCTTAAGAAGGTGACTGCAA	793
Ar SMT	AACCAATTGTTATATATATCCAAATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGA	840
AbSMT	AACCAATTGTTATATATATCCAAATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGA	897
ApSMT	AACCAATTGTTATATATATCCAAATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGA	840
AlSMT	AACCAATTGTTATATATATCCAAATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGA	840
AceSMT	AACCAATTGTTATATATATCCAAATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGA	840
AdSMT	AACCAATTGTTATATATATCCAAATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGA	840
AcSMT	AACCAATTGTTATATATATCCAAATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGA	843
Ar SMT	AAAGAGTGGGGGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATA	890
AbSMT	AAAGAGTGGGGGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATA	947
ApSMT	AAAGAGTGGGGGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATA	890
AlSMT	AAAGAGTGGGGGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATA	890
AceSMT	AAAGAGTGGGGGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATA	890
AdSMT	AAAGAGTGGGGGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATA	890
AcSMT	AAAGAGTGGGATGCAAAATTCAGGTGTTACAGATGAAGATTTTGTCTCATA	893
Ar SMT	TGTTGATAAAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCTTGTAGGTGGCTGTTGCA	940
AbSMT	TGTTGATAAAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCTTGTAGGTGGCTGTTGCA	997
ApSMT	TGTTGATAAAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCTTGTAGGTGGCTGTTGCA	940
AlSMT	TGTTGATAAAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCTTGTAGGTGGCTGTTGCA	940
AceSMT	TGTTGATAAAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCTTGTAGGTGGCTGTTGCA	940
AdSMT	TGTTGATAAAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCTTGTAGGTGGCTGTTGCA	940
AcSMT	TGTTGATAAAATGGTGTGAGTCAGGGGCTTCCTTGTAGGTGGCTGTTGCA	943

**Şekil 4.10 (devam):** Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT: *Astragalus bisulcatus*, ArSMT: *Astragalus racemosus*, ApSMT: *Astragalus pectinatus*, AdSMT: *Astragalus drummondii*, Ace: *Astragalus ceramicus* ve AlSMT: *Astragalus leptocarpus*, AcSMT: *Astragalus chrysochlorus*)

Ar SMT	GAACGACCCCTGATACCATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGT	990
AbSMT	GAACGACCCCTGATACCATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGT	1047
ApSMT	GAACGGCCCTGATACCATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGT	990
AlSMT	GAACGACCCCTGATACCATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGT	990
AceSMT	GAACGACCCCTGATACCATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGT	990
AdSMT	GAACGACCCCTGATACCATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGT	990
AcSMT	GAACGACCCCGATACTATTAGAGGGATATACAAAATACTCTCCAGCGGT	993
Ar SMT	CAATCTCCTACTTTTTCTGCAAAGTGA-----	1017
AbSMT	CAATCTCCTACTTTTTCTGCAAAGTGACCACTCTGTTCATCAGAAACGAGG	1097
ApSMT	CAATCTCCTACTTTTTCTGCAAAGTGA-----	1017
AlSMT	CAATCTCCT---TTTTCTGCAAAGTGA-----	1014
AceSMT	CAATCTCCT---TTTTCTGCAAAGTGA-----	1014
AdSMT	CAATCTCCT---TTTTCTGCAAAGTGA-----	1014
AcSMT	CAATCTCCTGCTCTTGCCACAAAGTGAC-----	1021
Ar SMT	-----	
AbSMT	CAAAATGTGCAAACAAATCTACTAGTAATTTCCATGTCAAGAAGGCCAGTA	1147
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----GTCAATCTCTGCTCTTGCCACAAAGTGA---	1049
Ar SMT	-----	
AbSMT	GCTGAACTGGGTTGTGTTGGCACTCAATATTTTTCTACTGTGTAGTTAAT	1197
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----	
Ar SMT	-----	
AbSMT	GTTGAGTCTGCATAGACACATAAATAGTTGATCTCAAATTTGGTTTTTGT	1247
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----	

**Şekil 4.10 (devam):** Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT: *Astragalus bisulcatus*, ArSMT: *Astragalus racemosus*, ApSMT: *Astragalus pectinatus*, AdSMT: *Astragalus drummondii*, Ace: *Astragalus ceramicus* ve AlSMT: *Astragalus leptocarpus*, AcSMT: *Astragalus chrysochlorus*)

Ar SMT	-----	
AbSMT	TATAAGCTTGTGTATATTGGCAAGCAGATTAGAAAAATAATGACAAATTAC	1297
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----	
-	-----	
Ar SMT	-----	
AbSMT	TATATGCTTTATAAAACAACTGTTGATATTGGCAAGCAGATTAGAAAAATAA	1347
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----	
-	-----	
Ar SMT	-----	
AbSMT	TGACAAATTACTATATGCTTTATAAAACAACTGTTGTGGCCAAGACAAATA	1397
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----	
-	-----	
Ar SMT	-----	
AbSMT	TTGTAAACAAAAACCAACTATAAATATTACAAAAAACTCAATGGGTTGTT	1447
ApSMT	-----	
AlSMT	-----	
AceSMT	-----	
AdSMT	-----	
AcSMT	-----	
-	-----	

**Şekil 4.10 (devam):** Nükleik asit dizi karşılaştırmaları (AbSMT: *Astragalus bisulcatus*, ArSMT: *Astragalus racemosus*, ApSMT: *Astragalus pectinatus*, AdSMT: *Astragalus drummondii*, Ace: *Astragalus ceramicus* ve AlSMT: *Astragalus leptocarpus* ve AcSMT: *Astragalus chrysochlorus*)

Nükleik asit dizilerinin karşılaştırılması sonucu *Astragalus chrysochlorus* SMT geninin tamamı ile *Astragalus bisulcatus*, *Astragalus racemosus*, *Astragalus pectinatus*, *Astragalus drummondii*, *Astragalus ceramicus* ve *Astragalus leptocarpus*'a ait SMT dizileri arasında yüksek derecede benzerlik olduğu belirlendi. Benzerlik oranları Tablo 4.1'de verildi.

**Tablo 4.1:** *A. chrysochlorus* SMT gen dizisinin veri bankası tarama sonuçları

Eşleşen tür ve diziler	<i>A. chrysochlorus</i> SMT geni ile olan benzerlik (%)	E değeri*
<i>Astragalus bisulcatus</i> SMT	97	0
<i>Astragalus racemosus</i> SMT	97	0
<i>Astragalus pectinatus</i> SMT	97	0
<i>Astragalus drummondii</i> SMT-benzeri protein	95	0
<i>Astragalus ceramicus</i> SMT	95	0
<i>Astragalus leptocarpus</i> SMT	95	0
<i>Vitis vinifera</i> hipotetik al prote in XM_002283008.1	54	2e-91
<i>Vitis vinifera</i> hipotetik al prote in XM_002283018.1	18	2e-31
<i>Vitis vinifera</i> contig VV87X163117.12	12	3e-20
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone	6	9e-15

\* E değeri: Aranılan dizinin, veritabanı içinde bulunan dizilerle şans eseri eşleşme olasılığını gösterir.

Ayrıca ‘Clustalw’ programı kullanılarak SMT geni taşıyan *A. bisulcatus*, *A. racemosus*, *A. pectinatus*, *A. drummondii*, *A. ceramicus*, *A. leptocarpus*, *Camelia sinensis* ve *Brassica oleracea* var. *italica* bitkilerine ait SMT aminoasit dizileri, *A. chrysochlorus*’a ait SMT DNA dizisinden elde edilen aminoasit dizisi ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonuçları Şekil 4.11’de verildi.

<i>A. chrysochlorus</i> SMT	-----METSLLITDFLHQNGGTAVIDGGLATELERHGADLND
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	-----MSSSLITDFLHQAGRTAVIGGGLATELERHGADLND
<i>A. leptocarpus</i> SMT	-----MSSSLITDFLHQAGRTAVIAGGLATELERHGADLND
<i>A. ceramicus</i> SMT	-----MSSSLITDFLHQAGRTAVIAGGLATELERHGADLND
<i>A. racemosus</i> SMT	-----MSSPLITDFLHQAGRAAVIAGGLCTELQRHGADLND
<i>A. bisulcatus</i> SMT	-----MSSSLITDFLRQACRPATIIAGGLCTELERHGADLND
<i>A. pectinatus</i> SMT	MGLSVAETSSSSSSSPMMIPDLLRQSGSVAIIDGGLATELERHGADLND
<i>C. sinensis</i> SMT	-----MVTGNTRKAEFTFYSMKELLKRETCGYAIIIDGGLATELERHGADLND
<i>B. olerae</i> SMT	
<i>A. chrysochlorus</i> SMT	PLWSAKCLLSSPHLIRQVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDE
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	PLWSAKCLLSSPHLIRQVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDE
<i>A. leptocarpus</i> SMT	PLWSAKCLLSSPHLIRQVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDE
<i>A. ceramicus</i> SMT	PLWSAKCLLSSPHLIRQVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDE
<i>A. racemosus</i> SMT	PLWSAKCLLSSPHLIRQVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDE
<i>A. bisulcatus</i> SMT	PLWSAKCLLSSPHLIRQVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDE
<i>A. pectinatus</i> SMT	PLWSAKCLYSSPHLIRQVHLDYLENGADIIITASYQATIQQFKAKGFSDE
<i>C. sinensis</i> SMT	PLWSAKCLLTSPHLIRRVHLDYLEAGADIIITASYQATIQQFEAKGFSQE
<i>B. olerae</i> SMT	PLWSAKCLLTSPHLIHTVHLDYLEAGADIISSASYQATIQQFEAKGFSIE
<i>A. chrysochlorus</i> SMT	EGEALLRRSVEIAREARDLYYQRCAESSDNMGDDSRILKQRPILIAGSV
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	EGEALLRRSVEIAREARDLYYQRCAESSDN-GDDSRILKQRPILIAGSV
<i>A. leptocarpus</i> SMT	EGEALLRRSVGIAREARDLYYQRCAESSDN-GDDSRILKQRPILIAGSV
<i>A. ceramicus</i> SMT	EGEALLRRSVEIAREARDLYYQRCAESSDN-GDDSRILKQRPILIAGSV
<i>A. racemosus</i> SMT	EGEALLRRSVEIAREARDLYYQRCAESSDN-GDDSRILKQRPILIAGSV
<i>A. bisulcatus</i> SMT	EGEALLRRSVEIAREARDLYYQRCAESSDN-GDDSRILKQRPILIAGSV
<i>A. pectinatus</i> SMT	EGEALLRRSVEIAREARDLYYQRCAESSDN-GDDSRILKQRPILIAGSI
<i>C. sinensis</i> SMT	ESEAMLRKRCVEIAREARDIYYENCRELSNDS-ADDGRVLKHRSLVAASV
<i>B. olerae</i> SMT	KSESLLRKSVIACEARSTYYDKCKD-----DDDKKILKRPILVAASV
<i>A. chrysochlorus</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSCNYGDAIKLET LKDFHRRRVQILADSGVDLLAFETI
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	GSYGAYLADGSEYSCNYGDAIKLET LKDFHRRRVQILADSGVDLLAFEAV
<i>A. leptocarpus</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSCNYGDAIKLET LKDFHRRRVQILADSGVDLLAFEAV
<i>A. ceramicus</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSCNYGDAIKLET LKDFHRRRVQILADSGVDLLAFEAV
<i>A. racemosus</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSCNYGDAIKLET LKDFHRRRVQILADSGVDLLAFEAV
<i>A. bisulcatus</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSCNYGDAIKLET LKDFHRRRVQILADSGVDLLAFEAV
<i>A. pectinatus</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSCNYGDAIKLET LKDFHRRRVQILADSGVDLLAFGAV
<i>C. sinensis</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSGDYGNAMDLEFLKDFHRRRVQILADAGADLIAFETV
<i>B. olerae</i> SMT	GSYGAYLADGSEYSGIYGD LITLET LKDFHRRRVQVLAESGADIIAFETI

**Şekil 4.11.** Amino asit dizi karşılaştırmaları (*A. chrysochlorus* SMT, *A. drummondii*-SMT benzeri protein, *A. leptocarpus* SMT, *A. ceramicus* SMT, *A. racemosus* SMT, *A. bisulcatus* SMT, *A. pectinatus* SMT, *C. sinensis* SMT, *B. olerae* SMT) (Sistein = C, Histidin = H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin =V, Alanin = A, Glisin = G, Lösin =L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin = N, Aspartat = D, Glutamat = E, Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin =Y , Triptofan = W)

<i>A. chrysochlorus</i> SMT	PNKLEAQAYADLLEENITTPAWFTFNSKDGTVVSGDSIEECGCSIAESC
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	PNKLEAQAYADLLEENITTPAWFAFNSKDGTVVSGDSIEECGCSIAESC
<i>A. leptocarpus</i> SMT	PNKLEAQAYADLLEENITTPAWFAFNSKDGTVVSGDSIEECGCSIAESC
<i>A. ceramicus</i> SMT	PNKLEAQAYADLLEENITTPAWFAFNSKDGTVVSGDSIEECGCSIAESC
<i>A. racemosus</i> SMT	PNKLEAQAYADLLEENITTPAWFAFNSKDGTVVSGDSIEECGCSIAESC
<i>A. bisulcatus</i> SMT	PNKLEAQAYADLLEENITTPAWFAFNSKDGTVVSGDSIEECGCSIAESC
<i>A. pectinatus</i> SMT	PNKLEAQAYADLLEENITTPAWFAFNSKDGTVVSGDSIEECGCSIAESC
<i>C. sinensis</i> SMT	PNKLEAQAYARLLEEDIKIPAWFSFNSKDGTVVSGDSLLECAAIAEAC
<i>B. olerae</i> SMT	PNKLEAQAFAEELDEGVAKIPGWFSFNSKDGTVVSGDSIKRCIATAEAC
<i>A. chrysochlorus</i> SMT	NKVVAVGINCTPPRFIHDLILLLKRVTAKEPVIYVNSGETYDGIKREWME
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	DKVVAVGINCTPPRFIHDLILLLKRVTAKEPVIYVNSGETYDGIKREWQ
<i>A. leptocarpus</i> SMT	DKVVAVGINCTPPRFIHDLILLLKRVTAKEPVIYVNSGETYDGIKREWQ
<i>A. ceramicus</i> SMT	DKVVAVGINCTPPRFIHDLILLLKRVTAKEPVIYVNSGETYDGIKREWQ
<i>A. racemosus</i> SMT	DKVVAVGINCTPPRFIHDLILLLKRVTAKEPVIYVNSGETYDGIKREWQ
<i>A. bisulcatus</i> SMT	DKVVAVGINCTPPRFIHDLILLLKRVTAKEPVIYVNSGETYDAIKREWQ
<i>A. pectinatus</i> SMT	DKVVAVGINCTPPRFIHDLILLLKRVTAKEPVIYVNSGETYDGIKREWQ
<i>C. sinensis</i> SMT	KKVVAVGINCTPPRFIHDLILTVKRGTTKPLIYVNSGESYDADKREWQ
<i>B. olerae</i> SMT	EKVVAVGINCTPPRFIRGLVLEIARVTSKPLVYVNSGERYDPERKEWVE
<i>A. chrysochlorus</i> SMT	TQNSCVTDEDVFSYVDRKWCESGASLVGGCCRTTTPDTIRGIYKILSSGQSP
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	N--SCVTDDEDVFSYVDRKWCESGASLVGGCCRTTTPDTIRGIYKILSSGQSP
<i>A. leptocarpus</i> SMT	N--SCVTDDEDVFSYVDRKWCESGASLVGGCCRTTTPDTIRGIYKILSSGQSP
<i>A. ceramicus</i> SMT	N--SCVTDDEDVFSYVDRKWCESGASLVGGCCRTTTPDTIRGIYKILSSGQSP
<i>A. racemosus</i> SMT	N--SCVTDDEDVFSYVDRKWCESGASLVGGCCRTTTPDTIRGIYKILSSGQSP
<i>A. bisulcatus</i> SMT	N--SCVTDDEDVFSYVDRKWCESGASLVGGCCRTTTPDTIRGIYKILSSGQSP
<i>A. pectinatus</i> SMT	N--SCVTDGDFVSYVDRKWCESGASLVGGCCRTTTPDTIRGIYKILSSGQSP
<i>C. sinensis</i> SMT	N--TGVSDDDFVSCVNTWCDVGSASLVGGCCRTTTPNTIRAIYKRLSNRSAA
<i>B. olerae</i> SMT	N--TGVGNEDFVSYVERKWDAGVSLGGCCRTTPTTIRAIHKLRLVSRSL
<i>A. chrysochlorus</i> SMT	ALATKSTP-----
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	FSAK-----
<i>A. leptocarpus</i> SMT	FSAK-----
<i>A. ceramicus</i> SMT	FSAK-----
<i>A. racemosus</i> SMT	TFSAK-----
<i>A. bisulcatus</i> SMT	TFSAK-----
<i>A. pectinatus</i> SMT	TFSAK-----
<i>C. sinensis</i> SMT	PSLK-----
<i>B. olerae</i> SMT	FSSSSSSSHHCNTENT-DISPITINFRM-DATANAMESEQFILEFILEN
<i>A. chrysochlorus</i> SMT	-----
<i>A. drummondii</i> -SMT benzeri protein	-----
<i>A. leptocarpus</i> SMT	-----
<i>A. ceramicus</i> SMT	-----
<i>A. racemosus</i> SMT	-----
<i>A. bisulcatus</i> SMT	-----
<i>A. pectinatus</i> SMT	-----
<i>C. sinensis</i> SMT	-----
<i>B. olerae</i> SMT	-----
	AMECNTENT-TYPEAPPLICATIONCTET-STREAM

