



Termik Santrallerden Savrulan Küllerdeki Ağır Metallerin Neden Olduğu Genetik ve Epigenetik Değişikliklerin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi

Nalan YILDIRIM DOĞAN¹ Hüseyin BULUT^{2*}

¹Erzincan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan

²Erzincan Üniversitesi Üzümlü Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Organik Tarım Programı, Üzümlü/Erzincan

*Sorumlu Yazar

E-posta: huseyinbulut@erzincan.edu.tr

Geliş Tarihi: 18 Ağustos 2017

Kabul Tarihi: 15 Kasım 2017

Özet

Çevre kirliliği sanayi devrimi ve endüstrileşmeden dolayı canlılar için önemli bir unsur olmuştur. Ülkemizde artan enerji ihtiyacının karşılanmasında termik santraller önemli bir paya sahiptir. Bu santrallerden atılan ağır metaller çevre kirliliğinin ana etkenlerinden birisi konumundadır. Ağır metallerin bitki metabolizmasında meydana getirdiği genetik, epigenetik, kanserojenik etkisi üzerine birçok çalışma mevcuttur. Bitkiler sabit konumlarından dolayı çevre kirliliğinin meydana getirdiği genetik toksisitenin tespitinde kullanılan biyoindikatör durumundadırlar. Bu durumdan dolayı *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* ve *Arabidopsis thaliana* gibi farklı bitki türleri araştırmacılar tarafından son yıllarda genotoksik etkinin tespiti için model organizma olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda ağır metallerin neden olduğu stres nedeniyle arpada meydana gelen toksik etkinin düzeyi IRAP analizleri ile değerlendirilmiştir. Ağır metal stresinin etkisiyle retrotranspozon hareketliliği meydana gelmiş ve bu durum gen akışında farklılıklara neden olmuştur. Gen akışında oluşan farklılaşma bant profillerine yansımıştır. Kontrol gurubu ve deney gurubu örnekleri karşılaştırıldığında farklı büyüklük ve sayıda bantların oluştuğu tespit edilmiştir. Ağır metal yoğunluğuna bağlı olarak arpa örneklerinde polimorfizm değerlerinde artış ve GTS değerinde azalma gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Epigenetik, IRAP, Retrotranspozon.

Determination by Molecular Methods of Genetic and Epigenetic Changes Caused by Heavy Metals in Ashes Discharged from Thermic Power Plants

Abstract

Environmental pollution has become an important factor for living things due to industrial revolution and industrialization. Thermal power plants have an important share in meeting the increasing energy demand in our country. Heavy metals released from these power plants are one of the main causes of environmental pollution. There are many studies on the genetic, epigenetic, carcinogenic effects of heavy metals on plant metabolism. Plants are bioindicators used to detect genetic toxicity caused by environmental pollution due to their fixed position. Because of this, different plant species such as *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* have been used as model organisms for the detection of genotoxic activity in recent years by researchers. In our study, the level of toxic effect from arsenic stress due to stress caused by heavy metals was evaluated by IRAP analysis. The effect of heavy metal stress has led to retrotransposon mobility, which has led to differences in gene flow. The differentiation occurring in the gene flow is reflected in the band profiles. When the control group and experimental group samples are compared, it has been determined that there are different size and number of bands. The increase in polymorphism values and the decrease in GTS values were observed in barley specimens due to heavy metal concentration.

Keywords: Epigenetic, Heavy metal, IRAP, Retrotransposon

GİRİŞ

Canlıların yaşamları boyunca karşılıklı olarak etkileşim içinde buldukları ortam çevre olarak tanımlanmaktadır [1]. Endüstriyel üretim sonucu çevreye salınan ağır metaller, çevre kirliliğinin ana kaynaklarından biri olmaya başlamıştır [2]. Farklı sektörlerden biyosfere ağır metal atılımı gerçekleşmektedir [3]. Resim 1.'de ağır metallerin doğaya salınmasını sağlayan faktörler görselleştirilmiştir.

