DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8589-3-8.2025.0016.
ISBN: 978-9952-8589-3-8

ANTARKTİKA LİKENİ *RUSAVSKIA ELEGANS* (LINK) S.Y. KONDR. & KÄRNEFELT TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN METANOLİK ÖZÜTÜN PBR322 PLAZMİDİ ÜZERİNDEKİ DNA KIRILMA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Yağız Efe GÖZBAŞI[1*], Nazmi Yiğit GÖZBAŞI[1], Prof. Dr. Mehmet Gökhan HALICI[2], Arş. Gör. Dr. Mithat GÜLLÜ[2]

[1]Sümer Fen Lisesi, Kayseri, TÜRKİYE
[2]Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri, TÜRKİYE
ORCID Kodu:
0009-0002-3652-0967 (Yağız Efe GÖZBAŞI)
0009-0008-2999-9117 (Nazmi Yiğit GÖZBAŞI)
0000-0001-2345-6789 (Mehmet Gökhan HALICI)
0000-0001-7100-9609 (Mithat GÜLLÜ)

Özet

Bu çalışmada, Antarktika da geniş bir yayılışa sahip likenleşmiş mantar *Rusavskia elegans* (Link) S.Y. Kondr. & Kärnefelt türünden elde edilen metanolik özütün farklı konsantrasyonlarının (5000 mM, 2500 mM, 1250 mM, 625 mM, 312,5 mM) pBR322 plazmid DNA'sı üzerindeki olası DNA kesilme etkileri detaylı olarak araştırılmıştır. Antarktika, ekstrem çevre koşulları nedeniyle yalnızca dayanıklı ve uyum sağlamış organizmalara ev sahipliği yapmaktadır ve bu nedenle buradaki likenler, eşsiz biyolojik ve kimyasal çeşitlilikleriyle biyoteknolojik açıdan büyük potansiyele sahiptir.

Çalışmada, belirli konsantrasyonlardaki *Rusavskia elegans* özütü ile pBR322 plazmid DNA'sı bir saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiş, ardından etkileşim sonrası DNA örnekleri %0,8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. DNA'nın jel üzerindeki hareketi ve konformasyonel değişimleri, özütün DNA üzerindeki olası kesici etkisinin belirlenmesinde temel alınmıştır. Jel elektroforez analizlerinde, plazmid DNA'nın superhelikal (Form I), açık dairesel (Form II) ve doğrusal (Form III) formları gözlemlenmiş; işlenmemiş pBR322 DNA ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlar, tüm konsantrasyonlarda *Rusavskia elegans* özütünün pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde anlamlı bir DNA kesme etkisi göstermediğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, Antarktika likenlerinden elde edilen özütlerin plazmid DNA üzerinde belirgin bir hasara yol açmadığını ve potansiyel biyoteknolojik uygulamalar açısından güvenli olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, Antarktika likenlerinin biyolojik aktiviteleri ve biyoaktif bileşiklerinin çeşitliliği ileri araştırmalar için önemli bir kaynak olarak öne çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Antarktika, *Rusavskia elegans*, pBR322 plazmid DNA, metanolik özüt.

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8589-3-8.2025.0016.
ISBN: 978-9952-8589-3-8

DETERMINATION OF THE DNA CLEAVAGE EFFECT OF THE METHANOLIC EXTRACT OBTAINED FROM THE ANTARCTIC LICHEN *RUSAVSKIA ELEGANS* (LINK) S.Y. KONDR. & KÄRNEFELT ON PBR322 PLASMID

Abstract

In this study, the potential DNA cleavage effects of different concentrations (5000 mM, 2500 mM, 1250 mM, 625 mM, 312.5 mM) of the methanolic extract obtained from the lichenized fungi *Rusavskia elegans* (Link) S.Y. Kondr. & Kärnefelt, which is widely distributed in Antarctica, on pBR322 plasmid DNA were investigated in detail. Due to its extreme environmental conditions, Antarctica is home only to resilient and highly adapted organisms; thus, lichens from this region possess unique biological and chemical diversity, offering significant biotechnological potential.

In the study, pBR322 plasmid DNA was incubated with various concentrations of *Rusavskia elegans* extract at 37°C for one hour, and the DNA samples were subsequently analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis. The migration and conformational changes of DNA on the gel were used to evaluate the possible cleavage effect of the extract on DNA. Gel electrophoresis analyses revealed the presence of supercoiled (Form I), open circular (Form II), and linear (Form III) forms of plasmid DNA, with untreated pBR322 DNA serving as the control group.

The results indicated that *Rusavskia elegans* extract did not show any significant DNA cleavage effect on pBR322 plasmid DNA at any concentration tested. This finding suggests that extracts obtained from Antarctic lichens do not cause notable damage to plasmid DNA and may be considered safe for potential biotechnological applications. Nevertheless, the biological activities and the diversity of bioactive compounds in Antarctic lichens make them an important source for further research.

