

T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARA UYUMLU
BAZI SAZAN TÜRLERİNDE HEMOGLOBİN PROTEİNİ
FARKLILIKLARININ ELEKTROFORETİK
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

BURÇİN ZÖNGÜR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Naci DEĞERLİ

Sivas
2009

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nce hazırlanan ve yayınlanan “Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu” adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
SUMMARY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Globinlerin Dağılımı ve Fonksiyonları.....	3
1.2. Omurgalı Globin Gen Ailesi.....	5
1.1.1. <i>Alfa</i> Globin Gen Ailesinin Evrimsel Süreci.....	6
1.1.2. <i>Beta</i> Globin Gen Ailesinin Evrimsel Süreci.....	8
1.3. Hemoglobin Molekülünün Yapısı.....	10
1.4. Globin Genlerinde Değişiklik Meydana Getiren Olaylar.....	12
1.5. Hemoglobin Alt Birimlerinin Miyoglobine Benzerliği.....	14
1.6. Hemoglobin Varyantları.....	16
1.7. Balık Hemoglobinleri.....	16
1.8. Hemoglobinin Balıklardaki Evrimsel Süreci.....	21
1.9. Türkiye Balık Faunasının Tarihsel Süreci.....	24
1.10. Çalışılan Balık Örneklerinin Alındığı Yer Özellikleri.....	25
2. METERYAL VE METOT.....	27
2.1. Örneklerin Toplanması.....	27
2.2. Laboratuar Uygulamaları.....	27
2.2.1. Kandan Hemoglobin İzolasyonu.....	27
2.2.2. Dikey Tabaka Doğal-PAGE Jel Uygulaması.....	28
2.2.3. Dikey Tabaka SDS-PAGE Jel Uygulaması.....	33
2.2.4. Tüplü Jel Sistemi ile İzoelektrik Odaklama.....	39

2.3. Verilerin Değerlendirilmesi.....	43
3. BULGULAR	45
3.1. Dikey Tabaka Jel Elektrofrezisi ile Doğal- PAGE Bulguları.....	45
3.2. Dikey Tabaka Jel Elektrofrezisi ile SDS-PAGE Bulguları.....	46
3.2.1. Normal Homojenizatların Yürütülmesi ile Elde Edilen Bulgular.....	46
3.2.2. IEF ile Bulunan Bantların Kesilip SDS-PAGE ile Yürütülmesi.....	49
3.2.2.1. Kesilen Bantların Ezilerek SDS-PAGE Jel ile Yürütülmesi.....	49
3.2.2.2. Kesilen Bantların Direk SDS-PAGE Jel ile Yürütülmesi.....	50
3.3. IEF Yöntemi ile Üre-PAGE Bulguları.....	52
3.3.1. Her Bir Türün Kendi İçerisinde Değerlendirilmesi.....	52
3.3.2. Her Türün Birbirleri ile Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi.....	58
3.3.2.1. <i>Oncorhynchus mykiss</i> ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması.....	58
3.3.2.2. <i>Garra rufa</i> ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması.....	63
3.3.2.3. Tödürge <i>Cyprinus carpio</i> ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması.....	67
3.3.2.4. Şarkışla <i>Cyprinus carpio</i> ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması.....	70
3.3.2.5. <i>Chalcalburnus tarichi</i> ve Diğer Türlerin karşılaştırılması.....	72
3.3.3. Türlerin Hepsinin Aynı pH Çizelgesinde Karşılaştırılması.....	73
3.3.4. Belirteçlerin ve İnsan Hb'ninin Değerlendirilmesi.....	75
3.3.5. Hb Bantlarının pH'larına Göre Hazırlanan Filogeni Ağacı.....	77
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	79
5. KAYNAKLAR	95
6. ÖZGEÇMİŞ	103
EKLER	
Ek-1 Örnek balık türlerinde bulunan Hemoglobin proteini miktarları.....	104

ÖZET

FARKLI ÇEVRESEL KOŞULLARA UYUMLU BAZI SAZAN TÜRLERİNDE HEMOGLOBİN PROTEİNİ FARKLILIKLARININ ELEKTROFORETİK TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

Burçin ZÖNGÜR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Naci DEĞERLİ

2009

Hemoglobin çok sayıda organizmada oksijen taşınmasında moleküler bir aygıt olarak işlev görür. Yüksek omurgalılarda 2α ve 2β globin zincirinden oluşan bir dördü proteindir. Omurgalılar arasında kemikli balık formları tür çeşitliliği oldukça fazla olan büyük bir grup olup, değişik çevrelere uyumludurlar ve memelilerin aksine çoklu form izohemoglobin içerirler.

Cyprinidae ailesinin farklı çevresel koşullara uyum sağlamış altı farklı ılıman kuşak türleri, soğuk-iklim uyumlu Salmonid kontrole karşı, incelendi. İncelenen türlerdeki hemoglobin çeşitliliği, farklılaştırılmış izoelektrik pH: 3.5-10 amfolit sistem ile incelendi. Doğal ve SDS-PAGE sistemleri de hemoglobin band modellerin gözlenmesinde kullanıldı.

Soğuk-uyumlu *Oncorhynchus mykiss* için 6 izohemoglobin bandı gözlemlendi. *Chalcalburnus tarichi* için 8, *Cyprininon macrostomus* ve Şarkışla *Cyprinus carpio* için 9, *Garra rufa* için 11 ve son olarak Tödürge *C. carpio* için 12 band elde edildi. Kontrol grubu ve elverişli koşullara uyumlu balıklar için katodik/anodik oran 1'e eşit iken, bu oran oksijen içeriği düşük koşullara uyum sağlamış olan balıklar için 1'den düşük bulunmuştur.

Farklı çevresel koşullara uyum sağlamış balık türleri değişik izohemoglobin band modelleri sergilemektedir. Çalışmada kontrol olarak kullanılan tür en düşük izohemoglobin band modeli sergilemiştir. Diğer yandan, Cyprinidae ailesinin

farklı ılıman iklim formlarının üyeleri, çevresel farklılığa bağlı olarak, çok farklı izohemoglobin modelleri üretmiştir. Bu proteinler ağırlıklı olarak anodik olup, son olarak çevresel koşullar oksijen içeriğini azalttığında balıkların anodik hemoglobin protein ürettiğini söylemek mümkün olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: izohemoglobin, balık, Cyprinidae, katodik/anodik oran.

SUMMARY

INVESTIGATION OF HEMOGLOBIN PROTEIN VARIATION IN SOME CARP SPECIES ADAPTED IN DIFFERENT ENVIROMENTAL CONDITIONS

Burcin ZONGUR

Master of Science Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Naci DEGERLI

2009

Hemoglobin functions as a molecular machine for oxygen transport in many organisms. In higher vertebrates it is a tetrameric molecule consisting of 2α and two 2β globin chains. Among vertebrates, teleosts form a large group of considerably diversified species and adapt themselves to various environments, and in contrast to mammalian, which has multiple forms isohemoglobin.

Six different temperate zone species of Cyprinidae family members, which are adapted to different harsh environmental conditions, were analyzed versus cold-acclimated Salmonid. Hemoglobin variations in analyzed fish species, were determined by modified form isoelectrophoresis pH: 3.5-10 ampholite system. Native- and SDS-PAGE systems were also used for observing hemoglobin proteins bands pattern.

6 isohemoglobin bands were observed for cold-acclimated *Oncorhynchus mykiss* 8 isohemoglobin were observed for *Chalcalburnus tarichi* 9 for *Cyprinion macrostomus* and Sarkisla (Sivas) *Cyprinus carpio*, 11 *Garra rufa* and finally 12 for Todurge (Sivas) *Cyprinus carpio*. Cathodic/anodic ratios were found equal to 1 for control and the fish adapted to available conditions. But these ratios were lower than 1 value, when environmental milieu was changed for fish, which are adapted to these poorly oxygenated conditions.

Different environmentally adapted fish species are representing various isohemoglobins bands pattern. The species used as a control group in this study

shown the lower isohemoglobin bands form. On the other hand, different forms of temperate climate Cyprinidae family member are produced isohemoglobins bands pattern, and the number of these band were higher than control group, depending on different adaptation conditions. The majority of these protein bands were anadic and it can be said that fish are producing anodic hemoglobin protein, when environmental conditions was changed to poorly oxygenated milieu.

Key words: isohemoglobin, fish, Cyprinidae, catodic/anodic ratio.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve çalıŐmalarımın her aŐamasında bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen, tüm çalışma sürecim boyunca zor anlarımda bana destek olan Sayın Hocam Doç. Dr. Naci DEĞERLİ' ye en içten dileklerle teŐekkürlerimi sunarım.

Tezimi maddi olarak destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyon BaŐkanlıĐına teŐekkürlerimi sunarım.

Örneklerin toplanmasında bana yardımda bulunan gl iŐletmelerindeki elemanlara, sürekli arazi gezilerinde yanımda olan ve yardımını esirgemeyen arkadaŐım Abdullah SZER' e teşekkür ederim.

Tez sürem boyunca yanımda olan desteklerini hiçbir zaman unutmayacağım aileme ve niŐanlım Melike ER'e sonsuz teşekkür ederim.

Burçin ZÖNGÜR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Büyük globin gen ailesinin evrimsel çizgisi.....	3
Şekil 2.	<i>Alfa</i> ve <i>beta</i> globin genlerinin dizilimi.....	6
Şekil 3.	<i>Alfa</i> globin genlerinin evrimsel filogeni süreci.....	7
Şekil 4.	Beta globin genlerinin evrimsel filogeni süreci.....	9
Şekil 5.	Hemoglobin molekülünün yapısı.....	11
Şekil 6.	Duplikasyon mekanizması.....	13
Şekil 7.	Miyogloblin ve hemogloblin molekülünün a.a dizi benzerlikleri.....	15
Şekil 8.	Balık Hb ve insan Hb birincil yapı benzerlikleri.....	18
Şekil 9.	Balık Hb1 ve insan HbA dizilerinin içinde yer alan amino asitlerin benzerliği.....	19
Şekil 10.	<i>Catfish</i> ve <i>Tilapia</i> türlerinde bulunan hemoglobin bant farklılıklarının izoelektrik odaklama yöntemiyle tayin edilmesi ve bant profilleri....	20
Şekil 11.	Notothenioidlerde Büyük ve küçük hemogloblinlerin gruplardaki dağılımı.....	22
Şekil 12.	Notothenioid gruplarının Hb içerikleri.....	23
Şekil 13.	IEF yönteminin şematik gösterimi.....	40
Şekil 14.	Şarkışla <i>C.carpio</i> ve Tödürge <i>C.carpio</i> örneklerinin Doğal-PAGE ile elde edilen bant profilleri.....	45
Şekil 15.	<i>O.mykiss</i> , <i>C.macrostomus</i> ve <i>C.tarichi</i> türlerinin Hemogloblinlerinin Doğal-PAGE elektroforez uygulaması ile görülen bant profilleri.....	46
Şekil 16.	Sukroz gradientli jel ile SDS-PAGE uygulamasında görüntülenen bant profilleri.....	47
Şekil 17.	<i>Chalcalburnus tarichi</i> türünün farklı bireyleri arasında yapılan sukroz gradientli SDS_PAGE uygulaması.....	48
Şekil 18.	Tüm grupların SDS_PAGE karşılaştırması.....	49
Şekil 19.	IEF yöntemi ile bulunan bantların kesilip ezildikten sonra SDS-PAGE jeline uygulanması.....	50
Şekil 20.	IEF yöntemi ile bulunan bantların kesildikten sonra direk SDS-PAGE jeline uygulanması.....	51