Kömür ile elektrik enerjisinin üretildiği termik santraller ağır metallerin çevreye yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır [4]. Linyit kömürünün yakılması sonucunda kül ile çevreye Cd, Ni, Co, Mn, Cr, Pb, Cu, Zn, Fe ağır metalleri salınmakta olup, termik santrallerden çevreye salınan uçucu küllerin genotoksik ve mutajenik maddeler içerdiği saptanmıştır [5], [6]. Hücre düzeyinde aşırı miktarda ağır metal birikimi membranlar, proteinler ve DNA gibi farklı hücre bileşenleri için çeşitli stres tepkilerine ve hasara neden olmaktadır [7]. Yapılmış birçok çalışma ağır metallerin bitkilerin moleküler yapısını etkilediğini göstermiştir [8], [9], [10], [11]. Ağır metal gibi genotoksik maddeler DNA'yı geri dönüşümsüz olarak değiştirerek kalıtsal bir değişime yol açarlar. Bu nedenle genotoksinler aynı zamanda mutajenik maddelerdir [12].

İlk kez literatüre 1942'de Conrad Waddington tarafından kazandırılan "Epigenetik" terimi fenotipik ifadeye izin veren genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimler olarak tanımlanmıştır [13]. Stres koşullarının etkisi ile metabolizmada tepki ve değişimler meydana gelebilmektedir. Kromatin yapı üzerinde meydana gelen epigenetik modifikasyonların genlerin ifadelerini etkilemesi, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA gibi temel epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir [14]. Bu üç mekanizmanın birlikte çalışması sonucu gen ifadesinde kalıtsal farklılıklar meydana gelmektedir. Mekanizmaların herhangi birinde meydana gelen bir hata, gen anlatımının aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik bozukluklara yol açmaktadır [15]. Genomdaki hareketli gen mekanizmalarından transpozonların etkisi ile epigenetik değişimler meydana gelirken, Transpozonlar da epigenetik mekanizmaların etkisi ile susturulabilmekte veya aktif hale gelebilmektedir [16].

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), ülkemizde tahıl ekilişi ve üretim miktarı bakımından buğdaydan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Tük [17] verilerine göre ülkemizde arpanın son beş yıldaki üretim miktarı ve ekilen alan büyüklüğü Resim 2.'de verilmiştir.

Bu çalışmadaki amacımız, canlılar için önemli bir besin kaynağı olan arpa üzerinde ağır metal stresinin neden olduğu retrotranspozon hareketliliğinin boyutunu ve bu hareketliliğin neden olduğu genetik ve epigenetik değişiklikleri tespit etmektir.

MATERYAL ve METOT

Saf arpa tohumları %5' lik sodyum hipoklorit (NaClO)' de 10 dakika bekletilmiş ve yüzeysel olarak sterilize edilmiştir. Daha sonra tohumlar saf su ile yıkanarak kurutulmuş ve ekime hazır hale getirilmiştir. Seçilen eşit büyüklükteki arpa tohumları termik santral çevresine aynı doğrultuda 500'er metre mesafe ile 15 farklı noktaya ekilmiştir. Arpa tohumlarının 40 günlük vejetasyon sürecini tamamlamasından sonra fideler toplanmıştır. Toplanan örnekler moleküler incelemelerin yapılması için sterilize edilmiş ve dış kirlilik-

ten arındırılmıştır.

DNA İzolasyonu

Arpa fidelerinden DNA izolasyonu Shagai-Marooof ve arkadaşlarının [18] protokolünde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Genomik DNA'nın Saflığının Ölçülmesi

Genomik DNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve %0,8 agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmiştir.

IRAP Analiz

Arpada ağır metal stresinin neden olduğu retrotranspozon hareketliliğini değerlendirmek için IRAP (Inter Retrotranspozon Amplikasyon Polimorfizmi) tekniği kullanılmıştır. Profillerin elde edilmesi için 5 IRAP primeri PCR uygulamasında kullanılmıştır. Kullanılan IRAP primerlerine ait bilgiler Tablo 1.'de verilmiştir.