**Şekil 4.11. (devam)** Amino asit dizi karşılaştırmaları (*A. chrysochlorus* SMT, *A. drummondii*-SMT benzeri protein, *A. leptocarpus* SMT, *A. ceramicus* SMT, *A. racemosus* SMT, *A. bisulcatus* SMT, *A. pectinatus* SMT, *C. sinensis* SMT, *B. olerae* SMT) (Sistein = C, Histidin = H, İzolösin = I, Metionin = M, Serin = S, Valin =V, Alanin = A, Glisin = G, Lösin =L, Prolin = P, Treonin = T, Arginin = R, Asparagin = N, Aspartat = D, Glutamat = E, Glutamin = Q, Fenilalanin = F, Trozin =Y , Triptofan = W)

Aminoasit dizilerinin karşılaştırılması sonuçlarına göre *Astragalus chrysochlorus* SMT enzimi ile *A. bisulcatus*, *A. racemosus*, *A. pectinatus*, *A. drummondii*, *A. ceramicus*, *A. leptocarpus*, *Camellia sinensis*'e ve *Brassica oleracea* var. *italica*'ya ait SMT proteinleri arasında benzerlik olduğu belirlendi. Benzerlik oranları Tablo 4.2'de verildi.



**Tablo 4.2.** *A. chrysochlorus* SMT aminoasit dizisinin farklı bitkilere ait SMT aminoasit dizileri ile karşılaştırılması.

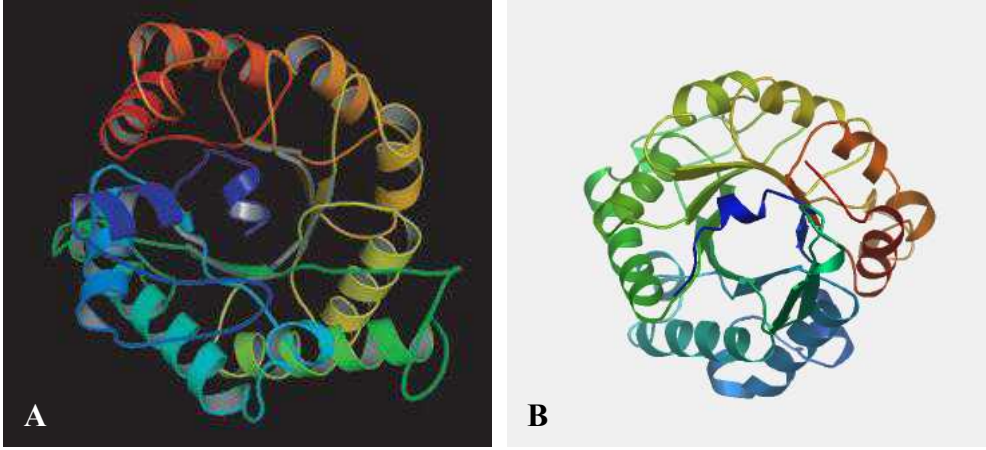
<b>Bitki adı</b>	<b><i>A. chrysochlorus</i> SMT aminoasit dizisine olan benzerlik (%)</b>	<b>E değeri</b>
<i>Astragalus bisulcatus</i>	97	e-176
<i>Astragalus racemosus</i>	97	e-179
<i>Astragalus pectinatus</i>	97	e-173
<i>Astragalus drummondii</i>	96	0
<i>Astragalus ceramicus</i>	96	e-179
<i>Astragalus leptocarpus</i>	96	e-179
<i>Camellia sinensis</i>	96	e-144
<i>Brassica oleracea var. italica</i>	93	e-131

Aminoasit dizilerinin karşılaştırılması sonuçlarına göre protein veri bankasında (Expasy) bulunan diğer sonuçlar Tablo 4.3’de verildi.

**Tablo 4.3.** *A. chrysochlorus* SMT aminoasit dizisinin farklı proteinlere ait aminoasit dizileri ile karşılaştırılması.

Eşleşen Protein	E değeri
selenocysteine methyltransferase-like protein [Astragalus drummondii]	0.0
selenocysteine methyltransferase [Astragalus ceramicus]	0.0
selenocysteine methyltransferase [Astragalus leptocarpus]	0.0
selenocysteine methyltransferase [Astragalus racemosus]	0.0
RecName: Full=Selenocysteine methyltransferase; Short=SECYS-MT	0.0
selenocysteine methyltransferase [Astragalus pectinatus]	8e-179
homocysteine s-methyltransferase [Populus trichocarpa] >gb EEE94598.1	8e-157
homocysteine s-methyltransferase [Populus trichocarpa] >gb EEE80097.1	1e-155
5-methyltetrahydrofolate:homocysteine methyltransferase, putative [Ricinus	2e-153
PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [Vitis vinifera]	3e-153
selenocysteine methyltransferase [Camellia sinensis]	2e-150
PREDICTED: hypothetical protein isoform 3 [Vitis vinifera]	4e-149
unnamed protein product [Vitis vinifera]	5e-146
PREDICTED: hypothetical protein isoform 1 [Vitis vinifera] >emb CBI26290.3	4e-143
HMT2 (HOMOCYSTEINE METHYLTRANSFERASE 2); homocysteine S-methyltra	8e-142
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2 [Arabidopsis thaliana]	3e-141
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2 [Arabidopsis lyrata subsp.	6e-140
5-methyltetrahydrofolate:homocysteine methyltransferase, putative [Ricinus	1e-139
homocysteine s-methyltransferase [Populus trichocarpa] >gb EEF00845.1	1e-138
PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 [Vitis vinifera]	1e-137
homocysteine S-methyltransferase 3 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >gb	3e-137
unknown [Glycine max]	1e-135
unknown [Picea sitchensis]	2e-135
unknown [Glycine max]	2e-135
HMT3; homocysteine S-methyltransferase [Arabidopsis thaliana] >sp Q8LAX	1e-134
putative selenocysteine methyltransferase [Arabidopsis thaliana]	2e-132
homocysteine s-methyltransferase [Populus trichocarpa] >gb EEE89909.1	8e-132
selenocysteine methyltransferase [Brassica oleracea var. italica]	4e-130
Os10g0422200 [Oryza sativa Japonica Group] >gb AAP53817.1	3e-127
predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	4e-127
hypothetical protein SORBIDRAFT_08g020830 [Sorghum bicolor] >gb EES163	1e-126
homocysteine S-methyltransferase 2 [Zea mays] >sp Q9FUM9.1 HMT2_MAIZ	2e-126
PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 [Vitis vinifera]	2e-126
homocysteine S-methyltransferase 3 [Zea mays] >sp Q9FUM8.1 HMT3_MAIZ	3e-126
homocysteine S-methyltransferase 3 [Zea mays]	5e-126
Os12g0607000 [Oryza sativa Japonica Group] >gb ABA99257.2	1e-125
hypothetical protein OsI_39039 [Oryza sativa Indica Group]	2e-125

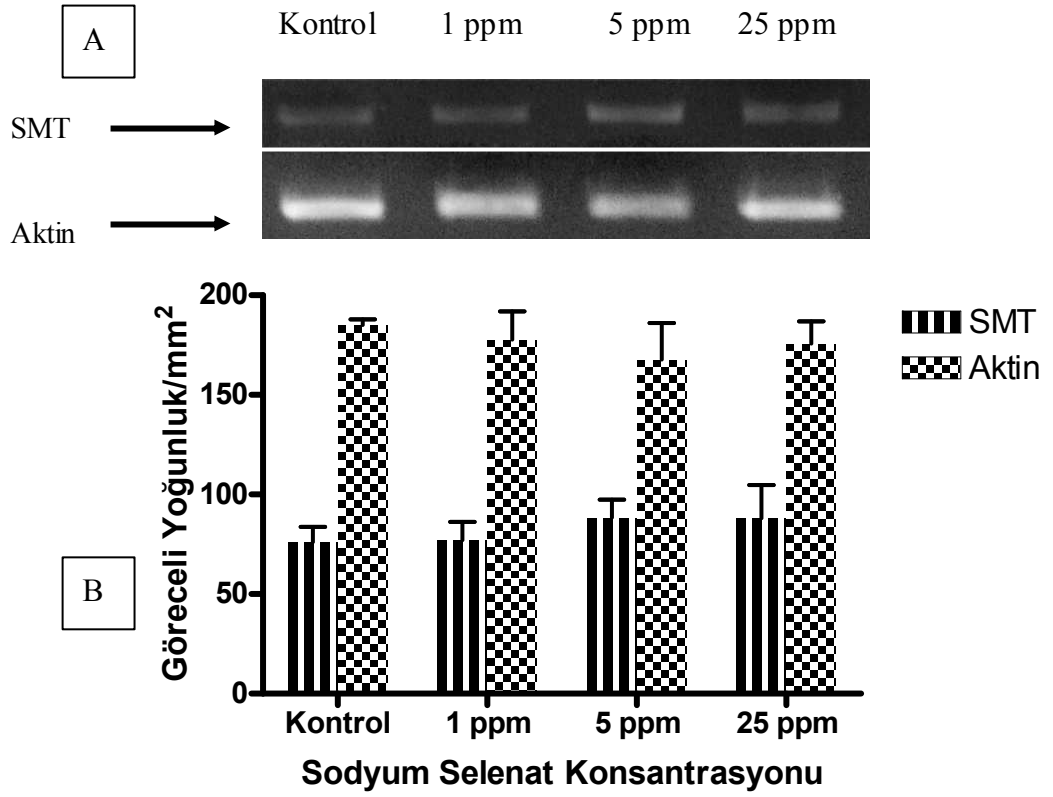
Elde edilen nukleik asit dizi bilgisi kullanılarak çıkarılan aminoasit dizisi ile AcSMT proteininin olası 3 boyutlu yapısı elde edildi. ‘Swiss-pdbviewer’ programı kullanılarak AcSMT proteininin aminoasit dizisinin üç boyutlu yapı görünümü elde edildi. Olası üç boyutlu görüntü Şekil 4.12’de verildi.



**Şekil 4.12.** A) *A. bisulcatus* SMT proteininin olası üç boyutlu yapısı (Sors ve diğ. 2009)  
B) *A. chrysochlorus* SMT proteininin olası üç boyutlu yapısı.

#### **4.4. SMT GENİNİN FARKLI SODYUM SELENAT KONSANTRASYONLARINDA ANLATIMININ KARŞILAŞTIRILMASI**

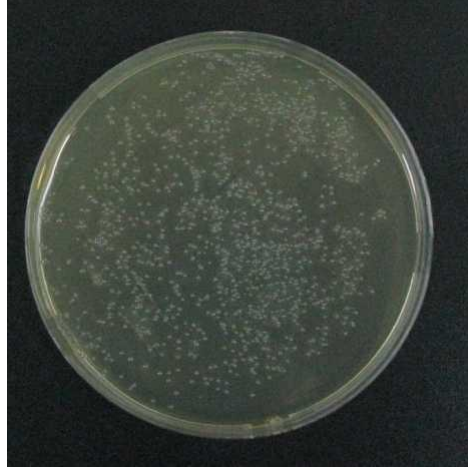
Total RNA'lardan cDNA sentezi Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı şekilde ters transkripsiyon işlemi ile gerçekleştirildi. 1 ppm, 5 ppm, 25 ppm sodyum selenat içeren ve sodyum selenat içermeyen (kontrol) besiyerlerinde yetiştirilmiş bitkilere ait cDNA'lar, PZR reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı. Geni çoğaltmak için kullanılan primerA ve primerE ile yapılan PZR sonucunda elde edilen ürünlere ait %1'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.13. A'da verildi. Jelin densitometrik analizi sonucunda ise elde edilen bağıl PZR ürün miktarları Şekil 4.13. B'de verilen grafik yardımıyla karşılaştırıldı. Kontrol koşulunda ve sodyum selenat varlığında *A. chrysochlorus* SMT geninin anlamlı bir fark olmaksızın anlatım yaptığı belirlendi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.13.** *A. chrysochlorus* SMT genine ve aktin genine ait PCR ürününün agaroz jeldeki görüntüsü (A), bu genlere ait densitometrik analizler sonucu elde edilen yoğunluk grafiği (B)

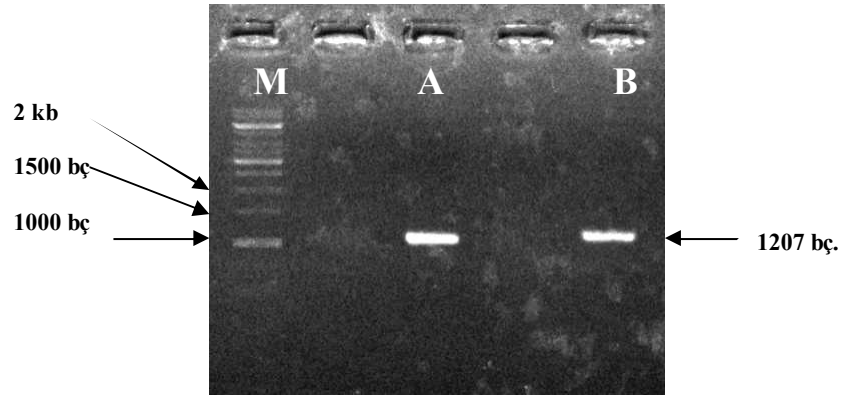
#### 4.5. *A. chrysochlorus* SMT GENİNİN BAKTERİDE KLONLANMASI

*A. chrysochlorus*'dan izole edilen SMT geni, pET100D-TOPO kullanılarak kompetan *E. coli* TOP10 hücrelerine klonlandı. Normal olarak ampisilin direnç geni içermeyen kompetan hücrelerin vektörü olarak ampisiline dirençli hale gelmeleri transformasyonun gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Transformasyondan sonra 100 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerinde üreyebilen bakteri kolonileri

100 µg/ml ampisilin içeren seçici besiyerinde üreyen transformantlardan seçilen 30 tanesinde yapılan PZR sonucunda 15 tanesinin pET100/D-AcSMT bakımından pozitif olduğu 1207 bç.'lik bir PZR ürününün çoğalmasıyla gösterildi. 1207 bç'lik PZR ürünü taşıyan 2 transformantı içeren örnek agaroz jel fotoğrafı **Şekil 4.15'**de verildi.