Şekil 21. <i>Oncorhynchus mykiss</i> örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.....	52
Şekil 22. <i>Garra rufa</i> (yağlı balık) örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.....	53
Şekil 23. Tödürge <i>Cyprinus carpio</i> örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.....	54
Şekil 24. Şarkışla <i>Cyprinus carpio</i> örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.....	55
Şekil 25. <i>Chalcalburnus tarichi</i> örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.....	56
Şekil 26. <i>Cyprinion macrostomus</i> örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.....	57
Şekil 27. <i>O. mykiss</i> ve <i>G. rufa</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	58
Şekil 28. <i>O. mykiss</i> ve Tödürge <i>C. carpio</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	59
Şekil 29. <i>O. mykiss</i> ve Şarkışla <i>C. carpio</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	60
Şekil 30. <i>O. mykiss</i> ve <i>C. tarichi</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	61
Şekil 31. <i>O. mykiss</i> ve <i>C. macrostomus</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	62
Şekil 32. <i>G. rufa</i> ve Tödürge <i>C. carpio</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	63
Şekil 33. <i>G. rufa</i> ve Şarkışla <i>C. carpio</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	64
Şekil 34. <i>G. rufa</i> ve <i>C. tarichi</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	65
Şekil 35. <i>G. rufa</i> ve <i>C. macrostomus</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	66
Şekil 36. Tödürge <i>C. carpio</i> ve Şarkışla <i>C. carpio</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	67
Şekil 37. Tödürge <i>C. carpio</i> ve <i>C. tarichi</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	68
Şekil 38. Tödürge <i>C. carpio</i> ve <i>C. macrostomus</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	69
Şekil 39. Şarkışla <i>C. carpio</i> ve <i>C. tarichi</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	70
Şekil 40. Şarkışla <i>C. carpio</i> ve <i>C. macrostomus</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	71
Şekil 41. <i>C. tarichi</i> ve <i>C. macrostomus</i> türlerinin Hb bant profilleri.....	72
Şekil 42. IEF yöntemi ile bulunan Hemogloblin bant profillerinin tüm türlerde karşılaştırılması.....	73
Şekil 43. IEF tekniği ile bulunan insan kanı, Hemogloblin ve Miyogloblin belirteçleri (marker), protein belirteci (marker).....	76

Şekil 44. Türlerde bulunan Hb bantlarının pH'ları karakter seçilerek oluşturulan filogeni ağacı.....78

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Toplama jelinin hazırlanması için gereken kimyasal bileşenlerin miktarlarının gösterilmesi.....	37
Tablo 2. Ayırıştırma jelinin hazırlanması için gereken kimyasal bileşenlerin miktarlarının gösterilmesi.	37
Tablo 3. <i>Oncorhynchus mykiss</i> türünün farklı bireylerinin Hb band pH noktaları.....	52
Tablo 4. <i>Garra rufa</i> (yağlı balık) türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları.....	53
Tablo 5. Tödürge <i>C.carpio</i> türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları.....	54
Tablo 6. Şarkışla <i>C.carpio</i> türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları.....	55
Tablo 7. <i>Chalcalburnus tarichi</i> türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları.....	56
Tablo 8. <i>C.macrostomus</i> örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.....	57
Tablo 9.a. <i>O.mykiss</i> ve <i>G. rufa</i> 'nın ortak ve farklı bantları.....	58
Tablo 9.b. <i>O.mykiss</i> ve <i>G. rufa</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	59
Tablo 10.a. <i>O.mykiss</i> ve Tödürge <i>C.carpio</i> 'nun ortak ve farklı bantları.....	59
Tablo 10.b. <i>O.mykiss</i> ve Tödürge <i>C.carpio</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	60
Tablo 11.a. <i>O.mykiss</i> ve Şarkışla <i>C.carpio</i> 'nun ortak ve farklı bantları.....	60
Tablo 11.b. <i>O.mykiss</i> ve <i>C.carpio</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	61
Tablo 12.a. <i>O.mykiss</i> ve <i>C.tarichi</i> 'nin ortak ve farklı bantları.....	61
Tablo 12.b. <i>O.mykiss</i> ve <i>C.tarichi</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	62
Tablo 13.a. <i>O.mykiss</i> ve <i>C.macrostomus</i> 'un ortak ve farklı bantları.....	62
Tablo 13.b. <i>O.mykiss</i> ve <i>C.macrostomus</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	63
Tablo 14.a. <i>G. rufa</i> ve Tödürge <i>C.carpio</i> 'nun ortak ve farklı bantları.....	63
Tablo 14.b. <i>G. rufa</i> ve Tödürge <i>C.carpio</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	64
Tablo 15.a. <i>G. rufa</i> ve Şarkışla <i>C.carpio</i> 'nun ortak ve farklı bantları.....	64

Tablo 15.b.	<i>G. rufa</i> ve <i>Şarkışla C.carpio</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	65
Tablo 16.a.	<i>G. rufa</i> ve <i>C.tarichi</i> 'nin ortak ve farklı bantları.....	65
Tablo 16.b.	<i>G. rufa</i> ve <i>C.tarichi</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	66
Tablo 17.a.	<i>G. rufa</i> ve <i>C.macrostomus</i> 'un ortak ve farklı bantları.....	66
Tablo 17.b.	<i>G. rufa</i> ve <i>C.macrostomus</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	67
Tablo 18.a.	Tödürge <i>C.carpio</i> ve <i>Şarkışla C.carpio</i> 'nun ortak ve farklı bantları.	67
Tablo 18.b.	Tödürge <i>C.carpio</i> ve <i>Şarkışla C.carpio</i> Hb bantlarının pH noktaları	68
Tablo 19.a.	Tödürge <i>C.carpio</i> ve <i>C.tarichi</i> 'nin ortak ve farklı bantları.....	68
Tablo 19.b.	Tödürge <i>C.carpio</i> ve <i>C.tarichi</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	69
Tablo 20.a.	Tödürge <i>C.carpio</i> ve <i>C.macrostomus</i> 'un ortak ve farklı bantları.....	69
Tablo 20.b.	Tödürge <i>C.carpio</i> ve <i>C.macrostomus</i> Hb bantlarının pH noktaları...	70
Tablo 21.a.	<i>Şarkışla C.carpio</i> ve <i>C.tarichi</i> 'nin ortak ve farklı bantları.....	70
Tablo 21.b.	<i>Şarkışla C.carpio</i> ve <i>C.tarichi</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	71
Tablo 22.a.	<i>Şarkışla C.carpio</i> ve <i>C.macrostomus</i> 'un ortak ve farklı bantları.....	71
Tablo 22.b.	<i>Şarkışla C.carpio</i> ve <i>C.macrostomus</i> Hb bantlarının pH noktaları..	72
Tablo 23.a.	<i>C.tarichi</i> ve <i>C.macrostomus</i> 'un ortak ve farklı bantları.....	72
Tablo 23.b.	<i>C.tarichi</i> ve <i>C.macrostomus</i> Hb bantlarının pH noktaları.....	73
Tablo 24.	Tüm grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile oluşturulmuş Hb bant profillerinin odaklanma (pH) noktaları.....	74
Tablo 25.	İnsan kanı, Hb ve miyogloblin belirteçleri (marker), protein belirteci (marker) pH noktaları.....	76
Tablo 26.	Filogeni ağacı oluşturmada kullanılan veri matrisi.....	77

SİMGELER DİZİNİ

(Hb)	Hemoglobin
(α)	Alfa zincir
(β)	Beta zincir
(TrHbs)	Budanmış globin
(TrHbN)	Budanmış grup 1 globin
(TrHbO)	Budanmış grup 2 globin
(TrHbP)	Budanmış grup 3 globin
(γ)	Gamma
(δ)	Delta
(ϵ)	Epsilom
(ζ)	Zeta
(ψ)	Psi
(θ)	Theta
(π)	Pi
APS	Amonyum persülfat
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletildiamin
EDTA	Etilen Di amin Tetra Asetik Asit
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofeksi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
KCl	Potasyum Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
TCA	Trikloroasetik Asit
1xRetik Salin	%0,9'luk NaCl
NaCl	Sodyum Klorür
IEF	İzoelektrik Odaklama Elektrofeksi

Bu teze C.Ü.B.A.P Destekleme Birimi tarafından, F-240 No'lu proje adıyla maddi destek sağlanmıştır.

Bu yüksek lisans tezimi nişanlým Melike ER'e adıyorum...

1. GİRİŞ

Bilindiği gibi hemoglobin molekülü birçok düşük organizasyonlu canlılar ve temelde omurgalı canlı grupları olmak üzere, tüm dokulara oksijen taşıyan “Hem” grubuna bağlı demir elementi içeren bir proteindir. Kanın kırmızı rengi hücresel ağırlığının % 33’ünü oluşturan eritrositlerdeki hemoglobinden kaynaklanır.

Hemoglobin molekülü; tetramer yapıda olup 4 hem molekülü ve 4 globin molekülünden meydana gelmektedir. 1 Hem molekülü; 4 pirool halkasının metenil köprüleri ile birbirlerine bağlanmasıyla protoporfirin IX çekirdeğini oluşturur. Bu protoporfirin IX çekirdeğindeki pirool halkalarının azotları (N) metal bağlama yeteneklerinden dolayı tek bir Fe^{++} atomunu bağlayarak “Hem” molekülünü meydana getirirler. Globin molekülü ise 2 adet *alfa* (α) ve 2 adet *beta* (β) zincirlidir. Bu ikişer adet protein zincirini kodlayan gen bölgeleri tandem duplikasyon olayları, translokasyonlar ve lateral gen transferleri ile evrim sürecinde omurgalılardaki gen dizilerinin yapısını kazanmışlardır (Reichert ve Brown, 1909).

Globinler, moleküler seviyede evrim çalışmalarında sıkça kullanılırlar. İlk olarak kabul edilmiş olan moleküler hastalık β -globin genindeki tek bir nükleotidin değişmesiyle meydana gelen orak hücre anemisi (Pauling ve Ark., 1956). Miyogloblin ve hemoglobin yapıları hem proteinin 3 boyutlu yapısı hem de protein yapısındaki amino asit dizisindeki değişimler arasındaki ilişkileri de değerlendirmemizde ilk bilgileri sağlamıştır (Kendrew ve Ark., 1958; Perutz ve Ark., 1965). Globinler allosterik değişimlerin teorik ve yapısal çalışmaları içinde klasik bir örnek oluşturur (Monod ve Ark., 1965; Perutz, 1990).