IRAP-PCR reaksiyon karışımı 2 µl 10 x PCR Buffer, 0,5 µl dNTPs (10 nM), 1,25 µl MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl Primer (5 mM), 1,0 µl Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 birim), 13,25 µl ultra saf su ve 1,0 µl Genomik DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR şartları 95 °C de 2 dakika, 95 °C de 30 saniye 2 döngü, X °C (x; IRAP Primeri bağlanma sıcaklığı) 1 dakika, 72 °C de 2 dakika, 95 °C de 30 saniye 41 döngü, 35 °C de 1 dakika, 72 °C de 2 dakika, 72 °C de 5 dakika programına göre gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri daha sonra 4 °C de stoklanmıştır.

Elektroforez

Elde edilen PCR ürünleri 6x gel yükleme solüsyonu ile karıştırılmış ve etidyum bromür solüsyonunda (2 µl Etbr / 100ml 1xTBE tampon) 40 dakika boyunca boyanmış agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 150 dakika 70 Voltta 0,5 TBE (Tris-Boreta-EDTA) ile yapılmıştır. Elektroforez işleminden sonra oluşan primer bantları Uvisoft analiz paketi (Cambridge, İngiltere) ile Bio Doc Görüntü Analizi Sistemi UV altında görüntülenmiştir.