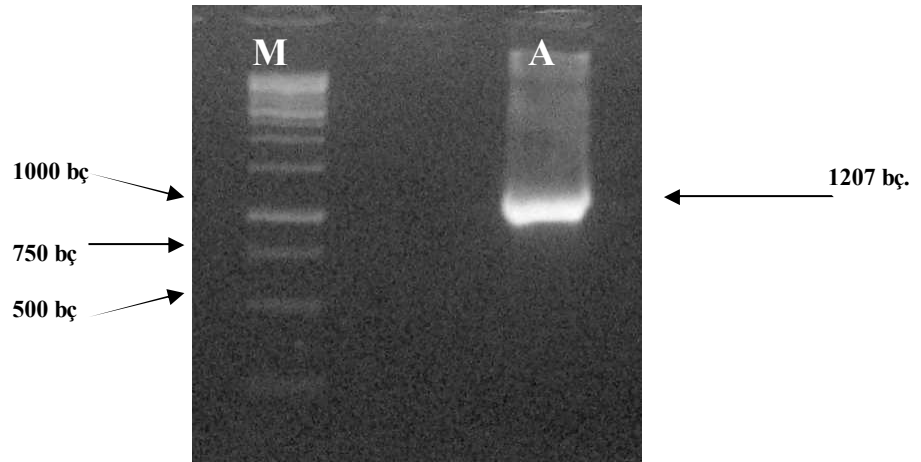
**Şekil 4.15.** Koloni PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M) Marker (Fermentas 1 kb.) A) 1 numaralı transformant B) 2 numaralı transformant

Koloni PZR sonucu pozitif çıkan koloniler bir gece 100 µg/ml ampisilin içeren sıvı LB besiyerinde inkübe edildi. Bu bakterilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Koloni PZR ile SMT genini taşıdığı belirlenen klonlara ait plazmitlerin örnek agaroz jel görüntüsü Şekil 4.16'de verildi.



**Şekil 4.16.** Transformantlardan elde edilen örnek plazmit DNA'sı

Pozitif transformant kolonilerden izole edilen plazmitlerin, önce PZR ile daha sonra da dizilenerek SMT genini taşıdıkları doğrulandı. SMT genini taşıdığı belirlenen klonlara ait plazmitler ile yapılan örnek PZR sonucu **Şekil 4.17**'de verildi. Bu plazmitler ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonu yönteminde primer olarak vektöre ait T7 promotor dizileme primeri ve primerE kullanıldı. Pozitif transformantların dizi bilgisi **Şekil 4.18**'de verildi.



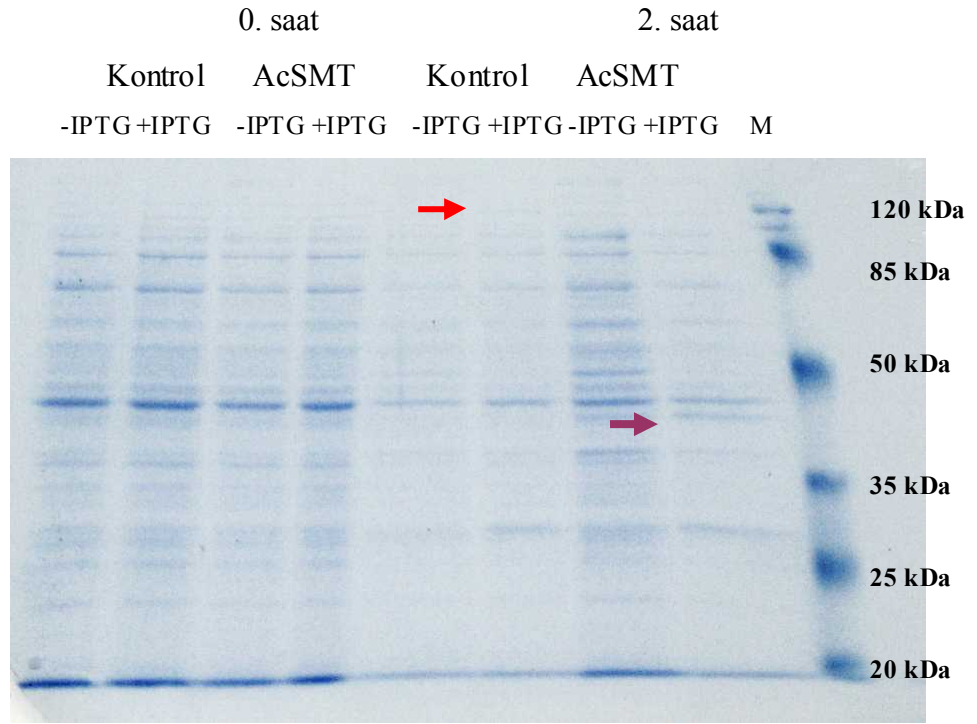
**Şekil 4.17.** pET100/D-AcSMT bakımından pozitif olarak transformanttan elde edilen plazmit DNA'sı ile yapılan PZR sonucu. M) Marker (Fermentas 1 kb.) A) örnek transformanta ait PZR sonucu

TCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATT	50
TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGTTCTCATCATCAT	100
CATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCCGGA	150
TCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACC ATGTCGTCGTCAT	200
TGATAACGGATTTCCCTCCATCAAAAATGGCGGAA CGGCCGTCATTGACGGC	250
GGTTTGGCGA CGGA GCTTGAA CGTCATGGTGCCGATCTCAACGATCCTCT	300
TTGGA GCGCCAAATGCCTCCTTTCTCTCCTCACCTCATTGCGCA GGTGC	350
ATCTTGATTATCTAGAAAATGGTGCA GATATTATTATCACAGCATCTTAT	400
CAA GCTACCATTCAA GGTTTTAA GGCGAAA GGCTTTTT GA TGAA GAA GGT	450
GAA GCCCTGCTAA GGA GAA GTGTTGA GA TTGCTCGCGA GGCTCGTGATT	500
TGTATTATCAAAGATGTGCTGAGTCCTCTTCA GATAATAATGGGGA TGAT	550
AGTAGAATCCTCAA GCAACGA CCTATCCTAATTGCGGGATCA GTA GGGAG	600
CTATGGCGCTTATTTGGCTGA TGGATCA GA GTA CA GTGGGAATTATGGTG	650
ATGCTATCAA GTTGGAACTCTTAAAGATTTTCA CA GGA GAA GA GTTCAA	700
ATTTTGGCA GATTCA GGTGC GGA CCTGCTTGCA TTTGAAACAATTCCAAA	750
TAAGCTTGAA GCTCA GGCTTATGCA GA CCTTCTGGAA GAA GA GAA CATAA	800
CTACTCCA GCATGGTTTACGTTTAACTCTAAGGATGGAA CTAATGTTGTT	850
AGTGGTGATTCAATA GA GGAATGTGGTTCTATTGCTGAATCGTGCAACAA	900
AGTAGTTGCGGTTGGAATCAACTGTACCCCA CCTA GATTTATACATGATC	950
TGATACTTCTGCTTAA GAA GGTGACTGCAAAAACCAATTGTTATATATCCA	1000
AATAGCGGGGAAACTTATGATGGTATCCGAAAAGAGTGGATGCAAAAATTC	1050
AGGTGTTACA GATGAA GATTTTGTCTCATATGTTGATAAATGGTGTGAGT	1100
CAGGGGCTTCCCTTGTA GGTGGCTGTTGCA GAACGACCCCGATACTATT	1150
AGAGGGA TATACAAAATACTCTCCA GCGGTCAATCTCCTGCTCTTGCCAC	1200
AAAGTGA?	1207

**Şekil 4.18.** Pozitif AcSMT transformantlarına dizi bilgisi (koyu yazılmış olan dizi pET100D vektörüne ait olan dizidir. ? SMT geninin +1. nükleotidi ile 1020. nükleotidi arasındaki gene ait diziyi göstermektedir.)

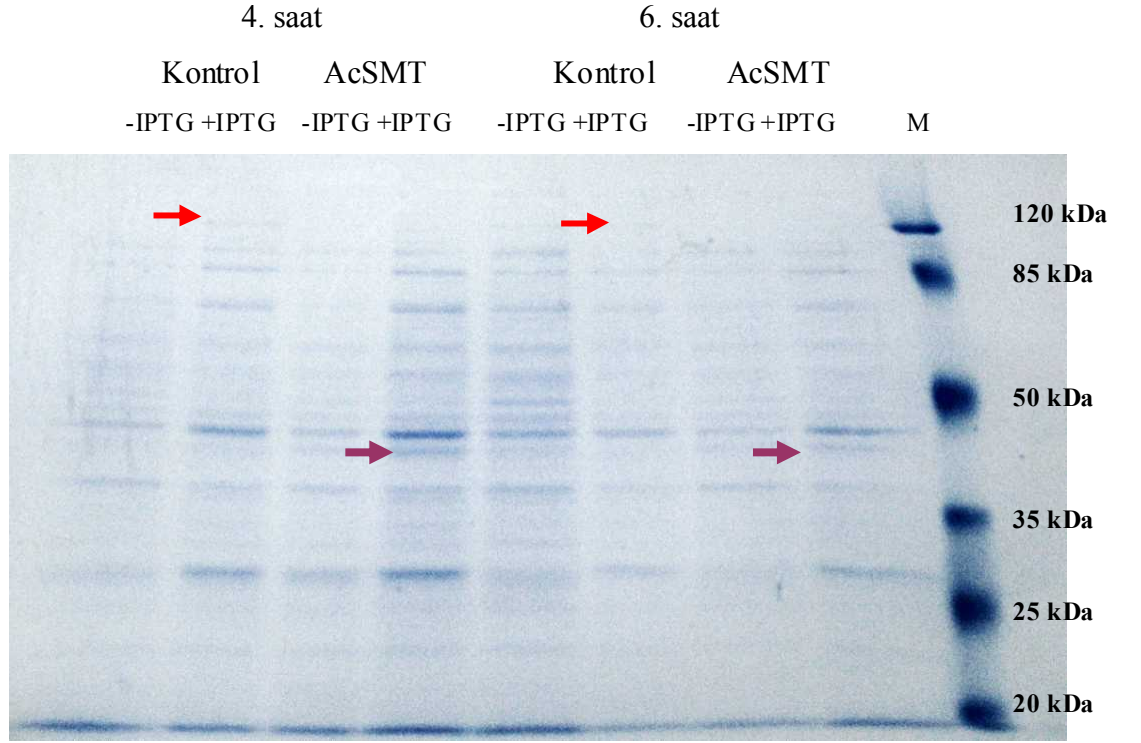
#### 4.6. SMT PROTEİNİ ANLATIMI

Ekspresyon çalışmalarında *Astragalus chrysochlorus*'a ait SMT genini taşıyan pET100D-AcSMT plazmiti başarıyla aktarılmış *E. coli* BL21 Star (DE3) konak hücreleri kullanıldı. Ekspresyon süresinin belirlenmesinde, gece boyu olarak inkübe edilen kültürden, 0., 2., 4. ve 6. saatlerde 500 µl'lik örnekler alındı ve bu örneklerden SDS-PAGE analizi yapılmak üzere protein izole edildi. SDS-PAGE ile ayrımı yapılan proteinler Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. Bunun sonucunda ekspresyonun 2. saatten itibaren başladığı ve denenen 4. ve 6. saatlerde de devam ettiği belirlendi. Elde edilen SDS-PAGE bulguları IPTG'nin SMT gen anlatımını test edilen tüm saatlerde indüklediğini, bu induksiyonun suda çözünen ve çözünmeyen proteinler için geçerli olduğunu gösterdi (Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22). Enzim aktivitesi çalışmalarında, bu değerler esas alındı.

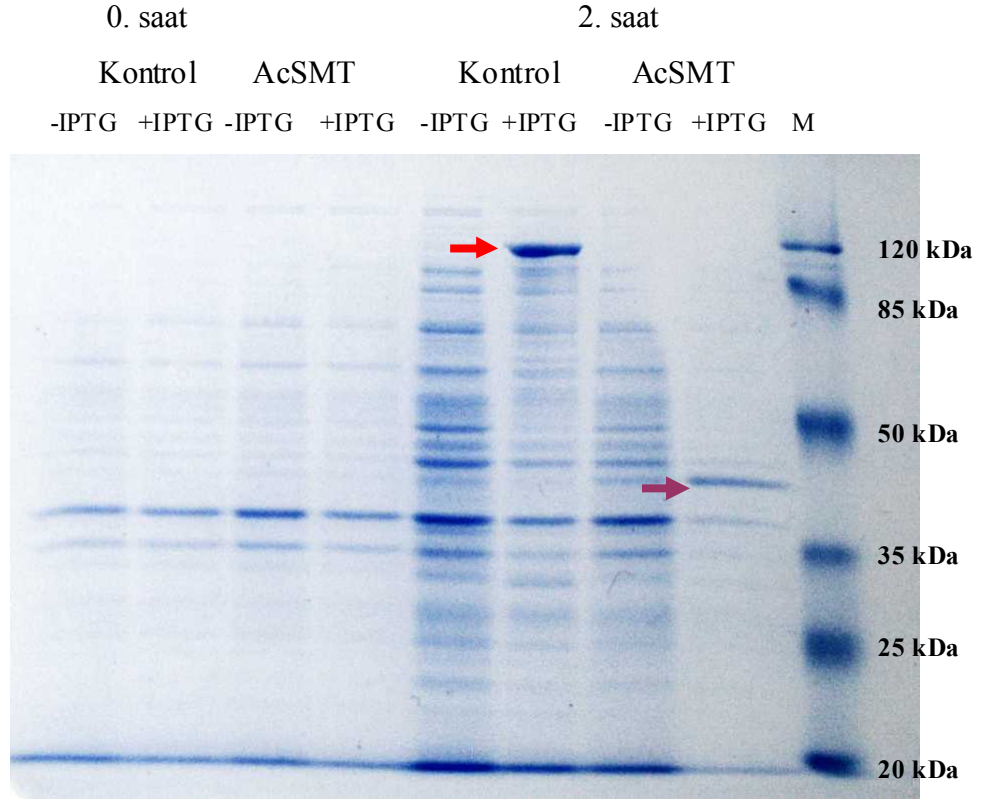


**Şekil 4.19.** 0. ve 2. saatlerde alınan örneklerin suda çözünebilir kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDA'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDA'luk SMT'yi işaret etmektedir)