Keywords: Antarctica, *Rusavskia elegans*, pBR322 plasmid DNA, methanolic extract.

GİRİŞ

Likenler, mantar ve fotosentetik ortak yaşam formlarının oluşturduğu simbiyotik organizmalardır ve ekstrem çevresel koşullarda hayatta kalabilme özellikleri sayesinde ikincil metabolitler açısından oldukça zengin kaynaklardır (Boustie & Grube, 2005). Bu metabolitler arasında antibakteriyel, antiviral, antioksidan ve genotoksik etki gösterebilen bileşikler yer almakta olup, özellikle ekstrem ortamlarda yetişen liken türleri biyolojik aktivite potansiyeli açısından daha fazla dikkat çekmektedir (Ranković, 2015). Antarktika florasında yaygın olarak bulunan *Rusavskia elegans*, yüksek UV ışınımı, düşük sıcaklık ve kuraklık gibi stres faktörlerine adapte olmuş bir tür olarak, çevresel baskılara karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarıyla biyolojik aktif bileşik üretimi açısından önemli bir kaynak olarak değerlendirilmektedir (Crittenden, 2000; Ruprecht vd., 2020).

DNA hasarı, hücresel yapının bozulmasına, mutasyonlara ve potansiyel olarak kanser oluşumuna neden olabilecek kritik bir biyolojik etkidir. Bu nedenle doğal ürünlerin genotoksik ya da

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8589-3-8.2025.0016.
ISBN: 978-9952-8589-3-8

antimutajenik etkilerinin belirlenmesi, farmasötik araştırmalarda öncelikli konular arasında yer almaktadır (Hartmann & Speit, 1997). Plazmid DNA (özellikle pBR322 gibi model sistemler), doğal ürünlerin DNA üzerindeki potansiyel kırılma veya koruyucu etkilerini in vitro ortamda değerlendirmede yaygın olarak kullanılan bir moleküler biyoloji aracıdır (Singh vd., 2020). Bu çalışmalarda, ekstraktların DNA üzerinde oluşturduğu konformasyonel değişiklikler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilerek, DNA'ya verilen zarar ya da koruma etkisi gözlemlenmektedir (Manojlovic vd., 2012).

Bu çalışmada, Antarktika'dan izole edilen *Rusavskia elegans* türüne ait metanolik özütün, pBR322 plazmid DNA'sı üzerindeki olası kırılma etkisi in vitro koşullarda incelenmiştir. Bu sayede, türün DNA yapısına doğrudan etki potansiyeli belirlenerek, genotoksik ya da koruyucu özellikleri hakkında bilimsel bir değerlendirme yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca, elde edilen bulgular, ekstrem ortam likenlerinin biyofarmasötik potansiyellerini anlamaya yönelik literatüre katkı sunmayı hedeflemektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Yöntem

Liken Özütlerinin Hazırlanması

1.00 g kurutulmuş liken numunesi alındı ve özüt, metanol kullanılarak toplandı. Whatman No 1 filtre kağıdı kullanılarak liken özütü süzüldü. Süzülme işlemi bittikten sonra özüt cam petri kabı içerisine döküldü ve daha sonra 70 ^{o}C de 1 gün etüvde bekletilerek metanol uzaklaştırıldı. Metanol uzaklaştıktan sonra kalan liken özütü DMF içerisinde çözdürüldü ve plazmid DNA üzerinde analiz edildi (Kuşçulu ve Aslan, 2019).

DNA Etkileşimi Çalışmaları

Liken özütü ve plazmid DNA arasındaki etki agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan özütlerin 30 µl si üzerine 3 µl plazmid DNA (0,5 µg/ml) ilave edilmiştir. Örnekler 37 ^{o}C' de 24 saat karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra Liken özütü –DNA karışımının 10 µl'si yükleme tamponu ile karıştırılıp %1'lik agaroz jele yüklenerek TAE tamponu içerisinde 60 V'ta 2 saat süre ile elektroforez yapılmıştır. Elektroforezden sonra jeller etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyanarak görüntüleme sisteminde fotoğrafları alınmıştır.

SONUÇLAR

Rusavskia S.Y. Kondr. & Kärnefelt

Rusavskia turuncu, kırmızımsı turuncu ve sarı renkte göze çarpan yapraksı tallusu ile bilinen bir likenleşmiş mantar türüdür. Hapter ya da rizin bulunmayan cinste subsrata alt kısımdan bağlanma gerçekleşmektedir. Diğer cinslerden ayrılmasında subsrata bağlanmada hapter ve rizin bulunmaması,

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8589-3-8.2025.0016.
ISBN: 978-9952-8589-3-8

tallus ve apotesyumun anatomik özellikleri ve kemosendrom A içermesi ön plana çıkmaktadır (Kondratyuk ve Kärnefelt, 2003).