Kutup bölgelerinin sahip olduğu küresel iklim değişikliklerindeki etkinin anlaşılması, bu bölgelerde yaşayan organizmaların çok güçlü çevresel zorluklara maruz kalmış olmaları, organizmaların bu türlü bir dramatik değişimlere nasıl uyum sağlayıp, mücadele ettikleri ve mevcut iklimsel koşulların hızlı değişimine bağlı olarak, ne ölçüde uyum sağladıklarını anlamak oldukça önemlidir. Özellikle Antarktika kıtasının yakın bölgelerinde oluşturulan araştırma enstitüleri ve buna bağlı lojistik operasyonlar, daha çok bu kıtada uyum sağlamış Notothenioid

türlerinin kolaylıkla elde edilmesi nedeniyle, hemoglobin yapıları ve oksijen bağlama kinetikleri hakkında bilgi birikimine yol açmıştır (Di Prisco ve Ark., 1998).

Yıllardan beri yapılan çalışmalarda globinlerin tipik olarak 150 amino asitten oluştuğu söylenmiştir. Ancak son genom analizleri 116 diziyi içeren oldukça küçük globinlerin yeni bir ailesinin bulunduğunu göstermiştir. Bu küçük (TrHbs) globinler budanmış (truncated) globinler olarak adlandırılır (Freitas ve Ark., 2004).

Budanmış globinler bakteri, bitki ve tek hücreli gruplarda görülmektedir. (Milani ve Ark.,2005). Bu globinler 3 sınıfa ayrılmaktadırlar.

- Grup I budanmış globinler (TrHbN)
- Grup II budanmış globinler (TrHbO)
- Grup III budanmış globinler (TrHbP)

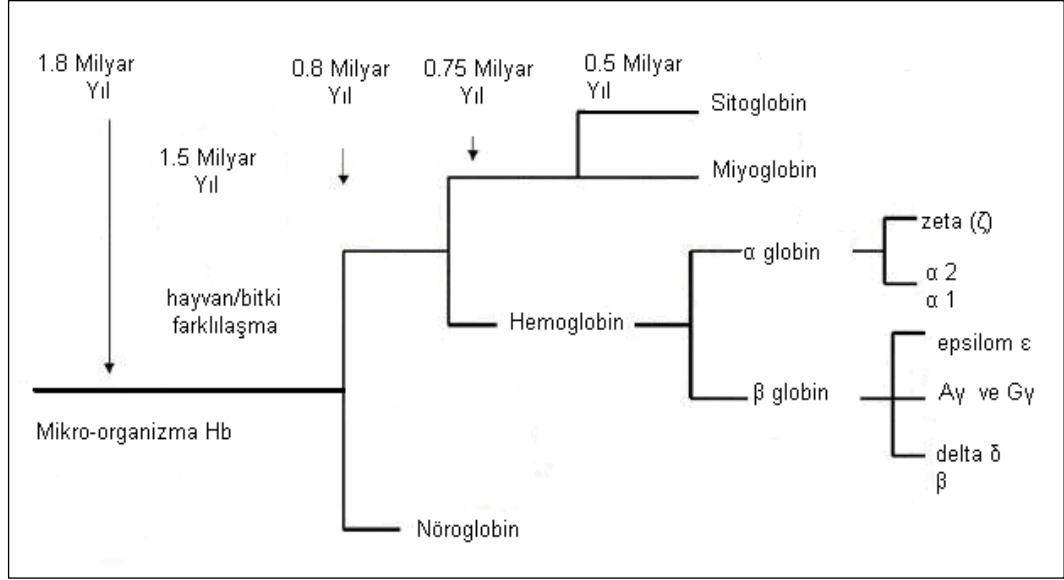
olarak isimlendirilirler (Vuletich ve Lecomte, 2006). Budanmış globin ailesi için grup II globinleri atasal olup grup I ve grup III globinleri ise sonradan grup II'nin duplikasyonu ile meydana gelmişlerdir. Sınıflandırmaları ise Fe^{++} bağlanma yoğunluğu ve "Hem" distal tarafının ligand geçiş yolundaki atık dizi birleşiminin farklılığına göre yapılmaktadır (Wittenberg ve Ark., 2002).

Globinlerin evrimi sıklıkla üzerinde durulan bir konudur ve son zamanlarda keşfedilen prokaryotik globinler evrim analizi için yeni bir kaynak oluşturmaktadır. Arkea ve Bakterilerde protoglobinin varlığı prokaryotik globinlerin atasal olduğunu ifade etmektedir. Budanmış globin genleri bakteriyal ve ökaryotik dünyadaki globinlerin yayılmasına akış sağlamaktadır (Milani ve Ark., 2005).

1,8 Milyar yıl öncesinde mikroorganizmalarda bulunan budanmış globin genleri, 1,5 milyar yıl öncesinde hayvanlarda ve bitkilerde bulunan globin genlerinin orjinini ortaya çıkarmıştır (Şekil 1). Daha sonra bu globin genleri 3 ayrı zaman diliminde farklı molekülleri oluşturmuştur. Bu farklı moleküller evrim sürecindeki çıkış zamanlarına göre şu şekilde sıralanmışlardır:

- 0,8 milyar yıl öncesinde Nöroglobinler,
- 0,75 milyar yıl öncesinde Hemoglobiner

- 0,5 milyar yıl öncesinde Miyoglobin ve Sitoglobinler.



Şekil 1. Büyük globin gen ailesinin evrimsel çizgisi.

Ayrıca Hemoglobin genleri olan α ve β globin genleri 0,5 milyar öncesinden daha kısa bir sürede evrim sürecinde etkilenmeye devam ederek gen aileleri içerisinde bulunan ifade edilen ve ifade edilemeyen birçok geni meydana getirmişlerdir (Wittenberg ve Ark., 2002; Vinogradov ve Ark., 2006).

1.1. Globinlerin Dağılımı ve Fonksiyonları

Tunicatlar dâhil kordalılar ve ilkin omurgalılar karakteristik globin genleri içerir ve temel olarak solunum fonksiyonunda görevlidir. Omurgasızlar *leg* hemoglobini, *flavo* hemoglobinleri ve globin çiftli sensörler olarak heterojen bir globin çeşidi içermektedirler (Weber ve Vinogradov, 2001). Bitkiler, Protistalar, Algler, Bakteriler ve Arkealar'da bulunan diğer globinler oligomerizasyon modeli ve domain yapısal motif füzyonu dâhil dizi ve yapıca geniş bir şekilde ayrılırlar (Bolognesi ve Ark., 1997).

Budanmış globin genlerine sahip olan organizmalar ayrı fizyoloji ve habitatlara sahiptirler (Wittenberg ve Ark., 2002).

Azot fikse eden bakterilerde grup I budanmış globin geni nitrojenaz kompleksinin proteinleri ile ifade edilir ve bakterinin çevresindeki oksijeni elimine ettiği düşünülür. Tüberculosis grup I budanmış globini ise konak tarafından üretilen nitrik oksidin yüksek seviyelerinden bakteriyi korur. Globinler, nitrik oksidin zararlı etkisinin azaltılmasında etkin bir metabolizmadır (Hill ve Ark., 1996).

Bitkilerde simbiyotik, simbiyotik olmayan ve budanmış olmak üzere 3 Hb tipi vardır (Garrocho ve Ark., 2007). Yapılan çalışmalarda simbiyotik Hb (*leg* Hb) ligand bağlayıcı düzenleyici mekanizmalar, miyogloblin ve kırmızı kan hücresi Hb'nden farklı olduğunu göstermiştir. Bitkilerin kök nodüllerinde bulunan *leg* hemoglobini ise kendine azot fiksasyonu sağlayan bakterilerin çevresinin aneorobik kalmasını sağlar (Appleby ve Ark., 1997). Bitkilerdeki budanmış Hb'lerde; budanmış globinler ligand bağlanmasına yardım edebilecek tüneller tedarik edecek şekilde porumsu yapıdadır ve bağlanmış ligand bir distal (dış kabuk) paket yan gruptan daha fazlasıyla stabilize edilir. Budanmış globinler bitkilerdeki farkı bilinmemekle birlikte, bazı araştırmacılar nitrik oksit detoksifikasyonunu veya temizlenmesi (scavenging) esaslı simbiyozlara karşı savunma süreçlerinin baskılanmasını içine alan bir fonksiyon göstermektedir (Andersson ve Ark., 1996). Simbiyotik olmayan Hb'ler, memeli Hb ve miyogloblinlerinden farklılık gösterir. Bu farklılık *ferrik* (Fe^{++}) veya *ferröz* (Fe^{+++}) durumlardaki heksakordinat yapıdaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Tüm bitkilerde bulunan simbiyotik olmayan Hb'lerde kristal yapılar vibrasyonel spektroskopik heksakordinat ve ligand bağlanmış durumlar arasındaki yapısal geçişin doğasını açıklamaktadır (Arredondo ve Ark., 1998). Ayrıca birçok omurgasız globinleri ve mikrobiyal globinlerde oksijen bağlama yeteneğine sahiptirler.

Globinlerin en bilinen fonksiyonu omurgalılarda karbondioksitin ve oksijenin alınması, transferi ve depolanmasıdır.