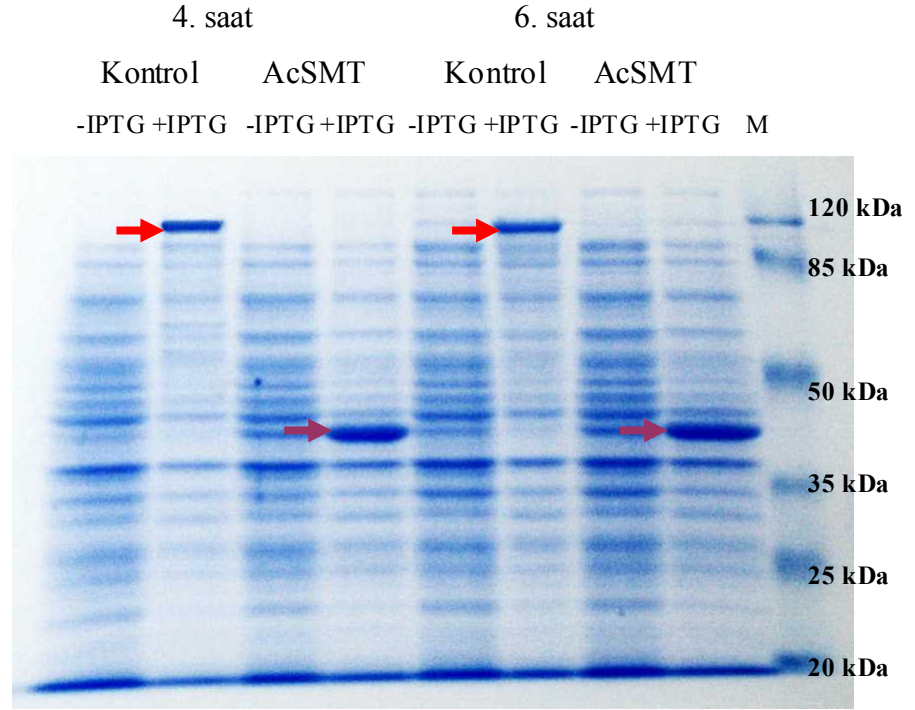




**Şekil 4.20.** 4. ve 6. saatlerde alınan örneklerin suda çözünebilir kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDa'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDa'luk SMT'yi işaret etmektedir)



**Şekil 4.21.** 0. ve 2. saatlerde alınan örneklerin suda çözünemeyen kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDa'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDa'luk SMT'yi işaret etmektedir)



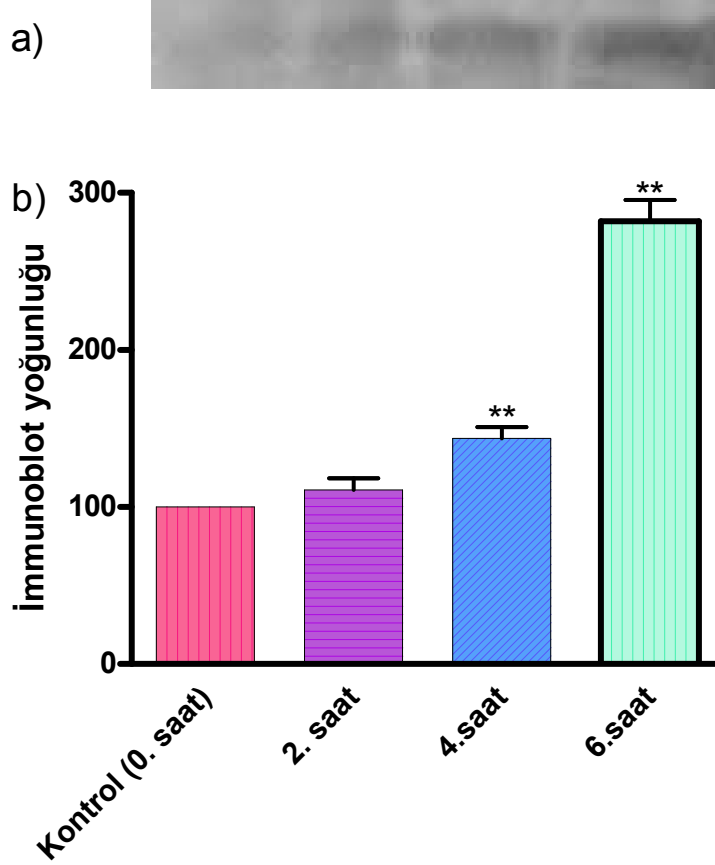
**Şekil 4.22.** 4. ve 6. saatlerde alınan örneklerin suda çözünemeyen kısmının SDS-PAGE analizi (kırmızı ok 121 kDA'luk kontrol proteinini, kahverengi ok 40 kDA'luk SMT'yi işaret etmektedir)

*Astragalus chrysochlorus*'a ait SMT proteininin suda çözünebilir olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılan SDS-PAGE çalışmaları sonucunda SMT'nin yoğun olarak suda çözünmeyen proteinler arasında olduğu saptandı. Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de gözlemlendiği gibi SMT proteini 2., 4. ve 6. saatlerde suda çözünmeyen proteinler içinde daha koyu bantlar şeklinde saptandı.

#### 4.7. İMMUNOLOJİK BELİRLEME

Kontrol (0. saat) ve deney grubu (2., 4. ve 6. saatler) hücreleriyle yürütülen immünojenik analizler sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.23'te verildi. Şekil 4.23'e

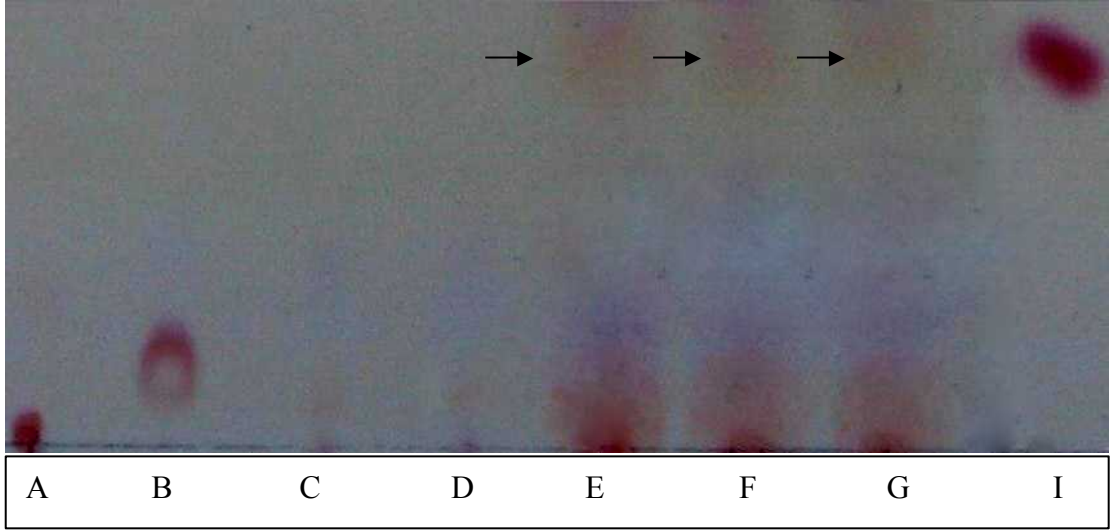
göre, örnek alınan saatlerde IPTG ile uyarılmış kültürlerde SMT anlatımının belirgin bir şekilde arttığı saptandı. Bu artışın kontrole göre, 6. saatte ~3 kat olduğu bulundu.



**Şekil 4.23.** a) *E. coli* BL21 Star™ (DE3) bakterilerinde kontrol ve deney gruplarına ait SMT anlatımlarının Western blot analizi, b) Analiz sonuçlarının grafik şeklinde gösterimi (Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlendi. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. \*\* P<0.01) [IPTG ile uyarılmış kontrol (0. saat), 2., 4., 6. saate ait protein ekstresi]

#### 4.8. ENZİM AKTİVİTESİ

Bölüm 11.'de anlatıldığı şekilde üretilen ve IPTG ile uyarılan pET100D-AcSMT plazmiti aktarılmış BL21 Star (DE3) hücrelerinden uyarımdan sonraki 0., 2., 4., 6. saatlerde alınan örneklerden elde edilen protein özütleri ile yapılan SMT enzim aktivitesi deneylerinde üretilen metil selenosistein ince tabaka kromatografi ile saptanmıştır (Şekil 4.24). Reaksiyon sonucunda kontrole (metilselenosistein) karşılık gelen Rf değerinde (0.58) test edilen örneklerde de spotlar belirlenmiştir.



**Şekil 4.24.** *Astragalus chrysochlorus* SMT genine sahip BL21 Star (DE3) hücrelerinde enzim aktivitesi. A) S-adenozilmetionin B) Selenosistein C) *A. chrysochlorus* SMT genini içermeyen BL21 Star (DE3) bakterisinden elde edilen protein özütü ile yapılan enzim aktivitesi D) 0. saatte E) 2. saatte F) 4. saatte G) 6. saatte alınan örnekte SMT enzim aktivitesi I) Metilselenosistein

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, MeSeCys oluşumundan sorumlu olan selenosistein metiltransferaz (SMT) enzimini şifreleyen gen *Astragalus chrysochlorus* bitkisinden, veribankasında bulunan diğer SMT genleri ve daha önceki çalışmamızdan elde edilen dizi bilgileri kullanılarak tasarlanan primerler ile PZR ve RACE PZR yöntemleriyle izole edilmiştir. AcSMT geninin, 1.242 bç. uzunluğunda ve 340 amino asit, 40 kDa ağırlığında proteini şifreleyen açık okuma çerçevesine sahip olduğu belirlenmiştir. AcSMT'nin aminoasit dizisinin *A. bisulcatus* SMT proteinine % 97 oranında benzediği saptanmıştır. Mitokondri ve kloroplast sinyali içermediği belirlenen AcSMT'nin karboksil ucunda, diğer metil transferazlar gibi çinko bağlayan GGCC motifi içerdiği ve bu bölgeye yakın konumlanmış korunmuş sistein bakiyeleri saptanmıştır. AcSMT geni, *Escherichia coli*'ye aktarılarak bu bakteride anlatımı sağlanmış ve ürünü olan protein western blotlama yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca bu bakterilerden elde edilen hücre ekstratlarında yapılan enzim aktivitesiyle AcSMT'nin varlığı saptanmış. Farklı selenat uygulamaları ile anlatımı araştırılan AcSMT geninin bitkide sürekli anlatım yaptığı bulunmuştur.

Selenyum, antioksidan selenoproteinlerin yapısına katılması sebebiyle insanlar, hayvanlar ve mikroorganizmalar için gerekli bir elementtir (Birringer ve diğ. 2002; Berken ve diğ. 2002). Besinsel gereksinimin yanı sıra selenyumun sağlık açısından önemi olduğu ortaya konmuştur. Bağışıklık sistemi, fertilitite (McKenzie ve diğ. 2001; Foresta ve diğ. 2002), viral enfeksiyonlar (Beck ve diğ. 2003), antioksidan metabolizma (Soriano-Garcia 2004) üzerinde selenyumun etkisi kanıtlanmıştır. Selenyumun kanser önleyici bir ajan olarak hücre döngüsünü etkilediği ve apoptozu indüklediğine dair bulgular çok sayıda farmakolojik çalışma ile ortaya konmuştur (Clark ve diğ. 1996, Combs and Gray 1998, Ip 1998, Vadgama ve diğ.2000, Whanger ve diğ. 2000, Fleming ve diğ. 2001, Dong ve diğ. 2001, Reid ve diğ. 2002, Whanger 2002, Whanger 2004). Besinsel olarak günlük Se alımının bazı kanserlerin oluşmasını engellediği saptanmıştır (Clark ve diğ. 1996; Finley 2007). Selenyum içeren bileşiklerin kansere karşı etki dereceleri farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalar selenyumlu bileşiklerden metilselenosisteinin (MeSeCys) kanser önleyici olarak en etkili bileşik olduğunu ortaya koymuştur (Ip and Ganther 1992; Lu ve diğ. 1996; Ip ve diğ. 2000; Finley ve diğ. 2001;

Medina ve diğ. 2001; Mckenzie ve diğ. 2009). Proteinlere katılmayan bu bileşik *Brassica* ve *Allium* cinslerine dahil bitkilerde ve selenyum primer biriktiricisi olarak da bilinen *Astragalus bisulcatus*'un da dahil olduğu *Astragalus* cinslerinde üretilmektedir (Trelease ve diğ. 1960, Nigam and McConnel 1969, Cai ve diğ. 1995, Clark ve diğ. 1996).

Selenyum biyokimyasal benzerliğinden dolayı kükürtle yarışmalı olarak hücre içine alınır ve metabolize edilir (Ellis and Salt 2003). Birçok bitki türü kuru ağırlıkta 25 mg Se/kg'a kadar Se içerir. Bu bitkiler selenyum biriktirmeyen bitkiler (non-akümülatör) olarak sınıflandırılır. 1.000 mg Se/kg ve daha fazla selenyum depolayabilen ve ayırım katsayısı 1'den büyük olan bitkiler ise primer biriktirici olarak adlandırılırlar. Buna karşın ayırım katsayısı 1'den küçük olan ve birkaç yüz mg/kg selenyum biriktirebilen bitkiler sekonder biriktirici olarak tanımlanmıştır (Ellis ve Salt, 2003).

Leguminosae ailesi üyesi bitkilerden *Astragalus*lar içerisinde, selenyum biriktirme kapasitesi açısından hem primer biriktiriciler hem de biriktirmeyen bitkiler ortaya konmuştur (Sors ve diğ. 2009). Bu tez çalışmasında materyal olarak kullanılan Leguminosae'nin Papilionaceae alt ailesinin bir üyesi olan ve daha önceki çalışmalarda doku kültürü sistemleri kurulmuş (Turgut-Kara ve Arı, 2008; Hasaıçebi ve diğ. 2011), fenolik üretimine yönelik hücre kültürü çalışmaları ile PAL (fenilalanin amonyak liyaz) aktivitesi belirlenmiş (Çakır ve Arı, 2009), fagositik, antioksidan (Hasaıçebi, 2003) ve sitotoksik (Karagöz ve diğ., 2007) aktivite gibi biyolojik aktivitelerinin olduğu saptanmış *Astragalus* (Geven) cinsi bitkilerden endemik *Astragalus chrysochlorus*, sekonder selenyum biriktiricisi olarak tanımlanmıştır (Arı ve diğ. 2010). Arı ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada doku kültürü koşullarında 1, 5, 25 ve 75 ppm sodyum selenat içeren MS besiyerlerinde yetiştirilmiş *A. chrysochlorus* bitkilerinde S ve Se miktarlarını ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy) yardımıyla ölçerek ortalama ayırım katsayısını 0.95 olarak saptamışlardır. Bu değer 1'den küçük olduğu için *A. chrysochlorus* bitkisi sekonder selenyum biriktiricisi olarak (Ellis ve Salt, 2003'e göre) tanımlanmıştır. Genom bilgisi olmayan organizmalarda gen izolasyonu zordur. Buna rağmen bu tez çalışmasıyla, daha önce grubumuz tarafından yapılan çalışmada (Arı ve diğ. 2010) polimeraz zincir reaksiyonu ile SMT geninin 595 bç.'lik kısmı çoğaltılarak homoloji analizleri yapılmış ve çoğaltılan parçanın *A. bisulcatus*

SMT genine % 92 oranında benzediği bulunmuştur. Bu verilere dayalı olarak bu tez çalışmasında *A. chrysochlorus* SMT geninin moleküler klonlanması ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Böylece bu genin tanımlanarak selenyum biriktiricisi bitkilerde SMT enziminin özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, farklı sodyum selenat içeren besiyerlerinde yetiştirilen *A. chrysochlorus* bitkilerinden ilk kez tüm SMT geni izole edilmiş, dizi analizi yapılmış, gen bankalarında taramalar yaparak homoloji araştırmaları yapılmış ve bakteriyal ekspresyon vektörüne klonlanarak bakteride anlatımı ve enzim aktivitesi gösterilmiştir.