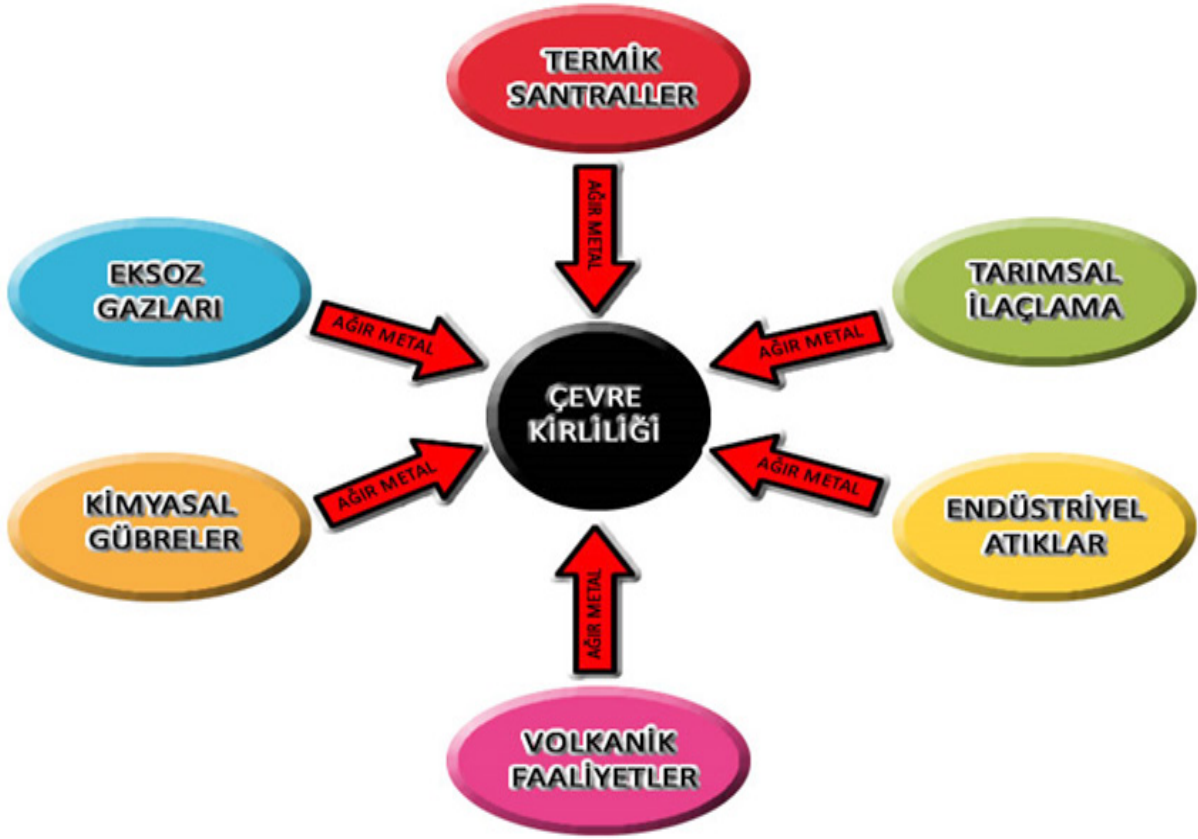
Data Analiz

Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol IRAP profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar görüntüleme cihazı ve Total LAB TL 120 (Non-linear Dynamics) yazılımıyla belirlenmiştir. Genomik kalıp sabitliği (%) tüm primer ürünleri için $100 \times \frac{a}{a+b}$ formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki; a; her bir uygulama örneği için tespit edilen IRAP polimorfik profillerini, n; ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bant sayısı olarak seçilmiştir. Uygulama gruplarına ait IRAP profillerinde gözlenen polimorfizm negatif kontrol grubuna göre yeni bir bantın ortaya çıkması veya mevcut bir bantın kaybolmasını kapsamıştır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Arpa örneklerinde IRAP analizi sonucu oluşan bantların dağılımı, polimorfizm oranları ve GTS değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Arpa örneklerine uygulanan 5 IRAP primerinde toplam 345 bant oluşmuştur. Meydana gelen bantların büyüklükleri 81 bp ile 2117 bp aralığında olduğu tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 9 örnekte polimorfizm tespit edilmiştir. Oluşan polimorfizm değerleri %9,52 ile %52,38 aralığında değişkenlik göstermektedir. En yüksek polimorfizm ağır metal kaynağına en yakın noktadan alınan örneklerde tespit



Resim 1: Ağır metal kirliliğine neden olan faktörler



Resim 2. 2017 Tük verileri

Tablo 1. Kullanılan IRAP primerleri ve sekans bilgileri.

Primer Adı	5'→3'	T.M.
SUKKULA	GATAGGGTCGCATCTGGGCGTGAC	63.3
3LTR-5	TGTTCCCATGCGACGTTCCCAACA	64.6
LTR 6150	CTGGTTCGGCCCATGCTATGTATCCACACATGTA	64.4
NIKITA E2647-	ACCCCTCTAGGCGACATCC	58.7
LTR 6149 -5	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	65.9

Tablo 2. IRAP primerlerinden elde edilen polimorfizm ve GTS değerleri.

PRİMER	Kont-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
3LTR5	4	+130	+141	+136	+144	+137	+146										
		+851	+883	+872	+894	+879	+875	+146	+140	+113
LTR6150	5	+331	+1.212	+1.286	+1.297	+1.366											
		+1.150	+1.369	+1.320	+1.387		+1322	+1.645	+869								
		-460															
SUKKULA	5	+826	+827	+830	+834	+814											
		-155	-155	-155	-155	-155	+832	+830	+846
NIKITA	4	+1.026	+989	+931	+963	+1012	+1.043	+1.098	+1.156	+867	
		+828	+817														
LTR6149	3	-443	-856	-856	-443	-856											
		-1.832	-443	-443		-443	-443	-443
Toplam																	
Bant Sayısı	21	11	10	9	8	8	6	5	4	2	
Polimorfizm Oranı		%52.38	%47.61	%42.85	%38.09	%38.09	%28.57	%23.80	%19.04	%9.52	0	0	0	0	0	0	
GTS		%47.62	%52.39	%57.15	%61.91	%61.91	%71.43	%76.20	%80.96	%90.48	%100	%100	%100	%100	%100	%100	

edilmiştir. Bu noktadaki polimorfizm oranı %52,38'dir. Bu örnekte toplam 11 polimorfik bant varlığı veya eksikliğinin olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm onuncu noktadan on beşinci noktaya kadarki örneklerde tespit edilmemiştir.

Örneklerin GTS oranında termik santrale yakınlıkları ile ters orantılı olarak artış olduğu tespit edilmiştir. Polimorfizm tespit edilen 9 örneğin GTS değerleri %47,62 ile %90,48 aralığında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ağır metal kaynağına yakınlık olarak onuncu noktadan on beşinci noktaya kadar olan örneklerin GTS değeri %100 olarak tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Biyosferdeki ağır metal kirliliği, tüm dünyada kabul edilmiş dikkat edilmesi gereken çevresel sorunlardan birisidir. Bundan dolayı ağır metallerden kaynaklı toksik etkiler ekolojik araştırmaların en popüler başlıklarından biri halini almıştır [19].