Hemoglobin akciğerde oksijenin periferik dokulara taşınmasına ek olarak, CO_2 'nin dokulardan, solunumla dışa atılmak üzere akciğerlere taşınmasını kolaylaştırır. Hemoglobin oksijen salıverdiği zaman CO_2 'i doğrudan doğruya bağlayabilir ve kanda taşınan CO_2 , kanda taşınan CO_2 'nin yaklaşık %15'i

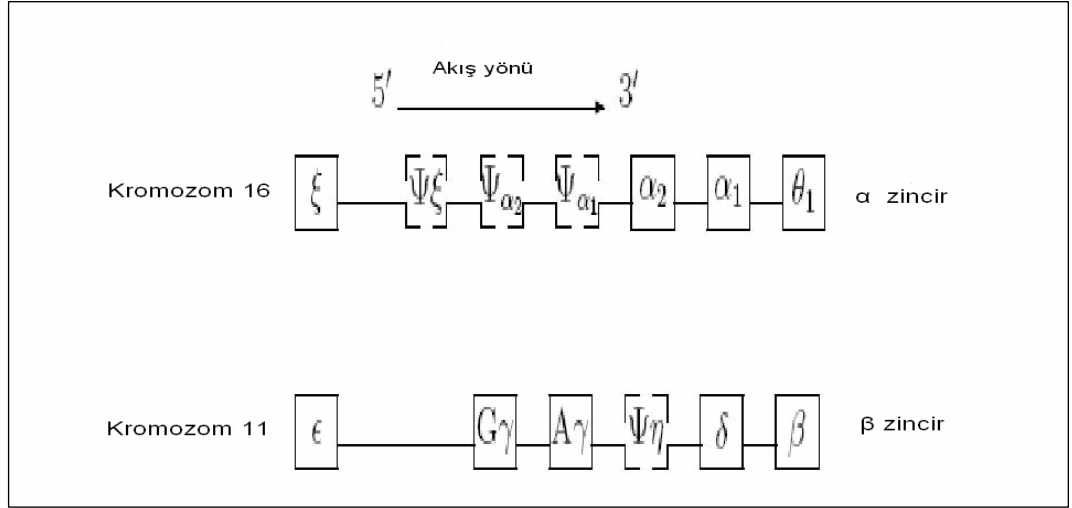
doğrudan doğruya hemoglobin molekülü üzerine taşınır. Bununla beraber CO₂ kanda absorbe olduğunda, eritrositler içindeki karbonik anhidraz, karbonik asit teşekkülünü katalize eder. Karbonik asit çabucak bikarbonat ve protona ayrışır. Denge ayrışma yönündedir. Son derece tehlikeli olan, kanın asidesini artırmadan kaçınmak için, bu gereğinden çok fazla protonu absorbe edici bir tampon sisteminin mutlaka varlığı gerekir. Hemoglobin, kaybedilen her 4 oksijen molekülüne karşılık 2 proton bağlar ve bu nedenle kana büyük bir tamponlayıcı kapasite sağlar. Akciğerlerde bu olay tersine döner yani oksijen, deoksijene olunmuş hemoglobine bağlandıkça protonlar salı verilirler ve bikarbonatın karbonik aside dönüşünü sağlamak üzere bikarbonatla birleşirler. Çok etkin olan karbonik anhidraz enzimi yardımıyla, karbonik asit solunumla dışa atılan CO₂ teşkil eder. Bu nedenle, oksijene bağlanması CO₂'nin solunumla dışa atılışını zorlar. Bu geri dönüşümlü olaya “Bohr Etkisi” denir. Bohr Etkisi, tetramerik hemoglobinin bir özelliğidir ve onun “Hem- Hem” etkileşmesine veya kooperatif (iş birliği) etkilerine bağlıdır. Miyoglobinin herhangi bir Bohr Etkisi göstermez.

1.2. Omurgalı Globin Gen Ailesi

(α) *alfa* ve (β) *beta* globin genleri birlikte globin gen ailesini oluştururlar. Omurgalılarda, β - *globin* benzeri genler (ϵ) *epsilom*, ($G\gamma$) *G gamma*, ($A\gamma$) *A gamma*, (δ) *delta*, (β) *beta*, kromozom 11'in kısa kolunun birinci bölgesindeki 5,5 bandında bulunurlar (Şekil 2). DNA'nın yaklaşık 60.000 baz çifti veya 60 kb'lık bir bölümünü kapsarlar. Sadece 136. kodon da farklılık gösteren $A\gamma$ ve $G\gamma$ şeklinde iki *gamma* (γ) geni vardır. $A\gamma$ 'nın 136. kodonu alanin, $G\gamma$ 'nın ki ise glisin amino asitlerini kodlarlar. $A\gamma$ ile *delta* (δ) arasında bir *psödogen* (yalancı gen) ($\psi\beta_1$) yerleşiktir. Bu gen β genine çok benzemekle birlikte, delesyon ile içine yerleşmiş bir dur kodonu kalıcı şekilde değişmiştir ve bu nedenle işlevsel bir polipeptid kodlayamaz. Bu genleri, birlikte düzenleyen bir bölge, β genlerinin üst kısmında (upstream) ($5'$ yönünde) yerleşmiştir (Eberhard, 2000).

Omurgalılarda iki α globin geni, kromozom 16'nın kısa kolu üzerindeki yaklaşık 30 kb'lık DNA bölgesinde bulunur. Sadece embriyonik evrede aktif olan

zeta (ζ) geni 5' yönünde uzanır. Arada 3 *psödogen* $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$ ve $\psi\alpha_1$ genleri yerleşiktir. İşlevi bilinmeyen başka bir gen, bir *theta* (θ) geni de bu bölgede tanımlanmıştır (Antonarakis ve Ark., 1985).



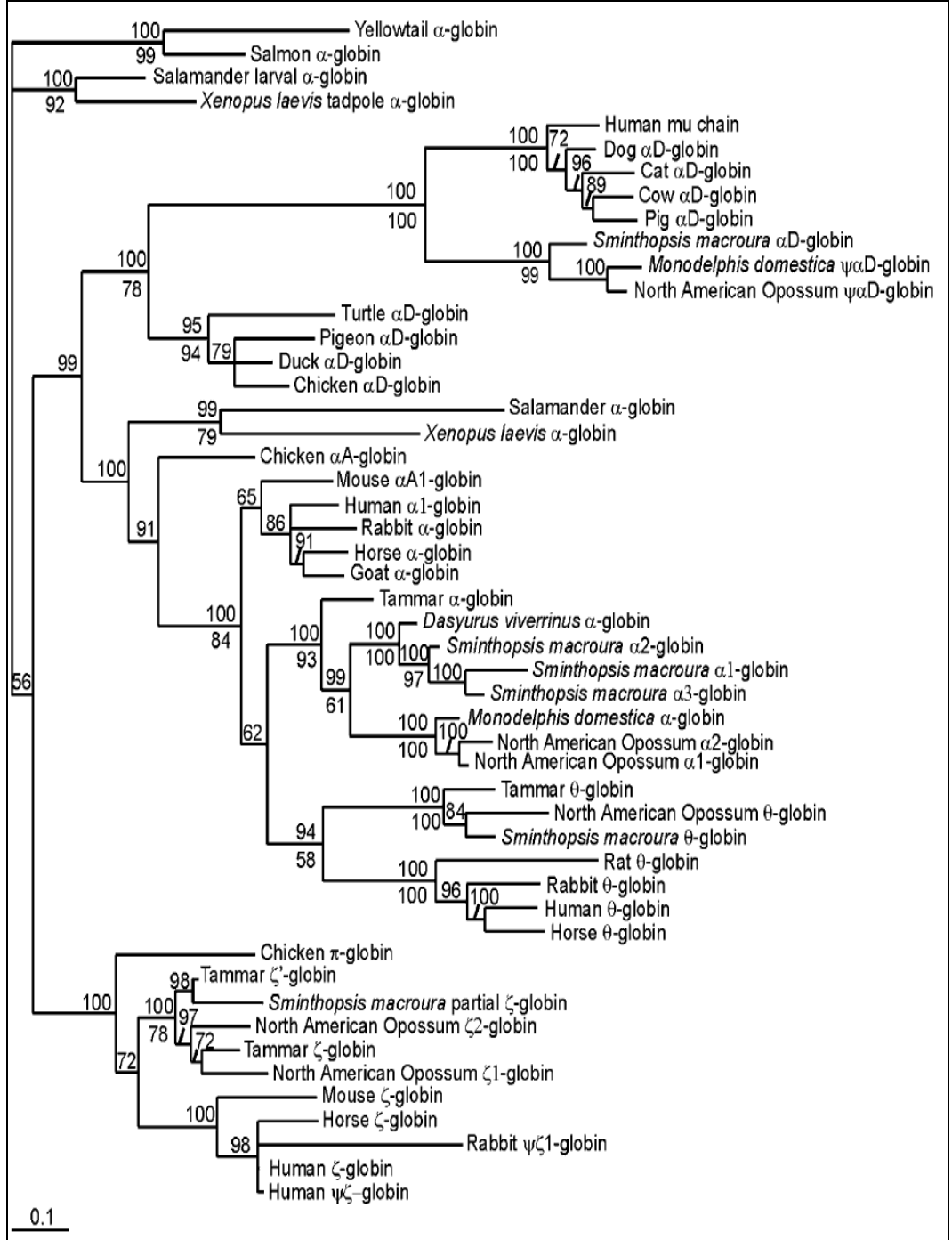
Şekil 2. Alfa ve beta globin genlerinin kromozomlardaki dizilimi.

Her iki grupta yer alan genler birbirleri ile homoloji gösterirler, ancak bu homoloji aynı gen kümesinde yer alan genler arasındaki kadar sıkı değildir. Her bir kümede bulunan genler kromozom boyunca gelişimin ilerleyen basamaklarındaki ifade ediliş sıralarına göre dizilmişlerdir (Lehmann ve Huntsman, 1974).

1.2.1. Alfa Globin Gen Ailesinin Evrimsel Süreci

Bin dokuz yüz yetmişlerin ortalarında insan ve diğer memelilerin α -globin gen ailesi moleküler seviyede oldukça detaylıca çalışılarak aydınlatıldı. α -globin evrim modeli tandem gen duplikasyonları, genomların fonksiyonel gen aktivasyonlarının ve gen dönüşüm olaylarının nasıl gerçekleştirdiklerini ortaya koymaktadır (Hardison, 1998). α -globin gen ailesinin evrimsel tarihi, kuş ve memeli α -globin gen kümelerinin dizi ve filogenetik çalışmaları (Şekil 3) ile açığa çıkarılmıştır.

Bu çalışmalarda α -globinin ilk duplikasyonu ile *zeta* (ζ)-globin geni ve kuşlarda bulunan *pi* (π)-globin geninin ortaya çıktığına güçlü destekler sağlanmıştır (Czelusniak ve Ark., 1982; Proudfoot ve Ark., 1982).



Şekil 3. Alfa globin genlerinin evrimsel filogeni süreci.

Memeli hattındaki atasal bir α - globinin ikinci bir duplikasyonu *theta* (θ)- globin geninin taslağını üretti. *Theta* (θ)- globin geni birçok farklı memeli hatlarında kararlı bir seçim altında olmasına rağmen fonksiyonel statüsü henüz belirsizliğini korumaktadır (Cooper ve Ark., 2005).