Selenyum biriktiricisi bitkilerin yüksek selenyum konsantrasyonları karşısında direnç göstermelerinin sebebi fazla miktarda selenyumlu bileşik depolayabilmeleridir. Büyük çoğunluğunun *Astragalus* cinsine ait olduğu bu bitkiler, yüksek selenyum konsantrasyonlarına tolerans gösterme, selenyumu metabolize ederek selenyumlu bileşikler olarak depolayabilme (çoğunlukla MeSeCys olarak) ve selenyumun çok az miktarlarını hücrel proteinlere katmalarıyla tanımlanırlar. Selenyum biriktiricisi olan bitkilerdeki selenyum toleransı proteinlere katılmayan selenyumlu bileşiklerin (örn. MeSeCys,  $\gamma$ -glutamil MeSeCys, ve Se-sistasyonin) üretilmesi ile daima paralellik gösterir (Pilon-Smits ve Quinn, 2010, Terry ve diğ., 2000; Whanger 2002). Selenyum biriktirici bitkilerin yüksek konsantrasyonda selenyuma tolerans göstermelerinin başlıca sebebi SMT enzimidir. SMT enzimini kodlayan gen ilk olarak 1999 yılında *Astragalus bisulcatus* bitkisinden izole edilmiştir (Neuhierl ve diğ. 1999). Bu enzim S-metilmethionin metabolizmasıyla ilişkili metiltransferazlar sınıfındadır. Aminoasit dizisi bakımından yüksek oranda homosistein metiltransferazlarla benzerlik gösteren SMT enzimi, selenosisteine metil grubu transferini katalizler. Reaksiyon sonucu metilselenosistein (MeSeCys) oluşur. Homosistein metiltransferazlar ve selenosistein metiltransferazlar metil grubu vericisi olarak S-metilmethionini kullanmalarının yanı sıra *in vitro* diğer metil verici grupları da kullanabildikleri kanıtlanmıştır. *E. coli*'de tanımlanmış ve metiltransferaz aktivitesi saptanan YagD proteini ile % 40 dizi benzerliği bulunan bitkisel SMT enziminin, kükürt ve selenyum substrat analoglarını birbirinden ayıramayan ortak bir atadan evrimleştiği düşünülmektedir (Sors ve diğ. 2009). Ayrıca, APS (ATP sülfürlaz), SMT aktivitesini kısıtlayan temel basamağı katalizler. Bu nedenle gerek MeSeCys üretiminin artışı gerekse fitoremediyasyon



amacıyla kullanılabilir SMT-APS ikili transformantların elde edilmesi önemlidir. İkili transgenik *B. juncea* bitkileri APS transgenikleri ve SMT transgeniklerinin çaprazlanması ile oluşturulmuşlardır. APSxSMT transgenikleri yabani tip kontrol bitkilerine göre 8 kat daha fazla MeSeCys biriktirmişlerdir (LeDuc ve diğ. 2006). Bu sonuca göre 2 enzimin birlikte kullanımı hem Se alınımı hem de indirgenmesi ve birikimi açısından daha faydalıdır.

Tam boyutta gen transkriptlerinin izolasyonu protein kodlayan bölgelerin tanımlanması ve gen yapısının çalışılabilmesi için önem taşır. Günümüzde, bir parçası bilinen transkript dizisinden tam boy cDNA elde etmede kullanılan en etkin yöntem RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) olarak adlandırılan yöntemdir (Frohman ve diğ. 1988). Bu yöntemde *Glycine max*'da, vestiton redüktaz ve kalkon redüktaz enzimlerini, *Fagopyrum esculentum*'da tripsin inhibitör proteini ve *Brassica napus*'da tiohidroksimat S-glukoziltransferaz enzimini şifreleyen genler başarıyla klonlanarak karakterize edilmişlerdir (Marillia ve diğ. 2001, Li ve diğ. 2006, Liu 2009). Bu yöntemde polimeraz zincir reaksiyonu ile genin 5' ve 3' uçlarının çoğaltılması için cDNA'nın bilinen bölgesine tamamlayıcı primerler kullanılır. Ayrıca, RACE yöntemlerinin kullanılması transkriptlerin uç kısımlarında bulunan protein karşılığı olmayan dizilerin de (UTR: untranslated region) elde edilmesine olanak verir. Bu yöntem genin, doğal olarak poliA kuyruğu içeren 3' ucunun çoğaltılmasında etkin olmasına rağmen, 5' ucunda teknik olarak uygulanması daha güçtür. 5' ucun çoğaltılmasında karşılaşılan en büyük engel messenger RNA havuzunda çok sayıda 5' uçları parçalanmış transkript bulunmasıdır. Ayrıca homopolimerik kuyruklama (poliA kuyruğu ekleme) veya tanımlanmış dizinin kuyruk olarak ligasyonu, cDNA sentezinin ilk zincirinin tamamlanmasından sonra bir dizi enzimatik reaksiyona gereksinim duyar. Her bir enzimatik aşama cDNA'nın bütünlüğünün bozulmasına yönelik risk oluşturmaktadır. Bu sebeplerden dolayı cDNA havuzunda bulunan bir genin 5' ucunun RACE yöntemi ile elde edilmesinde sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu sıkıntıları gidermek amacıyla yeni stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler genellikle 5' uçlarına adenin yerine sitozin nükleotidleri bağlamak, çeşitli moleküllerle özel olarak işaretlemek, ters transkripsiyonu özel enzimlerle yapmak veya transkriptleri halkasal hale getirmek olarak sıralanabilir (Maruyama ve diğ. 1994, Volloch ve diğ. 1994, Volloch ve diğ.

1995, Mules ve diğ. 1998, Matz ve diğ. 1999, Schmidt ve Mueller 1999, Chen ve Patton 2001, Martinez ve diğ. 2001, Shi ve diğ. 2002, Polidoros ve diğ. 2006).

Bu tez çalışmasında 5' PZR ve 3' RACE PZR yöntemi ile *A. chrysochlorus* SMT geninin aminoasit karşılığı olan dizi ve 3' UTR dizisi elde edilmiş, 5' UTR bölgesi ise elde edilememiştir. Bunun nedeninin, RNA havuzunda 5' ucu parçalanmış transkriptlerin bulunması nedeniyle terminal transferaz enziminin 5' uca poliA kuyruğunu etkin bir şekilde ekleyememesi olduğu düşünülmektedir. Yeni geliştirilen 5' RACE PZR yöntemleri arasında bulunan RNA ligaz enzimi tarafından RNA'ların halkasal hale getirilmesi ile *A. chrysochlorus* SMT transkriptinin halkasal hale getirilmesinin başarılabileceği ve bu sayede 5' uca ait UTR dizisinin saptanabileceği düşünülmektedir.

*A. chrysochlorus*'tan başarı ile izole edilen SMT geni nükleik asit dizisi kullanılarak oluşturulan aminoasit dizisinin bugüne kadar izole edilmiş *Astragalus* SMT enzimleriyle yüksek oranda homoloji gösterdiği saptanmıştır. Bu homoloji verilerine dayanarak, 24. aminoasit bakiyesi, Se biriktirmeyen bitkilerde Alanin olarak, Se primer biriktiricilerinde ise Glisin olarak belirlenmiştir. Bu pozisyonda sekonder biriktirici olarak kabul edilen *Camelia sinesis* ve *Brassica oleracea* var. *italica*'da da Alanin bulunmaktadır. *A. chrysochlorus*'da aminoasit dizisinde 24. pozisyonda sekonder biriktiricilerde olduğu gibi Alanin varlığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.11). Yine 148. ve 184. pozisyonlarda Se biriktirmeyen ve ikincil derecede Se biriktiren bitkilerde sırasıyla Tirozin ve Treonin bulunurken, Se primer biriktiricisi bitkilerde bu pozisyonda Fenilalanin ve Alanin bulunmaktadır. *A. chrysochlorus*'da aminoasit dizisinde 148. ve 184. pozisyonda ikincil biriktiricilerde olduğu gibi sırasıyla Tirozin ve Treonin olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.11). Bu bulgular Arı ve arkadaşlarının (2010) ICP-MS bulguları ile ortaya koyduğu *A. chrysochlorus*'un sekonder biriktirici olduğu sonucunu doğrular niteliktedir. Ayrıca, *A. chrysochlorus*'da, metil transferi yapan enzimlerde bulunan yüksek derecede korunmuş motifler olduğu saptanmıştır. Bu motifler 242. aminoasitten başlayan G(I/V)NC motifi, 269. aminoasitten başlayan YPNSGE ve 310. aminoasitten başlayan GGCCR motiftir. Bu motiflerin Se primer ve sekonder biriktiricilerinde çinko bağlamadan sorumlu olduğu ve enzim aktivitesinin bu bölge ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *Brassica oleracea* var. *italica*'da ve *Camelia*

*sinensis*'te yapılan SMT geni moleküler klonlama çalışmalarında elde edilen protein veri bankası tarama sonuçlara paralel olarak, *A. chrysochlorus* SMT'sinin de çinko kofaktöre sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle ilerideki çalışmalarla farklı çinko konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerde bu enzimin aktivitesi araştırılarak aradaki ilişkinin ortaya konabileceği düşünülmektedir. *A. chrysochlorus* SMT'sinin herhangi bir sinyal peptid taşımadığı yine veri bankalarında yapılan taramalar ile ortaya konmuştur. Deneysel olarak *A. chrysochlorus* SMT'sinin hücre içinde lokalizasyonu saptanmamış olsa da bu sonuç bu enzimin sitosolik olabileceğini düşündürmektedir. Sekonder biriktirici olan *Brassica oleracea var italica*'da ve *Camelia sinensis*'te yapılan analizlerde de bu bitkilere ait SMT enzimlerinin herhangi bir sinyal peptid taşımadığı saptanmıştır. Ayrıca S-metilmetionin metabolizması ile ilişkili olarak selenosisteinin veya selenometioninin metillenmesinin sitosolde gerçekleştiği ortaya konmuştur (Bourgis ve diğ. 1999; Ranocha ve diğ. 2000; Lyi ve diğ. 2005).

Bugüne kadar yapılan anlatım analizi çalışmalarında, bitkilerde MeSeCys'nin üretilmesi için anahtar enzim olan selenosistein metiltransferaz enzimini kodlayan genin anlatımının sürekli olup olmadığına dair farklı bulgular elde edilmiştir. Pickering ve diğ. (2003) 5 µM potasyum selenat varlığında, *A. bisulcatus*'un genç ve yaşlı sürgünleri ile köklerinde SMT geninin anlatımının kontrol bitkilerine göre değişmediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçla *A. bisulcatus*'un SMT geninin sürekli anlatım yaptığı ve selenat varlığının genin anlatımını indüklediğini saptamışlardır. *Brassica oleracea var. italica* bitkisinde yapılan çalışmada ise bitkilere farklı konsantrasyonlarda sodyum selenat (10, 20, 40, 50, 75, 100 µM) ve sodyum selenit (10, 20, 40, 50, 75, 100 µM) uygulanmıştır. 20-40 µM sodyum selenat uygulanmış bitkilerde *B. oleracea var. italica* SMT geni anlatımı en yüksek düzeye ulaşmıştır. Ancak 40 µM üzerindeki konsantrasyonlarda gen anlatımını azalmıştır. Sodyum selenatın aksine, sodyum selenit uygulanmış bitkilerde ise gen anlatımı düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar *B. oleracea var. italica* bitkisinde SMT geninin 40 µM'a kadar sodyum selenat varlığında anlatımının indüklendiğini, sodyum selenit varlığında ise indüklenmediğini ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında farklı sodyum selenat konsantrasyonlarında [1 ppm (5.29 µM), 5 ppm (26.45 µM) ve 25 ppm (132.25 µM)], 30 gün süreyle yetiştirilmiş *A. chrysochlorus* bitkilerinde SMT geninin anlatımı analiz edildi. Sodyum selenat varlığında yetiştirilen bitkilerde gen anlatım düzeyinde kontrole

göre anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Bkz Şekil 4.13,  $p>0.05$ ). Elde edilen bulgular Pickering ve diğ.'nin (2003) bulguları ile paralellik göstermekte, *A. chrysochlorus*'da SMT geninin sürekli anlatım yaptığına işaret etmektedir. *B. oleracea* var. *italica* bitkisinin aksine *A. bisulcatus* selenyumca zengin topraklarda yetişmektedir, bu nedenle SMT geni anlatımının sürekli olması şaşırtıcı değildir. *A. chrysochlorus* SMT geninin de sürekli anlatım yapması, bu bitkinin doğal ortamda selenyumca zengin topraklarda yetiştiğini düşündürmektedir. Ancak ülkemiz topraklarının selenyum içeriği hakkında bazı çalışmalar yürütülmeğe de yayınlanmış veriler henüz bulunmamaktadır.

Dizi düzeyinde tanımlanan genlerin işlevlerinin araştırılabilmesi için öncelikle şifreledikleri proteinlerin yüksek miktarda üretimi gerekmektedir. Bu nedenle yüksek düzeyde anlatım yapan konakların kullanımı tercih edilmektedir (Griffiths ve diğ.1999). Bu amaçla birçok araştırmada *E. coli*'nin BL21 (DE3) suşu kullanılmaktadır. Bu bakteri genomunda LacUV5 promotorunun arkasında T7 bakteriyofajına ait T7 RNA polimeraz genini taşır. LacUV5 promotoru IPTG ile uyarılarak bu polimerazın sentezlenmesini sağlar. Bakteriye aktarılmış ekspresyon vektörü üzerindeki T7 promotoru anlatım çalışmalarında kullanılan çok güçlü bir promotordur. pET100D/TOPO ekspresyon vektörü bu özellikleri taşıdığından SMT geni bu vektör içinde *E. coli*'nin BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) suşunda başarıyla klonlanmıştır. AcSMT bakımından rekombinant *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) hücrelerinde protein anlatımı ve aktivite ölçümleri yapılmıştır. Rekombinant hücrelerde AcSMT enzim proteininin varlığı Western Blotlama ile saptanmış (Bkz. Şekil 4.23), aktivitesi ise TLC yöntemi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.24). Gerek immünolojik olarak enzim proteininin varlığı gerekse aktivitesinin gösterilmesi, bu enzimin substrat özgünlüğünün araştırılabilmesi için *E.coli*'de üretiminin uygun bir sistem olacağını düşündürmektedir.