***Rusavskia elegans* (Link) S.Y. Kondr. & Kärnefelt**

Deskripsiyon: Tallus yapraksı, turuncu,, 3–5 cm çapa sahip, loplu. Loplar düz ya da hafif konveks. Apotesyum gelişmemiş. Tallus ve apotesyum K+ menekşe rengi.

Ekoloji: Özellikle kuşların kirlettiği kaya ve taşların üzerinde oldukça geniş yayılışlıdır. Nadiren diğer likenlerinden üstünde ya da karayosunları üstünde de gelişim göstermektedir (Øvstedal ve Lewis-Smith, 2001).

Dünyada yayılışı: Bipolar yayılışa sahiptir. Antarktika, Yeni Zelanda, Güney Amerika, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'dan bilinmektedir (Øvstedal ve Lewis-Smith, 2001).

Antarktika'da Yayılışı: Antarktika'dan Antarktika Yarımadası, Kıtasal Antarktika, Bouvetoya, Güney Shetland Adaları, Güney Orkney Adaları ve Güney Georgia'dan bilinmektedir (Øvstedal ve Lewis-Smith, 2001).



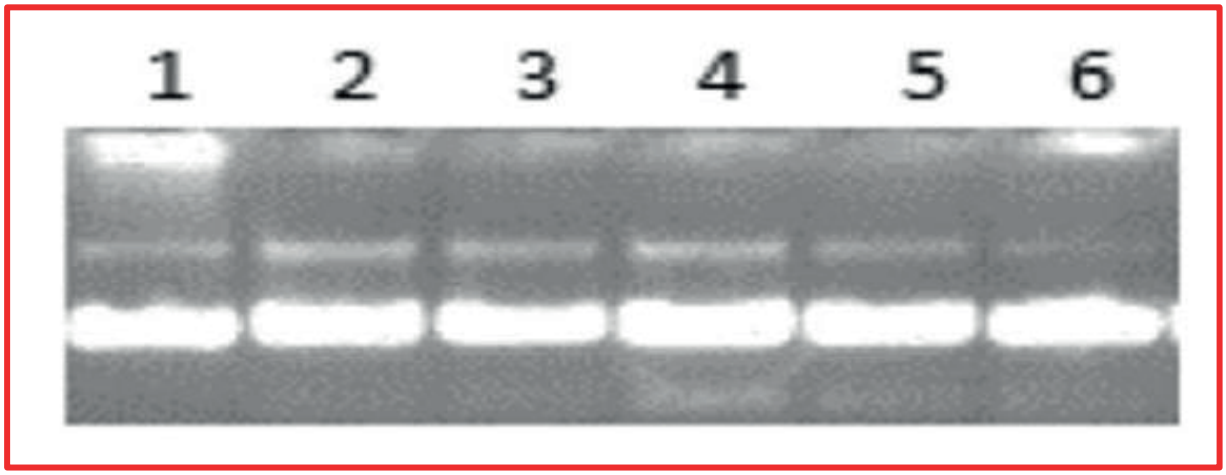
Şekil 1. *Rusavskia elegans.*

DNA etkileşim sonuçları

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8589-3-8.2025.0016.
ISBN: 978-9952-8589-3-8

Farklı konsantrasyonlardaki *Rusavskia elegans* özütü (5000 mM özüt; 2500 mM özüt; 1250 mM özüt; 625 mM özüt; 312,5 mM) *pBR322* plazmid DNA'sı ile karıştırılmıştır. Özüt ve plazmid DNA'sı, 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

Etkileşim sonrası, DNA örnekleri 0.8% agaroz jel elektroforezi kullanılarak analiz edilmiştir. DNA'nın hareketi ve şekli, *pBR322*'nin bozulması ya da modifikasyonu hakkında bilgi vermek için değerlendirilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde, DNA şablonları etidium bromürle boyanmış ve UV ışığı altında görselleştirilmiştir. Plazmid DNA'sının konformasyonel değişiklikleri (superhelikal, nicksiz veya lineer formda) gözlemlenmiştir. Her koşulda kontrol ve deneysel gruplar arasında karşılaştırma yapılarak, *Rusavskia elegans* özütünün *pBR322* plazmid DNA'sı üzerindeki etkisi belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. DNA kesim çalışmaları için jel elektroforezi diyagramı. Hat 1: Kontrol (DNA tek başına); Hat 2: DNA + 5000 mM özüt; Hat 3: DNA + 2500 mM özüt; Hat 4: DNA + 1250 mM özüt; Hat 5: DNA + 625 mM özüt; Hat 6: DNA + 312,5 mM özüt.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, Antarktika kökenli Rusavskia elegans türünden elde edilen metanolik özütün, pBR322 plazmid DNA üzerindeki olası genotoksik etkileri in vitro ortamda değerlendirilmiştir. Süper sarmallı (Form I) pBR322 DNA'nın çeşitli konsantrasyonlardaki özütlerle inkübe edilmesinin ardından yapılan agaroz jel elektroforez analizlerinde, DNA'nın yapısal bütünlüğünün korunduğu ve herhangi bir kırılma formuna (Form II – açık dairesel ya da Form III – doğrusal form) dönüşmediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, kullanılan *R. elegans* metanolik özütünün DNA üzerinde belirgin bir kesici (nukleolitik) aktivite göstermediğini ortaya koymaktadır.