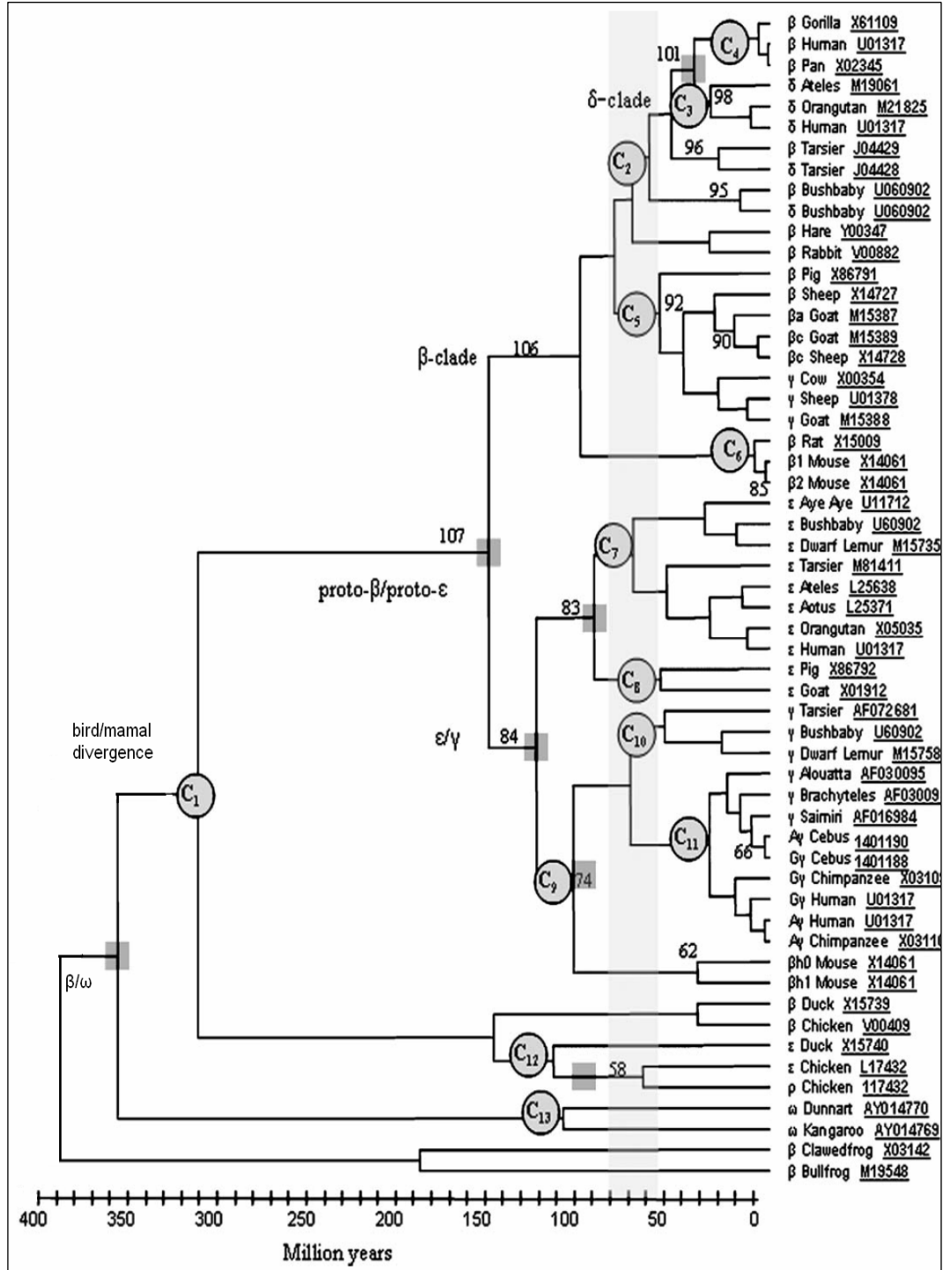
Aynı zamanda ifade edilemeyen *psi* (Ψ) genlerinin duplikasyon olaylarının oluşum zamanlaması şüana kadar açık değildir. Globin gen tarihinin çoğu, gen dönüşüm olayları ile silinmiştir ve bu yüzden aydınlatılamamıştır. 1970'lerde kuşlarda α^D -globin denilen üçüncü bir α -globin zinciri keşfedildi (Hagopian ve Ingram, 1971; Brown ve Ingram, 1974). Fakat daha sonra sürüngenlerin geniş bir çeşidinde α^D -globin geninin var olduğu ve filogenetik analizler ile α^D - globin gen hattının eski bir atasal α -globin geninin duplikasyonundan sonra ortaya çıktığı şimdi ise bu hattın memeli genomlarında kaybedildiği tahmin edilmektedir (Czelusniak ve Ark., 1982; Fushitani ve Ark., 1996) .

1.2.2. Beta Globin Gen Ailesinin Evrimsel Süreci

Beta globin ailesinde geniş çaplı gen duplikasyonu ve fonksiyonel farklılar vardır (Hardison, 1998). α ve β - globin gen ailesinin evrimsel ilişkilerini anlamak için diziler karşılaştırılmış ve şu sonuçlar açığa çıkmıştır; bazı genlerin evrim sürecinde oldukça fazla korunduğu, bazı genlerin ise evrim sürecinde birbirinden ayrıldığı, değişik türlerde genom boyutunun ve gen sayısının farklılık gösterdiği görülmüştür.

α ve β globin genlerinin ayrılması 450- 500 milyon yıl öncesine dayanmaktadır (Goodman ve Ark., 1987). *β -globin* gen ailesi içinde ilk bilinen duplikasyon bir *protobeta* ve bir *protoepsilon* geninin 150- 200 milyon yıl öncesinde ortaya çıkmasını sağladı (Czelusniak ve Ark., 1982). 140 milyon yıl öncesi arasında bir *protoepsilomunun* duplikasyonu ile *epsilon* (ϵ) ve *gamma* (γ) globin genleri evrimleşti. 80- 90 milyon yıl öncesinde ise *protobeta* duplikasyonu (β) *beta* ve *delta* (δ) globin genlerini ortaya çıkardı (Hardison ve Margot, 1984). Simian primatlarda *γ -globinler* 35 milyon yıl öncesinde fazladan bir duplikasyona maruz kalarak $A\gamma$ ve $G\gamma$ paraloglarını (yarı benzer) meydana getirmiştir

(Hayasaka ve Ark., 1992). Gen duplikasyonunun karmaşık tarihi β -globin gen ailesinin bazı üyeleri arasında ki ilişkiler hakkında fikir karmaşıklığına yol açmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Beta globin genlerinin evrimsel filogeni süreci.

1.3. Hemoglobin Molekülünün Yapısı

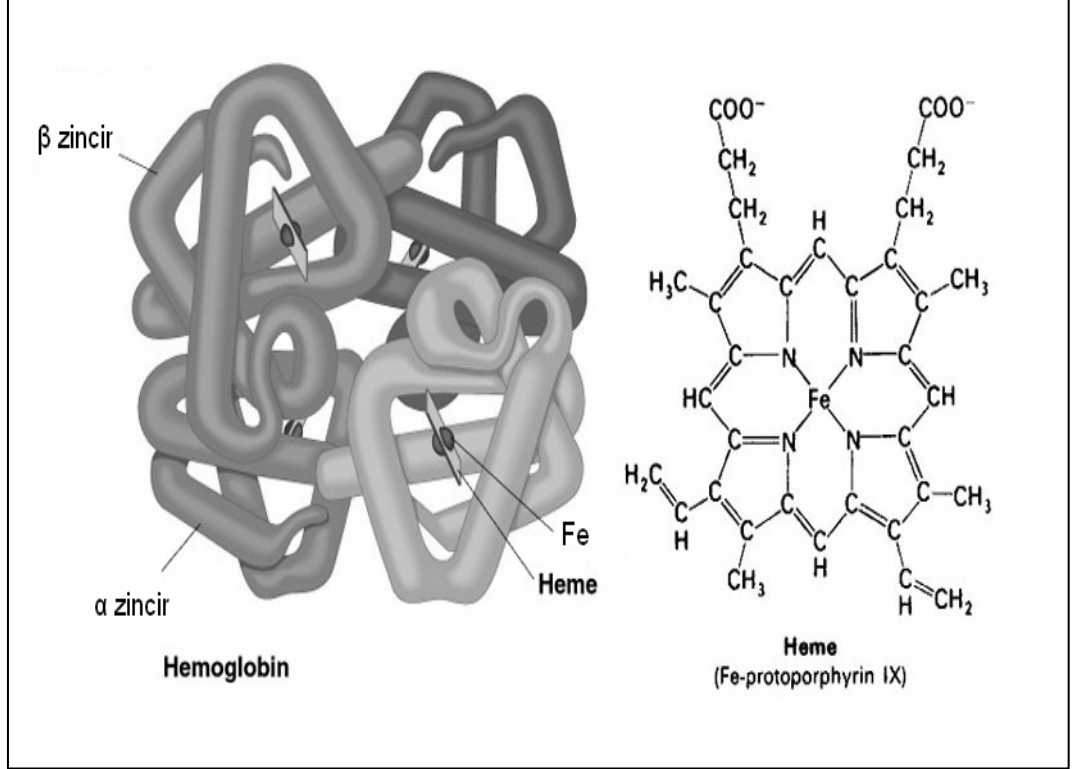
Normal omurgalı hemoglobini HbA, ikişer globin ünitelerinden oluşan *alfa* ve *beta* zincirinden oluşur ve $\alpha_2\beta_2$ olarak gösterilir. Hemoglobindeki α ve β zincirleri birçok yönden miyoglobine benzerlik gösterir. Yapılarında L-valin amino terminal atıkları ve yüksek oranda α -heliks segmentleri bulundurlar. *Alfa* zinciri 141 amino asitten oluşur ve karboksil ucunda L-arginin vardır. Beta zinciri ise 146 amino asitten oluşur ve karboksil ucunda L-histidin bulunur. Yapılarındaki benzer amino asit kalıntıları sebebiyle, 4 alt ünite ilk önce $\alpha\beta$ gibi iki dimerik yapıya ve daha sonra α ve β monomerik karışımlara ayrılırlar ve tetramer yapıda paketlenirler (moleküler ağırlığı 65.000 daltondur). Asit veya baz olabilen ayrıştırıcı ajanın uzaklaştırılmasıyla monomerler $\alpha_2\beta_2$ tetramer yapıya tekrar dönerler.

Hemoglobin ve miyoglobin omurgalılarda oksijen taşıyan proteinlerdir. Hemoglobin kırmızı kan hücrelerinde, miyoglobin kasta bulunur ve kırmızı rengini verir. Hemoglobin evrim süreci sırasında miyoglobinden ortaya çıktığı sanılmaktadır (Şekil 1). Hemoglobinin dört, miyoglobinin bir oksijen bağlama bölgesi vardır. Genleri ve 3 boyutlu yapıları atomik detaylarında tümüyle bilinmektedir.

Tetramer yapıda olan Hb molekülü “globin” adı verilen protein kısım ile “Hem” denilen prostetik gruptan oluşmaktadır. Molekülün globin kısmında 4 adet polipeptid zinciri bulunur. Bu polipeptidlerin her biri, bir Hem grubuna bağlıdır (Huisman, 1993; Lukens ve Lee, 1993; Huisman 1995; Tokullugil ve Ark., 1997).

Hb molekülü, globin kısmındaki polipeptid zincirlerinin amino asit sayıları ve dizilimleri bakımından farklılık göstermektedir. İnsanda Hb molekülünün globin kısmında 6 farklı polipeptid zinciri tanımlanmıştır. Bunlar, *alfa* (α), *beta* (β), *gamma* (γ), *delta* (δ), *epsilon* (ϵ) ve *zeta* (ζ) polipeptid zinciri olarak adlandırılmıştır. *Alfa* polipeptid zinciri 141 amino asitten, β , γ , δ , ϵ ve ζ polipeptid zincirleri ise 146’şar amino asitten oluşmaktadır (Huisman, 1993; Lukens ve Lee, 1993; Huisman ve Ark., 1995). Tüm Hb’lerde “Hem” grubu aynı yapıdadır (Şekil 5). Bu grup, ortasında Fe^{++} bulunan, yan zincirlere sahip, birbirine “metil”

köprüleriyle bağlanmış 4 pirok halkasından oluşmaktadır (Huisman, 1993; Huisman ve Ark., 1995; Tokullugil ve Ark., 1997).