Proteinler birincil yapı söz konusu olduğunda birbirlerinden amino asitlerin diziliş sırası bakımından ayrılmaktadırlar. Aynı zamanda birincil yapıları aynı olsa dahi proteinler ikincil ve üçüncül yapıları bakımından farklılık gösterebilmektedirler. Bu farklılığı sağlayan ikincil ve üçüncül yapıdaki katlanmalardır. Bugüne kadar izole edilen SMT genlerinin, aminoasit dizileri olarak homosistein metiltransferazlara yüksek derecede benzediği saptanmıştır. *A. bisulcatus* SMT enzimi ile yapılan çalışmalarda bu enzimin selenosisteine olan afinitesinin homosisteinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sors

ve diğ. (2009), SMT enziminin selenosistein ve homosistein substratları arasında tercih yapabilmesini sağlayan aktif bölgesini ortaya koymak amacıyla *A. bisulcatus* SMT enziminin olası üç boyutlu yapısını ortaya koymuşlardır. Olası model yapısını oluşturmak üzere bilgisayar programı en uygun kalıp olarak *Thermatoga maritima* bakterisine ait kobalamin bağımlı metionin sentaz (Tm-metH) proteinini almıştır (Evans ve diğ. 2004). Bu enzim metil tetrahidrofolatı metil vericisi olarak kullanır ve homosisteinden metionin oluşumunu katalizler. Kobalamini ise ara basamakta metil taşıyıcısı olarak kullanır. Tm-metH üzerinde yapılan kristalografik çalışmalar 8'er birim  $\alpha$  ve  $\beta$  katlanması ve yanı sıra katalitik çinko bağlanma bölgesi içerdiğini ortaya koymuştur (Evans ve diğ. 2004). Bu enzimin katalitik bölgesini 207., 272. ve 273. pozisyonlardaki sistein aminoasit bakiyelerinin oluşturduğu belirlenmiştir. Bu katalitik bölge üzerinde gerçekleşen reaksiyonda homosisteinin sülfür grubu ile 147. aminoasit treonin etkileşime geçer. Treonin metil transferini gerçekleştirmek için gerekli olan hidrojen bağı vermeye görevlidir. Aminoasit dizi karşılaştırmaları sonucunda bu katalitik bölgeyi oluşturan sistein bakiyelerinin 245., 312. ve 313. pozisyonlarda *A. bisulcatus* SMT'sinde aynı şekilde korunduğu saptanmıştır. Buna ek olarak Tm-metH proteininde 147. pozisyondaki treonin bakiyesine karşılık bu güne kadar *A. bisulcatus* da dahil olmak üzere *Astragalus* bitkilerinden izole edilen SMT proteinlerinin tümünde 184. pozisyonda alanin bulunmaktadır. Ancak sekonder selenyum biriktiricisi bitkilerde yapılan tarama çalışmalarında 184. pozisyonda treonin bakiyesinin korunduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasından elde edilen nükleik asit dizisi kullanılarak oluşturulan aminoasit dizisi ile yapılan protein veri bankası tarama sonuçları sonucunda *A. chrysochlorus*'un, *A. bisulcatus*'daki gibi 245., 312. ve 313. pozisyonlarda sistein, 184. pozisyonda ise ikincil biriktiricilerdeki gibi treonin içerdiği saptanmıştır. Sors ve diğ. (2009) tarafından *A. bisulcatus* SMT proteinini şifreleyen gen üzerinde yapılan yönlendirilmiş mutasyon ile 184. pozisyondaki alanin bakiyesi treonine çevrilmiştir. Bu değişim sonucunda mutant enzimin selenosistein afinitesinin artmasının yanı sıra homosisteini de metilleyebildiği ortaya konmuştur. Treonin bakiyesi yan zincirinde,  $\beta$  karbondan, daha etkin bir biçimde hidrojen bağı oluşturabilen hidroksil grubu taşımaktadır. Diğer taraftan alaninin  $\alpha$  karbon atomunda treonine göre daha kuvvetli hidrojen bağı yapmasına olanak vermeyen metil grubu vardır. Selenosistein ve S-metilmethionin arasında treoninin hidrojen bağı oluşturma eğiliminin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Sekonder selenyum biriktiricisi bitkilerden izole edilen SMT

enzimlerinde (BoSMT, CsSMT ve AcSMT) 184. pozisyonda treonin bakiyesinin olması, bu enzimin bitkilerde hem selenosistein hem de homosisteini metilleyerek çifte görev yapabileceği olasılığını düşündürmektedir. Aynı zamanda *E. coli*'den izole edilmiş YagD proteini de aynı pozisyonda treonin taşımaktadır ve selenosistein ve homosisteini metilleyebildiği belirlenmiştir (Neuhierl ve diğ. 1999).

Bu tez çalışmasında SDS-PAGE analizlerinde gözlenen SMT proteininin yoğun olarak suda çözünemeyen fraksiyonda belirlenmiş olması, *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) hücrelerinde yüksek miktarda anlatımı yapılan *A. chrysochlorus* SMT geni ürünü olan AcSMT enziminin IB (Inclusion Bodies)'ler oluşturarak çöktüğünü düşündürmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalarda belirli bir gene ait proteinin suda çözünebilir olup olmaması yüksek miktarda anlatımı gerçekleştirilmeden tahmin edilemez (Ventura ve Villaverde, 2006). Rekombinant protein üretimi biyoteknoloji, yapısal genomik ve proteomik gibi alanlarda kullanılan çok önemli bir tekniktir. Bakteriler halen en uygun üretim sistemi olmasına rağmen prokaryotik konaklarda üretilen pek çok rekombinant protein agregat oluşturur. Bu nedenle IB olarak bilinen, suda çözünemeyen, kırılabilir yapılar olarak hücre içinde birikirler. IB'ler genellikle heterolog genlerin yüksek miktarda anlatımının yapıldığı çalışmalarda konak içinde oluşurlar. Bazı rekombinant proteinler hem suda çözünebilir hem de çözünemeyen fraksiyonlarda gözlenebilecek birçok protein sadece IB'ler şeklinde çöker.

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, daha önce ikincil selenyum biriktiricisi olduğu belirlenmiş (Arı ve diğ. 2010) ve bir Türkiye endemiği olan *Astragalus chrysochlorus*'un selenyum birikiminden sorumlu olan selenosistein metiltransferaz (SMT) enzim genine (AcSMT) sahip olduğunu doğrulamıştır. AcSMT geninin, primer selenyum biriktirici *A. bisulcatus* AbSMT geni ile % 97 oranında benzerlik gösterdiğinin belirlenmesi ve klonlanıp gen ürünü enzimin aktivitesinin de gösterilmesi, selenyum biriktirici bitkilerde SMT enzim aktivitesiyle biriken ve antikanser özellikteki metilselenosisteinin de *Astragalus chrysochlorus*'da biriktiğini düşündürmektedir. Genom haritalaması yapılmamış bir bitki olan *A. chrysochlorus*'dan SMT geninin izolasyonu hem bitkilerde selenyum metabolizması araştırmaları için temel bilime hem de *Astragalus* cinsi bitkilerde genomik çalışmalara katkılar sağlayabilecektir. İleride yapılması planlanan çalışmalarla AcSMT enzim aktivitesinin farklı çinko

konsantrasyonları ile indüklenabilirliği ve selenyum metabolizmasında metilselenosistein üretiminde ilk kademe enzimlerinden ATP sülfürilaz (APS) geninin izolasyonu, *A. chrysochlorus* bitkisinin biyoteknolojik yolla antikanser madde üretimi için kullanılabilme potansiyelini yaratabilecektir.

## **KAYNAKLAR**

AKAN, H., CIVELEK Ş., 2001, *Astragalus atyachii* (Fabaceae), a new species from Anatolia, Turkey, *Annales Botanici Fennici*, 38, 167-170.

ANSEDE, J.H., PELLECHIA, P.J. ve YOCH, D.C., 1999, Selenium biotransformation by the salt marsh cordgrass *Spartina alterniflora*: evidence for dimethylselenoniopropionate formation, *Environmental Science & Technology*, 33, 2064–2069.

ANULOV, O. V., SMIRNOVA, N. I., MESTECHKINA, N. M., SHRETER, I. A., ve SCHERBUKHIN, V. D. ,1995, Characterization and determination of the structure of galactomannan from *Astragalus falcatus* Lam., *Applied Biochemistry and Microbiology*, 32 (6), 550-553.

ARI, Ş., ÇAKIR, Ö. ve TURGUT-KARA N., 2010, Selenium tolerance in *Astragalus chrysochlorus*: identification of a cDNA fragment encoding a putative Selenocysteine methyltransferase, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32 (6), 1085-1092.

ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J. ve SCHWEDE, T., 2006, The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics*, 22, 195-201.

ASHER, C.J., BUTLER, G.W. ve PETERSON, P.J., 1977, Selenium transport in root systems of tomato, *Journal of Experimental Botany*, 28 (103), 279–291.

BANSZKY, L., SIMONICS, T. ve MARAZ, A., 2003, Sulphate metabolism of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants, *Journal of General and Applied Microbiology*, 49, 271–278.

BANUELOS, G., LEDUS, D.L., PILON-SMITS, E.A.H. ve TERRY, N., 2007, Transgenic Indian mustard overexpressing selenocysteine lyase or selenocysteine methyltransferase exhibit enhanced potential for selenium phytoremediation under field conditions, *Environmental Science & Technology*, 41 (2), 599–605.

BARRINGTON, J.W., LINDSAY, P., JAMES, D., SMITH, S. ve ROBERTS, A., 1996, Selenium deficiency and miscarriage: a possible link?, *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 103 (2), 130–132.

BAUM, M.K., SHOR-POSNER, G., LAI, S., ZHANG, G., LAI, H., FLETCHER, M.A., SAUBERLICH, H. ve PAGE, J.B., 1997, High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 15 (5), 370–374.

BAYTOP, T., 1999, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 975-420-021-1.

BECK, M.A., ESWORTHY, R.S., HO, Y.S. ve CHU. F.F., 1998, Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis, *Faseb Journal*, 12 (12), 1143-1149.

BECK, M.A., LEVANDE, O.A. ve HANDY J., 2003, Selenium deficiency and viral infection, *Journal of Nutrition*, 133, 1463–1467.



- BECK, M.A., SHI, Q., MORRIS, V.C. ve LEVANDER, O.A., 1995, Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates, *Nature Medicine*, 1 (5), 433–436.
- BEDIR, E., ÇALIŞ, I., AQUINO, R., PIACENTE, S. ve PIZZA, C., 1998, Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus brachypterus* and *Astragalus microcephalus*, *Journal of Natural Products*, 61, 1469-1472.
- BEDIR, E., ÇALIŞ, I., PIACENTE, S., PIZZA, C. ve KHAN, I. A., 2000, A new flavonol glycoside from the aerial parts of *Astragalus vulneraria*, *Chemical and pharmaceutical Bulletin*, 48 (12), 1994-1995.
- BEHNE, D., WEILER, H. ve KYRIAKOPOULOS, A., 1996, Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats, *Journal of Reproduction and Fertility*, 106 (2), 291–297.
- BELL, P.F., PARKER, D.R. ve PAGE, A.L., 1992, Contrasting selenate sulfate interaction in selenium accumulating and nonaccumulating plant species, *Soil Science Society of America Journal*, 56, 1818–1824.
- BENEVENGA, N.J., 1989, *Toxicants of Plant Origin*. In: Cheeke P.R. (ed.), Occurrence and metabolism of S-methyl-L-cysteine and S-methyl-L-cysteine sulfoxide in plants and their toxicity and metabolism in animals, Vol. III. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 203–228.
- BERKEN, A., MULHOLLAND, M.M., LEDUC, D.L. ve TERRY, N., 2002, Genetic engineering of plants to enhance selenium phytoremediation, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 567–582.
- BERKOWITZ, O., WIRTZ, M., WOLF, A., KUHLMANN, J. ve HELL, R., 2002, Use of biomolecular interaction analysis to elucidate the regulatory mechanism of the cysteine synthase complex from *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (34), 30629–30634.
- BERR, C., BALANSARD, B., ARNAUD, J., ROUSSEL, A.M. ve ALPEROVITCH, A., 2000, Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study, *Journal of the American Geriatrics Society*, 48 (10), 1285-1291.
- BHATTACHARYA, A., 2011, Methylselenocysteine - a promising antiangiogenic agent for overcoming drug delivery barriers in solid malignancies for therapeutic synergy with anticancer drugs, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8 (6), 749-763.
- BICK, J.A., SETTERDAHL, A.T., KNAFF, D.B., CHEN, Y., PITCHER, L.H., ZILINSKAS, B.A. ve LEUSTEK, T., 2001, Regulation of the plant type 50-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress, *Biochemistry*, 40 (30), 9040–9048.
- BIRRINGER, M., PILAWA, S. ve FLOHE, L., 2002, Trends in selenium biochemistry, *Natural Product Reports*, 19 (6), 693–718.
- BOURGIS, F., ROJE, S., NUCCIO, M.L., FISHER, D.B., TARCZYNSKI, M.C., LI, C., HERSCHBACH, C., RENNENBERG, H., PIMENTA, M.J., SHEN, T.L., GAGE,

D.A. ve HANSON, A.D., 1999, S-Methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase, *Plant Cell*, 11 (8), 1485–1497.

BRADFORD, M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

BRETON, A. ve SURDIN-KERJAN, Y., 1977, Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study, *Journal of Bacteriology*, 132, 224–232.

CAI, X.J., BLOCK, E., UDEN, P.C., ZHANG, X., QUIMBY, B.D. ve SULLIVAN, J.J., 1995, Allium chemistry: Identification of selenoamino acids in ordinary and selenium-enriched garlic, onion, and broccoli using gas chromatography with atomic emission detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1754–1757.

ÇAKIR, Ö. ve ARI, Ş., 2009, Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor, *Journal of Environmental Biology*, 30 (1), 51-55.

ÇALIŞ, I., ZOR, M., SARAÇOĞLU, I., ISIMER, A. ve RUEGGER, H., 1996, Four novel cycloartane glycosides from *Astragalus oleifolius*, *Journal of Natural Products*, 59, 1019-1023.

CHEN, D. ve PATTON, J.T., 2001, Reverse transcriptase adds nontemplated nucleotides to cDNAs during 5'-RACE and primer extension, *BioTechniques*, 30 (3), 574–582.

CLARK, L.C., COMBS, G.F., TURNBULL, B.W., SLATE, E.H., CHALKER, D.K., CHOW, J., DAVIS, L.S., GLOVER, R.A., GRAHAM, G.F., GROSS, E.G., KRONGRAD, A., LESHER, J.L., PARK, H.K., SANDERS, B.B., SMITH, C.L. ve TAYLOR, J.R., 1996, Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin, *Journal of the American Medical Association*, 276 (24), 1957–1963.

COMBS, G.F. ve GRAY, W.P., 1998, Chemopreventive agents: selenium, *Pharmacology & Therapeutics*, 79 (3), 179–192.

DAWSON, J.C. ve ANDERSON, J.W., 1988, Incorporation of cysteine and selenocysteine into cystathionine and selenocystathionine by crude extracts of spinach, *Phytochemistry*, 27 (11), 3453–3460.

DAWSON, J.C. ve ANDERSON, J.W., 1989, Comparative enzymology of cystathionine and selenocystathionine synthesis of selenium-accumulator and non-accumulator plants, *Phytochemistry*, 28, 51–55.

DOĞAN, M., EKİM, T. ve ANDERSON, M. W., 1985, The production of gum tragacanth from *Astragalus microcephalus* in Turkey—a contribution towards a balanced environment, *Biology Agriculture and Horticulture*, 2 (4), 329-334.

DONG, Y., LISK, D., BLOCK, E. ve IP, C., 2001, Characterization of the biological activity of gamma-glutamyl-Se-methylselenocysteine: a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic, *Cancer Research*, 61 (7), 2923–2928.

DUAN, P. ve WANG, Z. M., 2002, Clinical study on effect of Astragalus in efficacy enhancing and toxicity reducing of chemotherapy in patients on malignant tumor, *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 22 (7), 515-517.

EAPEN, S. ve D'SOUZA, S.F., 2005, Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals, *Biotechnology Advances*, 23, 97-114.

EBRAHIMZADEH H, NIKNOM V. ve MAASSOUMI A. A., 1999, Nitrocompounds in *Astragalus* species from Iran, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27 (7), 743-751.

ELLIS, D.R. ve SALT, D.E. 2003, Plants, selenium and human health, *Current Opinion in plant Biology*, 6 (3), 273–279.

ELLIS, D.R., SORS, T.G., BRUNK, D.G., ALBRECHT, C., ORSER, C., LAHNER, B., WOOD, K.V., HARRIS, H.H., PICKERING, I.J. ve SALT, D.E., 2004, Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase, *BMC Plant Biology*, 4: 1.

EL-SBAKHY, N. A, ASSAAD, A. M., ABDALLAH, R. M., TOMMA, S. M., ABDEL-KADER, M. S. ve STERMÍTZ, F. R., 1994, Antimicrobial isoflavans from *Astragalus* species, *Phytochemistry*, 36 (6), 1387-1389.

EVANS, J.C., HUDDLER, D.P., HILGERS, M.T., ROMANCHUK, G., MATTHEWS, R.G. ve LUDWIG, M.L., 2004, Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101 (11), 3729–3736.

FINLEY, J.W., IP, C., LISK, D.J., DAVIS, C.D., HINTZE, K.J. ve WHANGER, P.D., 2001, Cancer-protective properties of high-selenium broccoli, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (5), 2679–2683.

FINLEY, J.W. ve PENLAND, J.G., 1998, Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings, *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11 (1), 11–27.

FINLEY, W.J., 2007, Increased intakes of selenium-enriched foods may benefit human health, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (9), 1620–1629.