Organizmaların genomları içerisinde yer alan tekrarlı ve hareketli DNA dizileri olan transpozonlar, bulduklarından dolayı konak organizmayı olumlu veya olumsuz şekillerde etkileyebilmektedirler. Çevresel koşulların değişmesi veya stres faktörleri bu genomik elementlerin aktifliğine etki

edebilmektedir [20]. Bugüne kadar bitkilerde farklı streslerin neden olduğu retrotranspozon hareketliliğinin tespitinde IRAP-PCR tekniği kullanılmıştır, [21], [22], [23], [24].

Çalışmamızda termik santralden yayılan ağır metallerin arpa üzerinde oluşturduğu stresin tespitinde IRAP tekniği kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan SUKULA, 3LTR-5, LTR 6150, NIKITA e2647-, LTR 6149-5 primerlerinde retrotranspozonların hareketliliğinden kaynaklı polimorfizmler tespit edilmiştir. Ağır metal kirliliğine neden olan termik santrale yakın noktalarda yetiştirilen arpa örneklerinde polimorfizm değerlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ağır metal stresinden dolayı hareketlilik düzeyi artan retrotranspozonlardan bitkilerin genomik kalıp sabitliğini (GTS) olumsuz yönde etkilediği anlaşılmıştır. Çünkü en düşük GTS değerleri termik santrale en yakın örneklerde tespit edilmiştir. Retrotranspozonların genomda meydana getirdikleri hareketlilik artıkça gen okunusunda da farklılıklar meydana gelebilmektedir. Retrotranspozonların hareketliliğinde meydana gelen artıştan dolayı primer bağlanma noktalarında ve genom profilindeki meydana gelen değişimler yeni bantların oluşumu ve/veya bantın kaybolmasına neden olabilmektedir. Bu durumdan dolayı ağır metal stresine maruz kalan örnekler ile kontrol gurubu örnekleri karşılaştırıldığında polimorfizmler elde edilmiştir.

Ağır metallerin bitkilerde istikrarsızlığa neden olduğu önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Ertürk [24] yaptığı çalışmada mısır bitkisine uyguladığı farklı dozlarda ağır metal-lerden kaynaklı olarak genetik farklılıkların ortaya çıktığını tespit etmiştir. Tuz stresinin buğday (*Triticum aestivum* L.) üzerinde retrotranspozon hareketliliğine etkisinin incelendiği çalışmada uygulanan farklı tuz konsantrasyonuna bağlı olarak retrotranspozon hareketinin arttığı ve GTS oranının azaldığı gözlemlenmiştir [25]. Farklı dozlardaki Mn ağır metalinin mısır (*Zea mays* L.) üzerinde meydana getirdiği genotoksik etki IRAP tekniği ile analiz edilmiş ve %22 ile %42 arasında değişen oranlarda polimorfizmler tespit edilmiştir. Ayrıca Mn doz artışına bağlı olarak GTS değerlerinde düşüş meydana geldiği vurgulanmıştır [26]. Literatür sonuçları ile çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar paralellik göstermektedir. Ağır metallerin tahıllarda meydana getirdiği stres sonucunda retrotranspozon hareketliliğinin tespitinde IRAP yönteminin kullanılabileceği tespit edilmiştir. Sanayi kuruluşlarının neden olduğu çevre kirliliğinin azaltılması için bu bölgelere uygun akümülatör bitkilerin tespit edilerek uygulanması basit ve uygulanabilir bir çözüm olabilir. Ayrıca ağır metal kirliliğine tolerans düzeyi yüksek tahıl türlerinin tespit edilerek kirliliğin yoğun olduğu bölgelere ekilmesinin daha uygun olacağı kanaatini taşımaktayız.

REFERANSLAR

[1]. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı. 2017. 2872 sayılı Çevre Kanunu- Mevzuat Bilgi Sistemi, www.mevzuat.gov.tr / Mevzuat_Metin/1.5.2872.doc.

[2]. Jomova K and Valko M. 2011. Advances in metal induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*. May 10;283(2-3):65-87. doi: 10.1016/j.tox.2011.03.001. 23.