Şekil 5. Hemoglobinin yapısı.

Hb molekülünün biyosentezi, kemik iliğinde eritroblastlarda ve retiküositlerde gerçekleşmektedir. Hb sentezi, hem ve globin kısmının koordineli üretimini gerektirmektedir. Hem biyosentezi, birçok enzimatik basamak içeren karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, başlangıç ve son aşamalar mitokondride, ara aşamalar ise sitozolde gerçekleşmektedir (Huisman, 1995; Tokullugil ve Ark., 1997).

Hb molekülünün globin kısmındaki polipeptid zincirlerinin sentezi için önce, nükleusta globin genlerinin transkripsiyonu sonucu öncü m-RNA (pre-mRNA) sentezlenmektedir. Pre-mRNA'daki intron bölgeleri kesilerek çıkarılmakta ve geri kalan egzonlar sıralı olarak birleştirilmektedir. Bu şekilde oluşan mRNA poliribozomlara giderek taşıdığı genetik bilgiye göre globin

zincirlerinin sentezlenmesini sağlamaktadır. Sentezlenen 4 Hem grubu ile 4 polipeptid zinciri birleşerek hemoglobin molekülünü oluşturmaktadır (Huisman 1993; Huisman ve Ark.,1995). Hb molekülünün ortalama ömrü 120 gündür. Bu süre sonunda, molekülün yıkımı karaciğer, kemik iliği ve dalakta eritrositlerin parçalanmasıyla başlamaktadır. Açığa çıkan Hb molekülünde önce Hem ve globin kısmı birbirinden ayrılır. “Hem” grubu ferritin tarafından, demir ve porfirin kısmına ayrılır. Demir tekrar kullanılmak üzere depolanırken, porfirin oksidasyona uğrayarak biliverdine, biliverdin ise bilirubine dönüşür. Polipeptid zincirleri ise parçalanarak amino asitlerine ayrılır (Lukens ve Lee, 1993; Huisman, 1995).

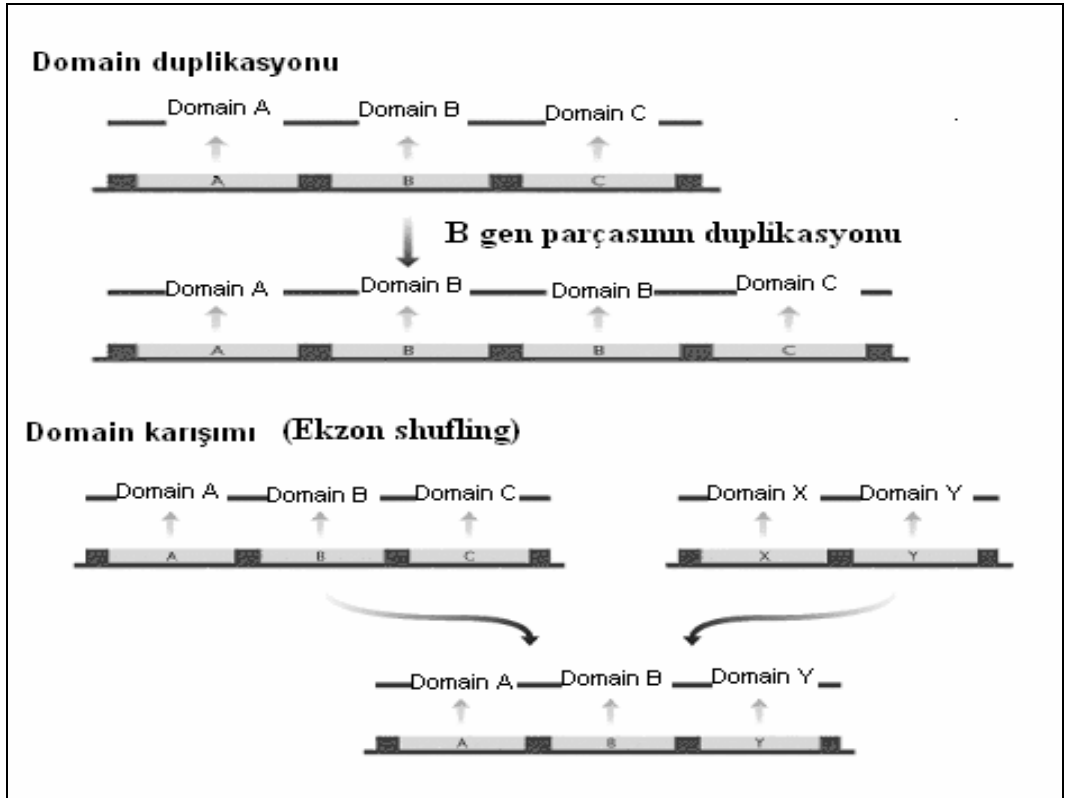
1.4. Globin Genlerinde Değişiklik Meydana Getiren Olaylar

Genetik materyalin herhangi bir kısmı (bir lokus ya da kromozomun büyük bir parçası) genomda birden fazla sayıda bulunuyorsa buna **duplikasyon** denir. Duplikasyonun üç ilginç özelliği bulunur. Birincisi; duplikasyon genin birden fazla kopyasının bulunmasını sağlayabilir. İkincisi; delesyonlar gibi duplikasyon sonucunda da fenotipik çeşitlilik olabilir. Üçüncüsü, duplikasyonlar evrimsel süreçte genlerin çeşitlenmesinde oldukça güçlü bir katkı sağlar.

Duplikasyonla kazanılan genler, zararlı mutasyonların onları inaktive etmesiyle *pseudogen* haline gelmişlerdir. α ve β -globin gen ailesindeki *pseudogenlerin* dizisi analiz edildiğinde, inaktive edici mutasyonlar; kodlama yapan bölgelerde, başlangıç kodonunda ve daha az olmakla birlikte TATA kutusunda çerçeve değişimi ve sessiz mutasyonlar gözlenir. Bazen ise meydana gelen mutasyonlar gende inaktivasyon yerine organizma için yararı olan yeni bir genin meydana gelmesini sağlar. Örnek olarak organizmanın farklı gelişim evrelerinde kullanılan yeni globin genlerinin oluşumu verilebilir (Şekil 6).

Globin genlerinin evriminde tandem duplikasyonları oldukça etkili bir rol üstlenmiştir. Duplikatlar bir arada kaldığında replikasyon ve rekombinasyon da hatalar meydana gelmiş ve yeni diziler ortaya çıkmıştır. Duplikatların kromozomlardan ayrılması translokasyon yoluyla transpozon çevresinde ki

DNA'nın bir bölgesinin duplikasyonu ile bağdaştırılan bir transpozisyon olayıyla da meydana gelebilir. Yer değiştiren (tranpozib) elementlerin genom evrimi üzerine olan en büyük etkisi rekombinasyonu başlatmasıdır. Yer değiştiren element, bitişiğindeki DNA parçasının genomda başka yerlere bağlanmasına, gen ekspresyonunun değişmesine ve hatta genin ifadenmesini engelleyebilir.



şekil 6. Duplikasyon mekanizması.

Gen duplikasyonları, her zaman dizi farklılaşmalarına neden olmaz ve farklı fonksiyonları ortaya çıkarmak üzere meydana gelmez. Bazı çoklu gen aileleri özdeş ya da özdeşe yakın dizilerden meydana gelir. Bunun en önemli örneği *rRNA* ve *histon* genleridir. Bu özdeş genlerin çoklu kopyaları, muhtemelen hücre döngüsünün belli evrelerinde gerekli olan gen ürünlerinin hızlı bir şekilde üretimine duyulan ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır. Bu gen ailelerinde, gen kopyalarının farklı fonksiyonlara ayrılmasını sağlayacak mutasyonları engelleyen mekanizmalar vardır. Eğer gen ailesindeki genlerden biri avantajlı bir mutasyon

kazanırsa, bu mutasyonun gen ailesindeki diğer üyeler arasında yayılması mümkün olur.

Bazı atasal genlerden duplikasyon ve varyasyon yoluyla kalıtılan gen setine **gen ailesi** denmektedir (globin gen ailesi). Bu gen ailesinin üyeleri birlikte kümelenebilir, farklı kromozomlara dağılabilir veya her ikisinin de bir kompozisyonu olabilir.

Yapısal bir gen ailesinin üyeleri hücre tiplerinde veya farklı zamanlarda ifade edilmelerine rağmen genellikle birbirleriyle ilişkilidir. Rekombinasyonda gen evriminde anahtar bir rol oynamaktadır. Genomun gen içeriğini nasıl değiştirdiğinin önemli mekanizması ise eşit olmayan krosing-over ile sağlanır. Bu tip olayları olası kılan özellikler tekrarlı dizilerin varlığından dolayıdır (Levin, 2000).

1.5. Hemoglobinin Alt Birimleri Yapısal Olarak Miyoglobine Benzer

Yetişkin hemoglobini bildiğimiz gibi iki tip globin içerir; iki α zinciri (her birinde 141 kalıntı) ve iki β (her birinde 146 kalıntı) zinciri bulunur. α ve β alt birimlerinin ve miyoglobin polipeptid dizilerindeki amino asitlerin yarısından daha azı aynı olmasına karşın, alt birimlerin ve miyoglobinin üç boyutlu yapısı çok benzerdir (Kendrew ve Ark., 1958). Bununla birlikte iki polipeptidin amino asit sıraları sadece 27 pozisyonda aynı olmasına rağmen yapıları miyoglobine çok benzer (Şekil 7). Alfa alt üniteler, beta alt üniteler ve miyoglobin molekülü tersiyer üniteleri bakımından da dikkate değer şekilde birbirlerine benzerler. Miyoglobin molekülü ve beta alt ünitenin içinde 8 alfa heliks yapısı vardır; alfa alt ünitesinin içinde ise sadece 7 tane alfa heliks yapısı vardır. Ayrıca miyoglobin için heliks isimlendirmeli geleneksel tanımlama, alfa alt birimindeki eksik kısa D heliks hariç tutularak hemoglobin polipeptidlerine de uygulanır. Bu görünen benzerlikler hemoglobinin ve miyoglobinin atasal olan bir proteinden evrildiğini açıklamaktadır (Eberhard, 2000; Nelson ve Cox, 2005).

	Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β		Mb	Hb α	Hb β	
NA1	-1V	1V	1V		E	--	P		L	F	F	
	--	--	H		A	--	D		E	K	R	
	L	L	L		E	--	A		F	100L	L	
A1	--S	S	T---		M	--	V		I	L	L	
	E	P	P		K	--	M		S	S	G	
	G	A	E	D7	---A	G	G---		E	H	N	
	E	D	E	E1	---S	S	N---		A	C	V	
	W	K	K		E	A	P		I	L	L	
	Q	T	S		60D	Q	K		I	L	V	
	L	N	A		L	V	60V		H	V	C	
	V	V	V		K	K	K		V	T	V	
	L	K	T		K	G	A		L	L	L	
	H	A	A	Distal His E7	H	H	H		H	A	A	
	V	A	L		G	G	G		S	A	H	
	W	W	W		V	60K	K		G19	---R	H	H---
	A	G	G		T	K	K		H	L	F	
	K	K	K		V	V	V		120P	P	G	
	V	V	V		L	A	L		G	A	120K	
A16	---E	G	---		T	D	G		D	E	E	
	A	A	--		A	A	A		F	F	F	
B1	--20D	20H	N---		L	L	F		H1	---G	T	T---
	V	A	20V		G	T	S		A	P	P	
	A	G	D		A	N	D		D	120A	P	
	G	E	E		I	A	G		A	V	V	
	H	Y	V	E19	---L	V	L---		Q	H	Q	
	G	G	G		K	A	A		G	A	A	
	Q	A	G		K	H	H		A	S	A	
	D	E	E		K	V	L		M	L	Y	
	I	A	A		80G	D	D		N	D	Q	
	L	L	L		H	D	80N		K	K	K	
	I	E	G		H	M	L		A	F	V	
	R	R	R		E	P	K		L	L	V	
	L	M	L		A	N	G		E	A	A	
	F	F	L		E	A	T		L	S	G	
	K	L	V	F1	---L	80L	F---		F	V	V	
B16	---S	S	V---		K	S	A		R	S	A	
C1	---H	F	Y---		P	A	T		140K	T	N	
	P	P	P		L	L	L		D	V	140A	
	E	T	W		A	S	S		I	L	L	
	T	T	T		Q	D	E		A	T	A	
	40L	40K	Q		S	L	L		H21	---A	S	H---
	E	T	40R	Proksimal His F8	H	H	H		K	K	K	
C7	---K	Y	F---	F9	---A	A	C---		Y	140Y	Y	
	F	F	F		T	H	D		K	141R	146H	
	D	P	E		K	K	K		E			
	R	H	S		H	L	L		H26	---L	-----	
	F	F	F		K	R	H		G			
	K	--	G		I	V	V		Y			
	H	D	D		G1	---100P	D	D---	Q			
	L	L	L		I	P	100P		153G			
	K	S	S		K	V	E					
D1	---T	H	T---		Y	N	N					

Şekil 7. Miyoglobin ve hemoglobin molekülünün a.a. dizi benzerlikleri.

1.6. Hemoglobin Varyantları

Hb varyantları, polipeptid zincirlerini kodlayan genlerdeki çeşitli mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu genlerin ekzon bölgesindeki veya bu bölge dışındaki **nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar** çeşitli Hb varyantlarının oluşumuna yol açmaktadır. Mutasyonların büyük bir kısmını nokta mutasyonları oluşturmaktadır. Delesyonlar polipeptid zincirinin kısalmasına, insersiyonlar ise uzamasına yol açmaktadır. Homolog olmayan crossing-over sonucu oluşan bazı varyantlar ise normal uzunlukta hibrit (melez) polipeptid zincirleri içermektedirler (Bunn ve Forget, 1986; Emery ve Mueller, 1992; Huisman, 1993; Huisman ve Ark, 1995).

Günümüzde yaklaşık olarak 890 civarında Hb varyantı tanımlanmıştır. Bu varyantlar; α zincir varyantları, β zincir varyantları, γ zincir varyantları, δ zincir varyantları, 2 amino asidin yer değişimiyle oluşan varyantlar, hibrit zincir varyantları, uzun zincir varyantları, delesyonlu varyantlar, insersiyonlu varyantlar, delesyon ve insersiyonlu varyantlardır. Bu varyantlardan bazıları klinik olarak önemli değildir. Bazıları ise, polimerizasyon, yüksek veya düşük O₂ afinitesi ve kararsızlık gibi anormal özelliklere sahiptir (Chui ve Ark., 1998; Hardison ve Ark., 2001).

Yaygın olarak görülen yapısal Hb varyantları; Hb S, Hb C, Hb E ve Hb D'dir. Bu varyantların hepsi β globin zincir varyantlarıdır (Ingram, 1956).

1.7. Balık Hemoglobinleri

Vertebrata hemoglobinleri kırmızı hücre ya da eritrosit denen özel hücreler de bulunur ve çekirdekli veya çekirdeksiz olabilirler. Balıkların çoğunda, eritrositler oval şekilde çekirdekli, memelilerdekinden daha büyük ve sayıları 800 bin ile 3,5 milyon/mm³ arasındadır.

Balıklarda, eritropoez (eritrosit sentezi) yumurtlama döneminde başlar ve büyük bir hücre kütlesi tarafından takip edilir. Bunların orijinleri geçişkendir, yani bunlar kırmızı hücrelerin ilkel halini oluşturur ki, ilk kez filogenetik olarak

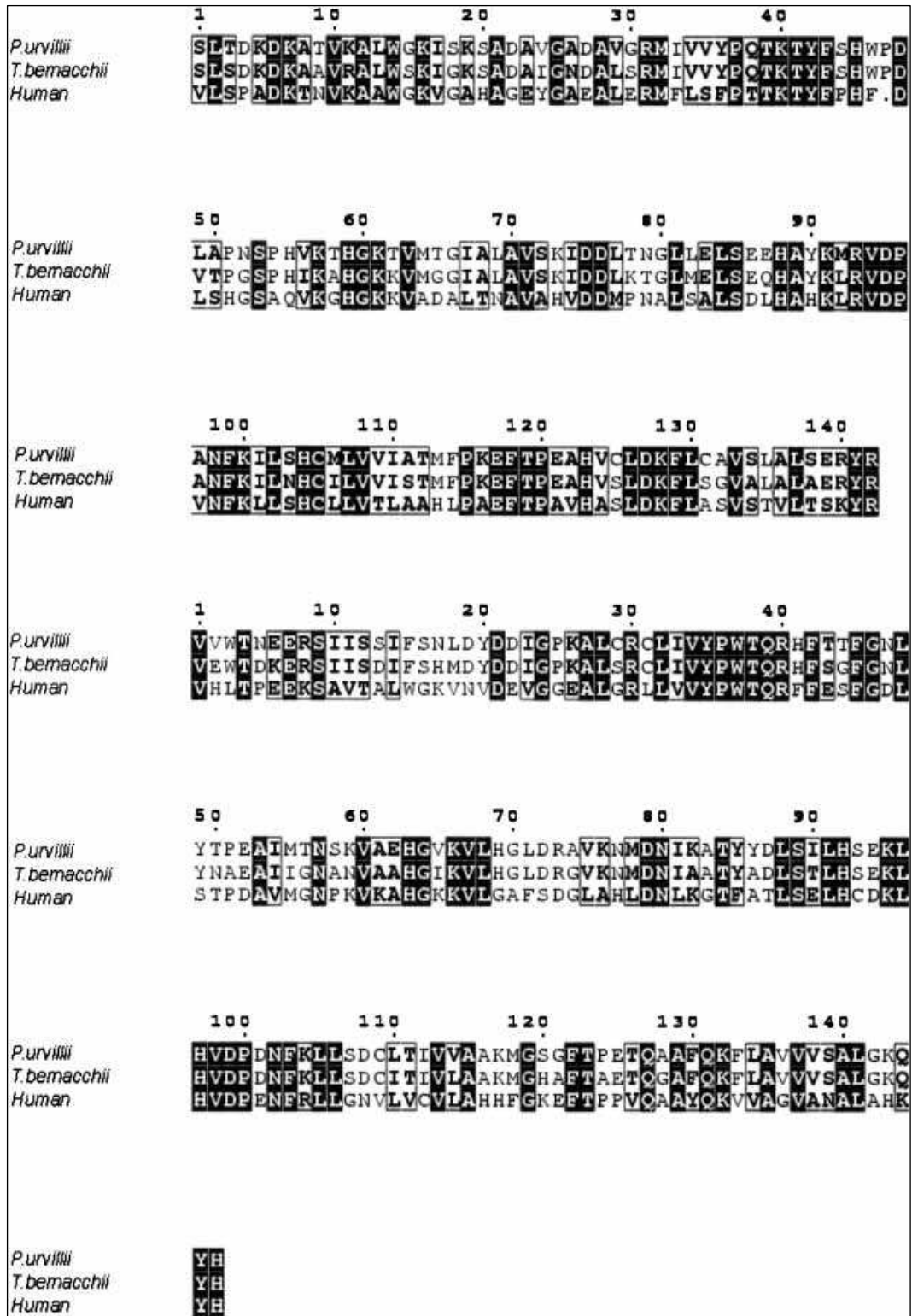
balıklarda görülmüştür ve takiben memeliler de dâhil tüm omurgalı canlılarda oluşmuştur (Şekil 8). Eritrositler, gastrointestinal dalak taslağı dokularda, dalak ve böbreklerdeki **teleostlarda** oluşturulurlar (De Young ve Ark., 1994).

Hemoglobinler, balıkta canlı ile çevre arasında bir ara yüz oluşturduğu için özellikle önemlidirler (Landini ve Ark., 2002; Schwantes, 2002). Balıklar, özellikle çok değişken bir ortamda yaşarlar, üç boyutlu değişimlere maruz kalırlar ve diğer karasal hayvanlardan sıcaklık ve oksijen açısından farklıdırlar.