FLEMING, J., GHOSE, A. ve HARRISON, P.R., 2001, Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds, *Nutrition and Cancer*, 40 (1), 42–49.

FORDYCE, F., 2005, Selenium deficiency and toxicity in the environment, *Essentials of Medical Geology*, 373–415.

FORESTA, C., FLOHE, L., GAROLLA, A., ROVERI, A., URSINI, F. ve MAIORINO, M., 2002, Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biology of Reproduction*, 67 (3), 967–971.

FROHMAN, M.A., DUSH, M.K. ve MARTİN, G.R., 1988, Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 8998-9002.

GARIFULLINA, G.F., OWEN, J.D., LINDBLOM, S.D., TUFAN, H., PILON, M., ve PILON-SMITS, E.A.H., 2003, Expression of a mouse selenocysteine lyase in *Brassica juncea* chloroplasts affects selenium tolerance and accumulation, *Physiologia Plantarum*, 118, 538-544.

GRIFFITHS, A.J.F., GELBART, W.M., MILLER, J.H. ve LEWONTIN, R.C., 1999, *Modern Genetic Analysis*, New York: W. H. Freeman, 10: 0-7167-3118-5.

GRIFFITHS, G., TRUEMAN, L., CROWTHER, T., THOMAS, B. ve SMITH, B., 2002, Onions – a global benefit to health, *Phytotherapy Research*, 16, 603–615.

GUEX, N. ve PEITSCH, M.C., 1997, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling, *Electrophoresis* 18, 2714-2723.

HALL, D.I. ve SMITH, I.K., 1983, Partial-purification and characterization of cysteine lyase from Cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*), *Plant Physiology*, 72, 654–658.

HANAHAN, D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of Molecular Biology*, 166 (4), 557-580.

HASANÇEBİ, S., 2003, *Astragalus chrysochlorus*'da doku kültürü ve transformasyon çalışmaları, Tez (Doktora), İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

HASANÇEBİ, S., TURGUT-KARA, N., ÇAKIR, Ö. ve ARI, Ş., 2011, Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae), *Turkish Journal of Botany*, 35, 203-210.

HAWKES, W.C. ve HORNBOSTEL, L., 1996, Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit, *Biological Psychiatry* 39 (2), 121–128.

HAWKESFORD, M.J., DAVIDIAN, J.C. ve GRIGNON, C., 1993, Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants, *Planta* 190, 297–304.

HEISS, S., SCHAFER, H.J., HAAG-KERWER, A. ve RAUSCH, T., 1999, Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Molecular Biology*, 39, 947–957.

HESSE, H., KREFT, O., MAIMANN, S., ZEH, M. ve HOEFGEN, R., 2004, Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants, *Journal of Experimental Botany*, 55, 1799–1808.

IP, C., 1998, Lessons from basic research in selenium and cancer prevention, *Journal of Nutrition*, 28, 1845–1854.

IP, C., BIRRINGER, M., BLOCK, E., KOTREBAI, M., TYSON, J. F., UDEN, P. C. ve LISK, D. J., 2000, Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (6), 2062-2070.

IP, C., DONG, Y. ve GANTHER, H.E., 2002, New concepts in selenium chemoprevention, *Cancer and Metastasis Reviews*, 21 (3-4), 281-289.

IP, C. ve GANTHER, H., 1990, Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention, *Cancer Research*, 50, 1206-1211.

IP, C. ve GANTHER, H.E., 1992a, *Cancer chemoprevention*. In: Wattenberg L., Lipkin M., Bone C.W., Kelloff G.J., (eds.), Relationship between the chemical form of selenium and anticarcinogenic activity, FL: CRC Press, Boca Raton, pp. 479-488.

IP, C. ve GANTHER, H.E., 1992b, Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention, *Carcinogenesis*, 13 (7), 1167-1170.

IP, E., THOMPSON, H.J., ZHU, Z. ve GANTHER, H.E., 2000, *In vitro* and *in vivo* studies on methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention, *Cancer Research*, 60 (11), 2882-2886.

KARAGÖZ, A., TURGUT-KARA N., ÇAKIR Ö., DEMİRGAN R. ve ARI Ş., 2007, Cytotoxic activity of crude extracts from *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae), *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21 (2), 220-222.

KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L., ROY, M., WISHE, H.I., COHEN, M.W., ve STOTZKY, G., 1994, Supplementation with selenium and human immune cell functions, *Biological Trace Element Research*, 41, 115-27.

KNEKT, P., HELIOVARA, M., AHO, K., ALFTHAN, G., MARNIEMI, J. ve AROMA, A., 2000, Serum selenium, serum alpha-tocopherol and the risk of rheumatoid arthritis, *Epidemiology*, 11 (4), 402-405.

KNEKT, P., MARNIEMI, J., TEPPON, L., HELIOVARA, M. ve AROMA, A., 1998, Is low selenium status a risk factor for lung cancer, *American Journal of Epidemiology*, 148, 975-982.

KOK, F.J., DE BRUIJN, A.M., HOFMAN, A., VERMEEREN, R. ve VALKENBURG, H.A., 1987, Is serum selenium a risk factor for cancer in men only?, *American Journal of Epidemiology*, 125, 12-16.

KOTREBAI, M., BIRRINGER, M., TYSON, J.F., BLOCK, E. ve UDEN, P.C., 2000, Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents, *Analyst*, 125 (1), 71-78.

KRYUKOV, G.V., CASTELLANO, S., NOVOSELOV, S.V., LOBANOV, A.V., ZEHTAB, O., GUIGO, R., ve GLADYSHEV, V.N., 2003, Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science*, 300, 1439-1443.

KUBEC, R., DRHOVA, V. ve VELISEK, J., 1998, Thermal degradation of S-methylcysteine and its sulfoxide-important flavor precursors of *Brassica* and *Allium* vegetables, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 46 (10), 4334–4340.

KUKLINSKY, B. ve SCHWEDER, R., 1996, Acute pancreatitis, a free radical disease; reducing the lethality with the sodium selenite and other antioxidants, *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 6, 393–394.

LACOURCIERE, G.M. ve STADTMAN, T.C., 2001, Utilization of selenocysteine as a source of selenium for selenophosphate biosynthesis, *Biofactors*, 14, 69–74.

LASS, B. Ve ULLRICH-EBERIUS, C.I., 1984, Evidence for proton/sulfate cotransport and its kinetics in *Lemna gibba* G1, *Planta*, 161, 53–60.

LAUCHLI, A., 1993, Selenium in plants – uptake, functions, and environmental toxicity, *Botanica Acta*, 106, 455–468.

LEDUC, D.L., ABDELSAMIE, M., MONTES-BAYO, N.M., WU, C.P., REISINGER, S.J. ve TERRY, N., 2006, Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard, *Environmental Pollution*, 144, 70–76.

LEDUC, D.L., TARUN, A.S., MONTES-BAYON, M., MEIJA, J., MALIT, M.F., WU, C.P., ABDELSAMIE, M., CHIANG, C.Y., TAGMOUNT, A., DESOUZA, M., NEUHIERL, B., BOCK, A., CARUSO, J. ve TERRY, N., 2004, Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation, *Plant Physiology*, 135, 377–383.

LEE, S. ve LEUSTEK, T., 1999, The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*, *Plant Science*, 141 (2), 201–207.

LEUSTEK, T. ve SAITO, K., 1999, Sulfate transport and assimilation in plants, *Plant Physiology*, 120 (3), 637–643.

LEUSTEK, T., MURILLO, M. ve CERVANTES, M., 1994, Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Plant Physiology*, 105 (3), 897–902.

LEWIS, B.G., JOHNSON, C.M. ve BROYER, T.C., 1974, Volatile selenium in higher-plants – production of dimethyl selenide in cabbage leaves by enzymatic cleavage of Se-methyl selenomethionine selenonium salt, *Plant Soil*, 40, 107–118.

LI, Y., ZHANG, Z., LIANG, A. ve WANG, Z., 2006, Cloning and characterization of a novel trypsin inhibitor (BTI $\omega$ 1) gene from *Fagopyrum esculentum*, *DNA Sequence*, 17 (3), 203–207.

LIU, G.Y., 2009, Isolation, sequence identification and tissue expression profile of two novel soybean (glycine max) genes-vestitone reductase and chalcone reductase, *Molecular Biology Reports*, 36 (7), 1991–1994.

LU, J., PEI, H., IP, C., LISK, D.J., GANTHER, H. ve THOMPSON, H.J., 1996, Effect of an aqueous extract of selenium-enriched garlic on *in vitro* markers and *in vivo* efficacy in cancer prevention, *Carcinogenesis*, 17, 1903–1907.

LYI, S.M., HELLER, L.I., RUTZKE, M., WELCH, R.M., KOCHIAN, L.V. ve LI, L., 2005, Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli, *Plant Physiology*, 138, 409–420.

MANIATIS, T., FRITCH, E.F. ve SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

MARILLIA, E.F., MACPHERSON, J.M., TSANG, E.W., VAN AUDENHOVE, K., KELLER, W.A. ve GROOTWASSINK, J.W., 2001, Molecular cloning of a Brassica napus thiohydroximate S-glucosyltransferase gene and its expression in *Escherichia coli*, *Physiologia Plantarum*, 113 (2), 176-184.

MARTIN, J.L., SHRIFT, A. ve GERLACH, M.L., 1971, Use of <sup>75</sup>Se-selenite for the study of selenium metabolism in *Astragalus*, *Biochemistry*, 10, 945–952.

MARTINEZ, M.A., VARTANIAN, J.P. ve WAIN-HOBSON, S., 1994, Hypermutagenesis of RNA using human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and biased dNTP concentrations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91 (25), 11787–11791.

MARUYAMA, K. ve SUGANO, S., 1994, OLIGO-CAPPING: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides, *Gene*, 138 (1-2), 171–174.

MARUYAMA-NAKASHITA, A., INOUE, E., WATANABE-TAKAHASHI, A., YAMAYA, T. ve TAKAHASHI, H., 2003, Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity, *Plant Journal*, 33, 633–650.

MATZ, M., SHAGIN, D., BOGDANOVA, E., BRITANOVA, O., LUKYANOV, S., DIATCHENKO, L. ve CHENCHIK, A., 1999, Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR, *Nucleic Acids Research*, 27 (6), 1558–1560.

MCCLOY, R., 1998, Chronic pancreatitis at Manchester, UK: Focus on antioxidant therapy, *Digestion*, 59 (4), 36–48.

MCCLUSKEY, T.J., SCARF, A.R. ve ANDERSON, J.W., 1986, Enzyme catalyzed alpha, beta-elimination of selenocystathionine and selenocystine and their sulfur isologs by plant-extracts, *Phytochemistry*, 25, 2063–2068.

MCKENZIE, M.J., HUNTER, D.A., PATHIRANA, R., WATSON, L.M., JOYCE, N.I., MATICH, A.J., ROWAN, D.D. ve BRUMMELL, D.A., 2009, Accumulation of an organic anticancer selenium compound in a transgenic Solanaceous species shows wider applicability of the selenocysteine methyltransferase transgene from selenium hyperaccumulators, *Transgenic Research*, 18 (3), 407–424.

MCKENZIE, R.C., RAFFERTY, T.S., ARTHUR, J.R. ve BECKETT, G.J., 2001, *Selenium: its molecular biology and role in human health*. In: Hatfield D.L. (ed.), *Effects of selenium on immunity and ageing*, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 258–272.

MEDINA, D., THOMPSON, H., GANTHER, H. ve IP, C., 2001, Se-Methylselenocysteine: a new compound for chemoprevention of breast cancer, *Nutrition and Cancer*, 40 (1), 12–17.

MIHARA, H., KATO, S., LACOURCIERE, G., STADTMAN, T.C., KENNEDY, R.A.J.D., KURIHARA, T., TOKUMOTO, U., TAKAHASHI, Y. ve ESAKI, N., 2002, The *iscS* gene is essential for the biosynthesis of 2-selenouridine in tRNA and the selenocysteine-containing formate dehydrogenase, *Proceedings of The National Academy of Science of USA*, 99, 6679–6683.

MULES, E.H., UZUN O. ve GABRIEL, A., 1998, In vivo Tyl reverse transcription can generate replication intermediates with untidy ends, *Journal of Virology*, 72 (8), 6490–6503.

MULLENBACH, G.T., TABRIZI A., IRVINE, B.D, BELL, G.I. ve HALLEWELL, R.A., 1987, Sequence of a cDNA coding for human glutathione-peroxidase confirms TGA encodes active-site selenocysteine, *Nucleic Acids Research*, 15, 5484.

MULLER, S., HEIDER, J. ve BOCK, A., 1997, The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*, *Archives of Microbiology*, 168 (5), 421–427.

MURASHIGE, T. ve SKOOG, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473–497.

MURILLO, M. ve LEUSTEK, T., 1995, Adenosine-50-triphosphatesulfurylase from *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli* are functionally equivalent but structurally and kinetically divergent: nucleotide sequence of two adenosine-50-triphosphatesulfurylase cDNAs from *Arabidopsis thaliana* and analysis of a recombinant enzyme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323, 195–204.

NEUHIERL, B., THANBICHLER, M., LOTTSPREICH, F., ve BOCK, A., 1999, A Family Of S-Methylmethionine-Dependent Thiol/Selenol Methyltransferases, Role in selenium tolerance and evolutionary relation, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (9), 5407 – 5414.

NÉVE, J., 1996, Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases, *Journal of Cardiovascular Risk*, 3 (1), 42–47.

NG, B.H. ve ANDERSON, J.W., 1978, Synthesis of selenocysteine by cysteine synthase from selenium accumulator and nonaccumulator plants, *Phytochemistry*, 17 (12), 2069–2074.

NICHOL, C., HERDMAN, J., SATTAR, N., O'DWYER, P.J., ST J O'REILLY, D., LITTLEJOHN, D. ve FELL, G., 1998, Changes in concentrations of plasma selenium and selenoproteins after minor elective surgery: further evidence for a negative acute phase response, *Clinical Chemistry*, 44 (1/8), 1764–1766.



NIGAM, S.N. ve MCCONNEL, W.B., 1969, Seleno amino compounds from *Astragalus bisulcatus* isolation and identification of c-L-glutamyl-Se-methyl-seleno-L-cysteine and Se-methylseleno-L-cysteine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 192, 185–190.

NOJI, M. ve SAITO, K., 2002, Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulphur metabolic engineering in plants, *Amino Acids*, 22 (3), 231–243.

NOJI, M., INOUE, K., KIMURA, N., GOUDA, A. ve SAITO, K., 1998, Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (49), 32739–32745.

OLDEREID, N.B., THOMASSEN, Y. ve PURVIS, K., 1998, Selenium in human male reproductive organs, *Human Reproduction*, 13 (8), 2172–2176.

PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., SALT, D.E. ve GEORGE, G.N., 2000, Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97 (20), 10717–10722.

PICKERING, I.J., WRIGHT, C., BUBNER, B., ELLIS, D., PERSANS, M.W., YU, P.E., GEORGE, G.N., PRINCE, R.C. ve SALT, D.E., 2003, Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiology*, 131 (3), 1460–1467.

PILON-SMITS, E.A.H. ve QUINN, C.F., 2010, Selenium Metabolism in Plants, *Cell Biology of Metals and Nutrients*, Plant Cell Monographs 17, 225-241.

PILON-SMITS, E.A.H., GARIFULLINA, G.F., ABDEL-GHANY, S.E., KATO, S.I., MIHARA, H., HALE, K.L., BURKHEAD, J.L., ESAKI, N., KURIHARA, T. ve PILON, M., 2002, Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis thaliana*—Implications for its role in sulfur and selenium metabolism, *Plant Physiology*, 130, 1309-1318.

PILON-SMITS, E.A.H., HWANG, S.B., LYTLE, C.M., ZHU, Y.L., TAI, J.C., BRAVO, R.C., CHEN, Y.C., LEUSTEK, T. ve TERRY, N., 1999, Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance, *Plant Physiology*, 119, 123–132.