[3]. Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A and Timur S. 2007. Metallerin Çevresel Etkileri –I. (erişim adresi: www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf, erişim tarihi: 13.05.2007).

[4]. Öztürk M. 2009. Kül Dağları ve Toksik Metal Kirliliği. Son erişim 1 Eylül 2011.

[5]. Çelik M, Donbak L, Ünal F, Yüzbasioğlu D, Aksoy H, Yılmaz S. 2006. Cytogenetic Damage in Workers From a Coal-Fired Power Plant. *Mutation Research*,627: 158-163.

[6]. Leonard A, Deknudt G, Leonard ED, Decat G. 1984. Chromosome Aberrations in Employees from Fos-sil-Fueled and Nuclear-Power Plants. *Mutation Research*,138: 205-212.

[7]. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology*. 2003 Nov 5;192(2-3):95-117.

[8]. Kumar A, Prasad MNV and Sytar O. 2012. Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in Talinum triangulare grown hydroponically, *Chemosphere*, 89,1056-1165.

[9]. Malec JF, Lezak MD. 2003. Manual for the Mayo-Portland Adaptability Inventory. The Center for Outcome Measurement in Brain Injury Web site. Available at: <http://www.tbims.org/combi/mpai/manual.pdf>. Accessed November 5, 2008.

[10]. Maleva MG, Nekrasova GF, Malec P, Prasad MNV, Strzalka K. 2009. Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. *Chemosphere*, 77: 392–398

[11]. Gangwar S, Singh VP, Srivastava PK and Maurya JN. 2011. Modification of chromium(VI) phytotoxicity by exogenous gibberellic acid application in *Pisum sativum*(L.) seedlings açta. *Physiol. Plant.*, 33,1385-1397.

[12]. Vural N. 2005. Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73

[13]. Waddington CH. 1942. The epigenotype. *Endeavour* 1:18–20.

[14]. Rodenheiser D and Mann M. 2006. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*. 174 (3): 341-8.

[15]. Dawson MA and Kouzarides T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy, *Cell*; 150(1):12

[16]. Slotkin RK, Martienssen R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome, *Nat Rev Genet*. 2007 Apr;8(4):272-85.

[17]. Tüik (2017). <http://www.tuik.gov.tr/> UstMenu.do? me to d=temelist.

[18]. Saghai-Maroofof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW.1984. Ribosomal DNasepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci*. 1984;81:8014–809.

[19]. Gupta M. and Sarin NB. 2009. Heavy metal induced DNA changes in DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker. *J. Environ. Sci.*, 21: 686-690.

[20]. Wessler SR. 2009. The Implicit Genome [online], Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks, http://www.plantbio.uga.edu/wesslerlab/The_Implicit_Genome.pdf [Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2017].

[21]. Carvalho A, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P, Lima-Brito J. 2010. Genetic variability of old portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers, *Annals of Applied Biology*, 156, 337- 345.

[22]. Hamad-Mecbur H, Yılmaz S, Temel A, Sahin K, Gözükırmızı N. 2012. Effects of epirubicin on barley seedlings, *Toxicology and Industrial Health*,

DOI:10.1177/074823371245178.

[23]. Temel A, Kartal G, Gözükırmızı N. 2008. Genetic and epigenetic variations in barley calli cultures, *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 22 (4), 911-94.

[24]. Ertürk F A. 2013. Ağır Metallerin Neden Olduğu Genetik ve Epigenetik Değişikliklerin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, Atatürk üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

[25]. Yağcı S. 2015. Tuzluluk stresinin buğdayda (*Triticum aestivum* L.) meydana getirmiş olduğu retrotranspozon polimorfizmi üzerine β -östradiol'ün etkisinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü biyoloji anabilim dalı moleküler biyoloji bilim dalı yüksek lisans tezi. Erzurum.

[26]. Yigider E, Taşpınar MS, Sıgırmaz B, Aydın M, Agar G. 2016. Humic acids protective activity against manganese induced ltr (long terminal repeat) retrotransposon polymorphism and genomic instability effects in *Zea mays*. *Plant gene* volume 6, june, pages 13-17