Literatürde bazı liken türlerinden elde edilen ekstraktların DNA üzerinde kırılma oluşturabildiği bildirilmiştir. Örneğin, *Usnea* ve *Parmelia* türlerinin belirli fraksiyonları, yüksek konsantrasyonlarda DNA zincirinde kopmalara neden olabilmektedir (Manojlovic vd., 2012). Ancak benzer şekilde, bazı liken ekstraktlarının düşük ya da sıfır genotoksisiteye sahip olduğu ve hatta DNA koruyucu

(antimutajenik) etkiler gösterebildiği de bilinmektedir (Boustie & Grube, 2005; Ranković, 2015). Bu durum, liken ekstraktlarının bileşimindeki fenolik bileşiklerin türüne, miktarına ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini göstermektedir (Ruprecht vd., 2020).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Rusavskia elegans özütü, kullanılan konsantrasyon aralığında (5000 mM – 312,5 mM) pBR322 DNA üzerinde doğrudan bir kırılma etkisi oluşturmamıştır. Jel görüntülerinde yalnızca süper sarmallı DNA formunun (Form I) yer alması, DNA ipliklerinde çift ya da tek sarmal kesilmenin gerçekleşmediğini ve DNA konformasyonunun korunduğunu göstermektedir. Bu bulgu, özütün genotoksik değil, aksine DNA'ya zarar vermeyen bir bileşik profiline sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Bu sonuçlar, *R. elegans*'tan elde edilen metanolik ekstraktın olası DNA koruyucu özellikler taşıyabileceği yönünde ön bulgular sunmaktadır. Ancak bu etkinin kesin olarak anlaşılabilmesi için, gelecekte özütün antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi (örneğin DPPH, ABTS, FRAP testleriyle) ve hücresel genotoksisite testleri (örneğin Comet Assay, mikronükleus testi) ile desteklenmesi gerekmektedir (Hartmann & Speit, 1997; Singh vd., 2020).

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, *Rusavskia elegans* metanolik özütünün model DNA sistemi olan pBR322 üzerinde herhangi bir kırılma etkisi göstermediğini ortaya koymuştur. Bu durum, özütün potansiyel olarak güvenli bir biyolojik profil taşıyabileceğini ve gelecekte DNA koruyucu doğal bileşiklerin keşfinde aday olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu çıkarımı doğrulamak için daha ileri biyokimyasal ve hücresel düzeyde çalışmalar yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

Boustie, J., & Grube, M. (2005). Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genetic Resources, 3(2), 273–287. https://doi.org/10.1079/PGR200591.

Crittenden, P. D. (2000). Aspects of the ecology of mat-forming lichens. *Range Management*, 53(1), 65–74.

Hartmann, A., & Speit, G. (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). Toxicology Letters, 90(2–3), 183–188. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(96)03892-X

Kondratyuk, S. Y., & Kärnefelt, I. (2003). A revised generic concept of Caloplaca group and its segregation into new genera. Bibliotheca Lichenologica, 86, 429–478.

Kuşçulu, M., & Aslan, A. (2019). Liken ekstraktlarının genotoksik ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 59(1), 25–32.

Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Maskovic, P. Z., & Milenkovic, M. T. (2012). Evaluation of DNA interaction and antioxidant activity of methanol extracts from lichen species. Food Chemistry, 135(3), 1300–1306. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.088

Øvstedal, D. O., & Smith, R. L. (2001). *Lichens of Antarctica and South Georgia: a guide to their identification and ecology*. Cambridge University Press.

Ranković, B. (Ed.). (2015). Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential. Springer.

Ruprecht, U., Lumbsch, H. T., & Gasparyan, A. (2020). Lichen diversity in Antarctica: Taxonomic and biogeographic patterns. Diversity, 12(4), 146. https://doi.org/10.3390/d12040146

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8589-3-8.2025.0016.
ISBN: 978-9952-8589-3-8

Singh, P., Pandit, S., & Ahmad, A. (2020). Assessment of genotoxicity using plasmid DNA assay: A tool for environmental monitoring. Environmental Monitoring and Assessment, 192(10), 1–10. https://doi.org/10.1007/s10661-020-08571-w