PIMENTA, M.J., KANETA, T., LARONDELLE, Y., DOHMAE, N. ve KAMIYA, Y., 1998, S-Adenosyl-L-methionine : L-methionine S-methyltransferase from germinating barley, *Plant Physiology*, 118, 431–438.

PISTELLI, L., BERTOLI, A., LEPORI, E., MORELLI, I. ve PANIZZU, L., 2002, Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*, *Fitoterapia*, 73, 336-339.

POLIDOROS, A.N., PASENTSIS, K. ve TSAFTARIS, A.S., 2006, Rolling circle amplification-RACE: a method for simultaneous isolation of 5' and 3' cDNA ends from amplified cDNA templates, *BioTechniques*, 41 (1), 35–42.

RAMAEKERS, V.T.H., CALOMME, M., VANDEN-BERGHE, D., ve MAKROPOULOS, W., 1994, Selenium deficiency triggering intractible seizures, *Neuropediatrics*, 25, 217–23.

RANOCHA, P., BOURGIS, F., ZIEMAK, M.J., RHODES, D., GAGE, D.A. ve HANSON, A.D., 2000, Characterization and functional expression of cDNAs encoding methionine-sensitive and -insensitive Homocysteine S-methyltransferases from *Arabidopsis*, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 5962–5968.

RASPOR, P., FUJS, S., BANSZKY, L., MARAZ, A. ve BATIĆ, M., 2003, The involvement of ATP sulfurylase in Se(VI) and Cr(VI) reduction processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 (1), 89–95.

RAVANEL, S., BLOCK, M.A., RIPPERT, P., JABRIN, S., CURIEN, G., REBEILLE, F. ve DOUCE, R., 2004, Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (21), 22548–22557.

REEVES, M.A. ve HOFFMANN, P.R., 2009, The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (15), 2457–2478.

REID, M., DUFFIELD-LILLICO, A.J., GARLAND, L., TURNBULL, B.W., CLARK, L.C. ve MARSHALL, J.R., 2002, Selenium supplementation and lung cancer incidences: an update of the nutritional prevention cancer trial, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11, 1285–1291.

RENOSTO, F., HEMANG, C.P., MARTIN, R.L., THOMASSIAN, C., ZIMMERMAN, G. ve SEGEL, I.H., 1993, ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes from spinach leaf, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307, 272–285.

RIOS, J. L. ve WATERMAN, P. G., 1997, A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*, *Phytotherapy Research*, 11, 411–418.

ROBERGE, M.T., BORGERDING, A.J. ve FINLEY, J.W., 2003, Speciation of selenium compounds from high selenium broccoli is affected by the extracting solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4191–4197.

SAITO, K., 2004, Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road, *Plant Physiology*, 136, 2443–2450.

SAITO, K., TKAHASHI, H., NOJI, M., INOUE, K. ve HATZFELD, Y., 2000, *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*. In: Brunold, C, (ed.), *Molecular regulation of sulfur assimilation and cysteine synthesis*, Paul Haupt, Bern, Switzerland, pp. 59–72.

SALONEN, J.T., SALONEN, R., SEPPAENEN, K., KANTOLA, M., PARVIAINEN, M., ALFTHAN, G., MAENPAA, P.H., TASKINEN, E. ve RAURAMAA, R., 1988, Relationship of serum selenium and antioxidants to plasma lipoproteins, platelet aggregability and prevalent ischemic heart disease in Eastern Finnish men, *Atherosclerosis*, 70, 155-165.

SCHMIDT, W.M. ve MUELLER, M.W., 1999, CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs, *Nucleic Acids Research*, 27 (21), e31.

SCHRAUZER, G.N., WHITE, D.A. ve SCHNEIDER, C.J., 1977, Cancer mortality correlation studies. III. Statistical association with dietary selenium intakes, *Bioinorganic Chemistry*, 7, 35-56.

SCHWEDE, T., KOPP, J., GUEX, N., ve PEITSCH, M.C., 2003, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Research*, 31, 3381-3385.

SEMMAR, N., JAY, M. ve CHEMLI, R., 2001, Chemical diversification trends in *Astragalus caprinus* (Leguminosae) based on the flavonoid pathway, *Biochemical Systematics and Ecology*, 29 (7), 727-738.

SETYA, A., MURILLO, M. ve LEUSTEK, T., 1996, Sulfate reduction in higher plants: molecular evidence for a novel 50-adenylylsulfate reductase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93, 13383-13388.

SHAHEEN, S.O., STERNE, J.A.C., THOMPSON, R.L., SONGHURST, C.E. ve MARGETTS, B.M., 2001, P.G. B. Dietary antioxidants and asthma in adults. Population-based case-control study, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, 1823-1828.

SHAW, R., WOODMAN, K., CRANE, J., MOYES, C., KENNEDY, J. ve PEARCE, N., 1994, Risk factors for asthma symptoms in Kawerau children, *New Zealand Medical Journal*, 107 (987), 387-391.

SHAW, W.H. ve ANDERSON, J.W., 1974, Comparative enzymology of the adenosine triphosphate sulphurylase from leaf tissue of selenium accumulator and non-accumulator plants, *Biochemical Journal*, 139 (1), 37-42.

SHI, X., KARKUT, T., CHAHMANHKAH, M., ALTING-MEES, M., HEMMINGSEN, S.M. ve HEGEDUS, D., 2002, 5'-RACEing across a bridging oligonucleotide, *BioTechniques*, 32 (3), 480-482.

SHIBAGAKI, N., ROSE, A., MCDERMOTT, J.P., FUJIWARA, T., HAYASHI, H., YONEYAMA, T. ve DAVIES, J.P., 2002, Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots, *Plant Journal*, 29, 475-486.

SHIRATAKI, Y., TAKAO, M., YOSHIDA, S. ve TODA, S., 1997, Antioxidative components isolated from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (*Astragali radix*), *Phytotherapy Research*, 11, 603-605.

SHRIFT, A. ve VIRUPAKSHA, T.K., 1965, Seleno-amino acids in selenium-accumulating plants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 100 (1), 65–75.

SINCLAIR, S., 1998, Chinese herb: a clinical review of *Astragalus ligusticum* and *schizandrae*, *Alternative Medicine Reviews*, 3 (5), 338-344.

SIRKO, A., BLASZCZYK, A. ve LISZEWSKA, F., 2004, Overproduction of SAT and/or OASTL in transgenic plants: a survey of effects, *Journal of Experimental Botany*, 55 (404), 1881–1888.

SMITH, F.W., HAWKESFORD, M.J, PROSSER, I.M. ve CLARKSON, D.T., 1995, Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high-affinity sulfate transporter at the plasmamembrane, *Molecular and General Genetics*, 247 (6), 709–715.

SMITH, F.W., HAWKESFORD, M.J., EALING, P.M., CLARKSON, D.T., VANDENBERG, P.J., BELCHER, A.R. ve WARRILOW, A.G., 1997, Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter, *Plant Journal*, 12 (4), 875–884.

SORIANO-GARCIA, M., 2004, Organoselenium compounds as potential therapeutic and chemopreventive agents: a review, *Current Medicinal Chemistry*, 11 (12), 1657–1669.

SORS, T.G., ELLIS, D.R., NAM NA, G., LAHNER, B., LEE, S., LEUSTEK, T., PICKERING, I.J. ve SALT, D.E., 2005, Role of sulfur assimilating enzymes in selenate reduction, tolerance and accumulation in *Astragalus*, *Plant Journal*, 42 (6), 785-797.

SORS, T.G., MARTIN, C.P. ve SALT, D.E., 2009, Characterization of selenocysteine methyltransferases from *Astragalus* species with contrasting selenium accumulation capacity, *The Plant Journal*, 59, 110–122.

SQUIRES, J.E. ve BERRY, M.J., 2008, Eukaryotic selenoprotein synthesis: Mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors, *IUBMB Life*, 60 (4), 232-23.

STUART, L.D. ve OEHME, F.W., 1982, Environmental factors in bovine and porcine abortio, *Veterinary and human toxicology*, 24, 435–441.

SUADICANI, P., HEIN, H.O. ve GYNTELBERG, F., 1992, Serum selenium concentration and risk of ischemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males, *Atherosclerosis*, 96 (1), 33–42.

SUNDE, R.A., 1997, *Selenium*. In: O'Dell BL, Sunde RA, (eds.), *Handbook of nutritionally essential mineral elements*, New York: Marcel Dekker Inc, pp: 493–556.

SUTER, M., BALLMOOS, P, KOPRIVA, S., DEN CAMP, R., SCHALLER, J., KUHLEMEIER, C., SCHURMANN, P. ve BRUNOLD, C., 2000, Adenosine 50-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 50-phosphosulfate reductase are identical enzymes, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 930–936.

TAKAHASHI, H., YAMAZAKI, M., SASAKURA, N., WATANABE, A., LEUSTEK, T., ENGLER, J.A., ENGLER, G., VAN MONTAGU, M. ve SAITO, K., 1997, Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94, 1102–11107.

TAYLOR, E.W. ve NADIMPALLI, R.G., 1999, Chemoprotective mechanisms of selenium in cancer and AIDS: evidence for the involvement of novel selenoprotein genes, *Info Onkoloji*, 2, 7–11.

TAYLOR, E.W., NADIMPALLI, R.G. ve RAMANATHAN, C.S., 1997, Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins, *Biological Trace Element Research*, 56 (1), 63–91.

TEMİZKAN, G., 1994, *Genetik I. Temel Genetik*, İ.Ü.Yayınları Sayı:3805, Fen Fakültesi No:229, 975-404-159-8.

TERRY, N., ZAYED, A.M., DE SOUZA, M.P. ve TARUN, A.S., 2000, Selenium in higher plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 401–432.

TODA, S. ve SHIRATAKI, Y., 1998, Inhibitory effects of isoflavones in root of *Astragalus membranaceus* BUNGE (*Astragali radix*) on lipid peroxidation by reactive oxygen species, *Phytotherapy Research*, 12 (1), 59-61.

TRELEASE, S.F., DISOMMA, A.A. ve JACOBS, A.L., 1960, Seleno-amino acid found in *Astragalus bisulcatus*, *Science*, 132, 618.

TURGUT-KARA, N., 2007, *Astragalus chrysochlorus'da fenilpropanoid metabolik yoluna ilişkin genomik analizler*, Tez (Doktora), İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

TURGUT-KARA, N., ve ARI, Ş., 2008, *In vitro* Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Culture of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae), *African Journal of Biotechnology*, 7 (9), 1250-1255.

ULRICH, J.M. ve SHRIFT, A., 1968, Selenium absorption by excised *Astragalus* roots, *Plant Physiology*, 43, 14–20.

UNDERWOOD, E.J., 1977, *Trace elements in human and animal nutrition*, 4<sup>th</sup> ed., Academic Press, New York, 303–345.

URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J. ve FLOHÉ, L., 1999, Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation, *Science*, 285 (5432), 1393–1396.

VADGAMA, J.V., WU, Y., SHEN, D., HSIA, S. ve BLOCK, J., 2000, Effect of selenium in combination with adriamycin or taxol on several different cancer cells, *Anticancer Research*, 20 (3A), 1391–1414.

VAN HUYSEN, T., ABDEL-GHANY, S., HALE, K.L., LEDUC, D., TERRY, N. ve PILON-SMITS, E.A.H., 2003, Overexpression of cystathionine- gamma-synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*, *Planta*, 218 (1), 71–78.

VAN HUYSEN, T., TERRY, N. ve PILON-SMITS, E.A.H., 2004, Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic *Brassica juncea* overexpressing ATP sulfurylase or cystathionine-g-synthase, *International Journal of Phytoremediation*, 6, 111-118.

VENTURA, S. ve VILLAVERDE, A., 2006, Protein quality in bacterial inclusion bodies, *Trends in Biotechnology*, 24 (4), 179-185.

VIRTAMO, J., VALKIELA, E., ALFTHAN, G., PUNSAR, S., HUTTUNEN, J.K. ve KARVONEN, M.J., 1985, Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke, *American Journal of Epidemiology*, 122 (2), 276–282.

VOLLOCH, V., SCHWEITZER B. ve RITS, S., 1994, Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta globin mRNA with an extended 5'-untranslated region, *Nucleic Acids Research*, 22 (13), 2507–2511.

VOLLOCH, V.Z., SCHWEITZER, B. ve RITS, S., 1995, Transcription of the 5'-terminal cap nucleotide by RNA-dependent DNA polymerase: possible involvement in retroviral reverse transcription, *DNA Cell Biology*, 14 (12), 991–996.

WALKER, J.M., 2002, *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, New Jersey, USA, pp. 57–72.

WEBER, G.F., MAERTENS, P., MENG, X. ve PIPPENGER, C.E., 1991, Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures, *Lancet*, 337 (8755), 1443–44.

WHANGER, P.D., 2002, Selenocompound in plants and animals and their biological significance, *Journal of the American College of Nutrition*, 21 (3), 223–232.

WHANGER, P.D., 2004, Selenium and its relationship to cancer: an update, *British Journal of Nutrition* 91, 11–28.

WHANGER, P.D., IP, C., POLAN, C.E., UDEN, P.C. ve WELBAUM, G., 2000, Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability, and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramp (*Allium tricoccum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5723–5730.

WHITAKER, J.R., 1976, Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic, *Advances in Food Research*, 22, 73–133.

WIRTZ, M. ve HELL, R., 2003, Production of cysteine for bacterial and plant biotechnology: application of cysteine feedbackinsensitive isoforms of serine acetyltransferase, *Amino Acids*, 24 (1-2), 195–203.

YAHARA, S., KOHJYUMA, M. ve KOHODA, H., 2000, Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*, *Phytochemistry*, 53 (4), 469-471.

YOSHIZAWA, K., WILLET, W.C., MORRIS, S.J., STAMPFER, M.J., SPIEGELMAN, D., RIMM, EB. ve GIOVANUCCI, E., 1998, Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 90 (16), 1219–1224.

YU, M.W., HORNG, I.S., CHIANG, Y.C., LIAW, Y.F. ve CHEN, C.J., 1999, Plasma selenium levels and the risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection, *American Journal of Epidemiology*, 150 (4), 367–374.

YU, S.Y., ZHU, Y.J. ve LI, W.G., 1997, Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong, *Biological Trace Element Research*, 56 (1), 117–124.

ZHU, L., JIANG, C.J., DENG, W.W., GAO, X., WANG, R.J. ve WAN, X.C., 2008, Cloning and expression of selenocysteine methyltransferase cDNA from *Camellia sinensis*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 167–174.

ZHU, Y.G., PILON-SMITS, E.A.H., ZHAO, F.J., WILLIAMS, P.N. ve MEHARG, A.A., 2009, Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation, *Trends in Plant Science*, 14 (8), 436-442.

ZIEVE, R. ve PETERSON, P.J., 1984, The accumulation and assimilation of dimethyl selenide by four plant species, *Planta*, 160, 180–184.

ZINONI, F., BIRKMANN, A., LEINFELDER, W. ve BOCK, A., 1987, Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84, 3156–3160.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İstanbul'da doğdum. Orta ve Lise öğrenimimi sırasıyla Talatpaşa İlköğretim Okulu ve Kabataş Erkek Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1996 yılında kaydımı yaptırmış olduğum İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2000 yılında mezun oldum. Aynı yıl başladığım, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Programı Yüksek Lisans öğrenimimi 2004 yılında tamamladım. 2004 yılının Eylül ayında da İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora öğrenimime başladım. 2001-2003 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde, 2003 yılından bu yana ise İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. 2010 yılı Kasım ayından bu yana İ.Ü. Fen Fakültesi Araştırma Görevlisi Temsilcisiyim.