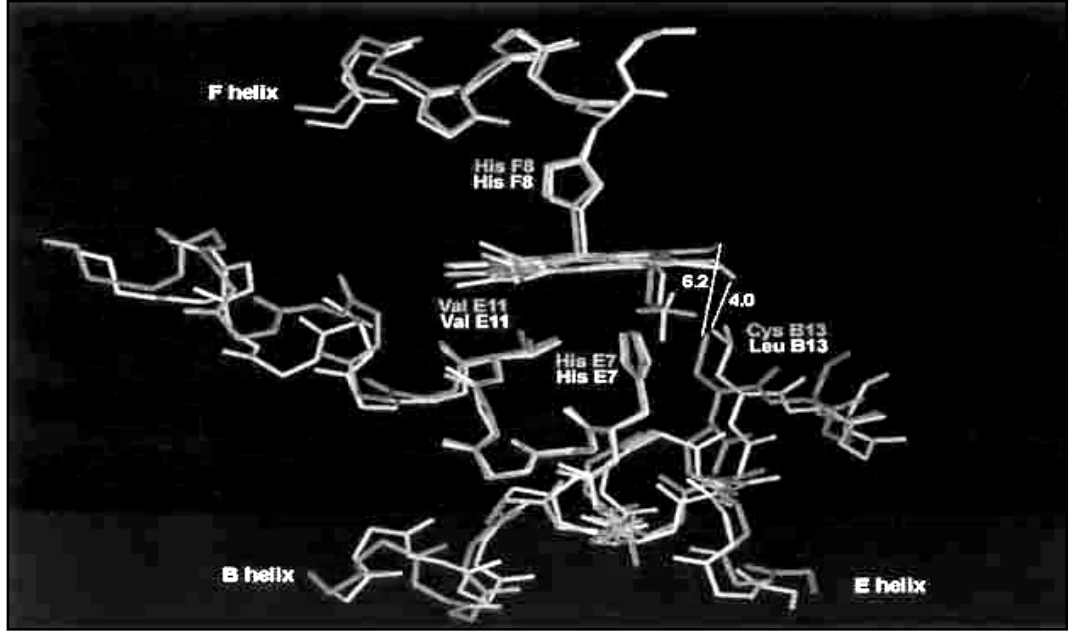
Çevresel düşük oksijen miktarına maruz kalan balıklarda bir takım çevresel ve fizyolojik adaptasyon mekanizmaları oksijen transferini kolaylaştırmaktadır. Amazondaki birçok balık türü, bu tür oksijen yetersizliğinde oksijeni direk havadan alırlar. Bu anatomik farklılaşmalar solungaçlarda, ağızda, midede, bağırsaklarda görülebilir (Val, 1996; De Oliveira ve Ark., 2002). Bu tür anatomik özelleşmeye sahip olmayan türler oksijen azlığında zorunlu olarak metabolik ve davranışsal adaptasyona gitmek zorunda kalırlar (Val, 1996; Riggs, 1979). Soluk alıp verme sıklığı ve miktarı, kalp hızı, eritrosit artışı, hematokrit ve hemoglobin konsantrasyonu, organizmadaki fosfat miktarının değişmesi, özdeş **hemoglobinlerin bulunması** ve metabolik stres bu çevresel adaptasyondan bazılarıdır.

Son birkaç yıl içinde, balık hemoglobinleri Salmonid, Catfish, Tilapia gruplarında detaylı bir biçimde çalışılmıştır. Bunun temel nedeni, bu proteinlerde tanımlanan fonksiyonel özelliklerin çokluğudur. Bu çok özelliklik bir türde gerçekleşirken, genel olarak bu türe seçici bir avantaj sağladığı varsayılabilir (Maruyama ve Ark., 2004). Bu çeşitli fonksiyonel özellikler, farklı fizyolojik ve çevresel ortamlara evrimsel adaptasyonun sonucu gelişmektedir.

Farklı balık türlerinde, izohemoglobinelere (izo-hb'ler) yaygın bir biçimde rastlanmaktadır. Bazı araştırmacılar, izo-hb'lerin varlığının adaptasyon amaçlı olduğunu savunmaktadırlar. Zira, bunlar birçok fizyolojik talepler ve çevresel oksijen kirliliği durumlarında oksijen taşıma rolünü üstlenmektedirler (Brittain, 2005).



Şekil 8. Balık hemoglobini ve insan hemoglobininin birincil yapı benzerlikleri.



Şekil 9. Balık Hb1 ve insan HbA dizilerinin içinde yer alan amino asitlerin benzerliği (açık gri HbA'yı, koyu gri Hb1'i göstermektedir).

Killifish'in (*Fundulus heteroclitus*) hemoglobinleri poliakrilamid ve nişasta jel elektroforezi ile yapılan çalışmalarda dört gözlenebilir içeriğin varlığını göstermektedir. Bu izohemoglobinlerin her biri *alfa* ve *beta* zincirler içeren tetramerlerdir ve DEAE-selülozunun iyon değişim kromatografisi yöntemiyle ayrılabilirler. İzole edilmiş hemoglobin parçaları (Hb I, II, III, IV) oksijen dengesi bakımından, Bohr etkisinde ve oksijen bağlamadaki ATP etkisinde sadece ufak farklılıklar gösterirler (Şekil 9) (Yamanaka, Yamaguchi, 1965).

Alfa a, *alfa b*, *beta a* ve *beta b* globin halkaları CM-selülozu üzerine yapılan iyon değişim yöntemiyle birbirinden ayrılabilirler. *Alfa* ve *beta* zincirleri amino asit içeriği açısından büyük farklılıklar gösterir. Bu çalışmadaki modelle 10 farklı izohemoglobin (6'sı kalıcı alt üniteler arası temasa sahip), değişik parçalardaki elektroforetik özelliklerin açıklanmasında kullanılabileceği ileri sürülmektedir.



Şekil 10. *Catfish* ve *Tilapia* türlerindeki hemoglobin bant farklılıklarının izoelektrik odaklama yöntemiyle tayin edilmesi ve bant profilleri.

Hemoglobinler balıklar için iyi bilinen bir veri kaynağıdır. IEF yöntemiyle izohemoglobinlerinin tanımlanması insanlarınkinden daha kolaydır (Şekil 10). Genellikle, katot (C) ve anotların (A) oranları yani katedral ve anodal Hb'ler artış göstermektedir (Hashimoto, Matsuura, 1960).

İzohemoglobin değişikliklerinin balıklardaki farklılıkları ile ilgili sınırlı veri bulunmaktadır. Bu yayınlardan bazılarında; 12 anodal Hb ve tek katedral Hb içeren C/A oranı, 5 anodal ve 5 katedral Hb içeren C/A oranı, 3 anodal ve 11 katedral Hb içeren C/A oranını ortaya koyan birkaç yayın vardır (Giles ve Vanstone, 1976). C/A oranları, küçük olan türlerin etkilendiğini göstermektedir. Direk olmamakla beraber, bu etkilenme göç ve çoğunluklarda çevresel durumlara bağlanabilir (Wilkins, 1985).

1.8. Balık Hemoglobinlerinin Evrimsel Süreçteki Sıcaklık Uyumları

Bilindiği gibi sıcaklık bütün biyolojik fonksiyonları etkileyen bir etmendir. Arktik ve Antarktik bölgelerde olduğu gibi zor olan çevrelerde yaşayan canlılar yüksek derecede kısıtlamalara maruz kalırlar. Bu kısıtlamalara maruz kalan Notothenioid grubu, ısısız adaptasyondan sorumlu olan fizyolojik nitelikler veya biyokimyasal karakterlerin belirlenmesi için önemli bir ayrıcalık sağlar. Soğuk adaptasyonu sürecinde, Notothenioidlerin evrimsel eğilimleri, hematolojik karakterlerin modifikasyonu dâhil olmak üzere hemoglobinlerin çeşitliliği ve miktarındaki azalmalar açısından özgün bir türleşme üretmiştir (Eastman, 1993). Antarktik Notothenioidler ılıman ve tropikal türleriyle kıyaslanır ise; indirgenmiş eritrosit miktarına, Hb yoğunluğuna ve çeşitliliğine sahip olacak şekilde evrimleştikleri görülür.

Kırk milyon yıl önce, Antarktik kıyıları bir seri tektonik ve okyanussal olaylara sahne oldu. Böylelikle balık faunasının kompozisyonu değişmeye ve yer değiştirmeye başladı (Bargelloni ve Ark., 1994). Bu olaylar arasındaki kilit nokta, Güney Amerika ve Antarktika Yarım Adası arasında, tarihi 23,5- 32,5 milyon yıl önce olarak belirlenen Drake Bağlantısı'nın açılmasıdır (Thompson, 1994). Bu olay, Notothenioid stokunu Antarktik olmayan ve Antarktik olmak üzere 2'ye böldü. Drake Bağlantısı'nın açılması, Antarktik kutup çevresi akıntısının gelişimine önderlik etti ve en azından antarktik suların soğumasından sorumlu oldu (Kennett, 1977). Su sıcaklığının düşmesi ve buzulların meydana çıkmasıyla birlikte, soğuk sulardaki yüksek oksijen yoğunluğuna bağlı olarak Notothenioidlerin pek çok türünün hemoglobinlerinin en düşük afiniteye sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca anahtar rolü oynayan Hb'nin aktif merkezindeki amino asitlerin yerleşimindeki değişikliklerde türlere yapısal bir esneklik sağladı (Bargelloni ve Ark., 1994).

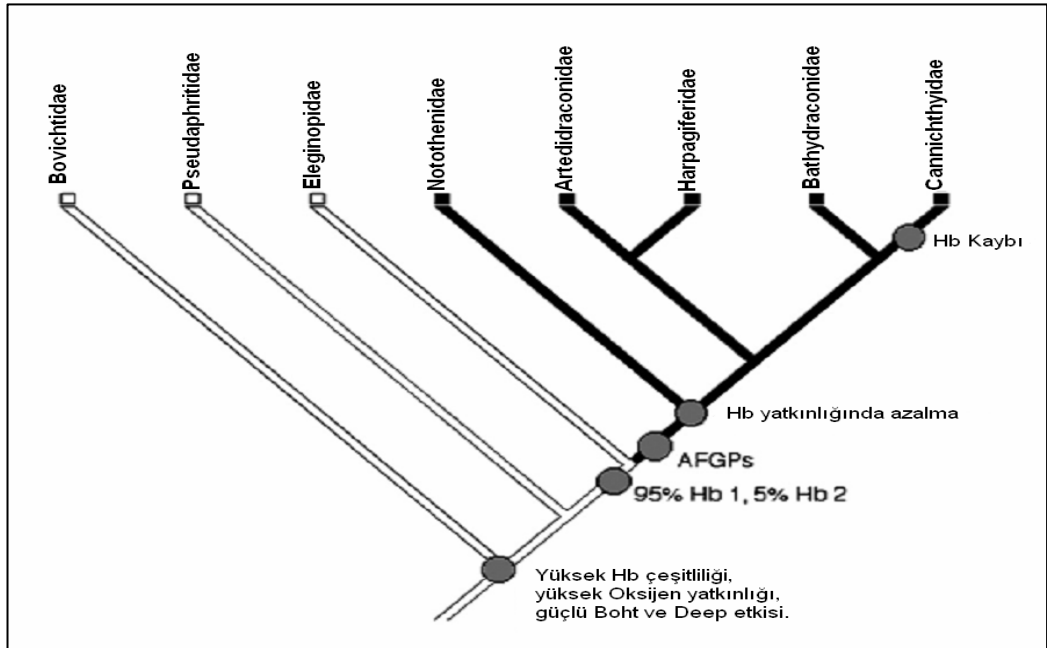
Antarktik Notothenioidler, antifiriz glikoproteinlere sahiptirler ve bu fizyolojik gereklilik, bu balıkların bugün sıcaklığı -2 C° ulaşan buzla kaplı deniz yüzeyi sularında dağılabilmelerine ve hayatta kalabilmelerine olanak sağlamıştır (Cheng ve Ark., 2003). Filogenetik olarak bu türlerden ilk olarak ayrılan 3

familyada (Bovichtidae, Pseudaphritidae, Elegendinopidae) ise bu glikoproteinler yoktur, buda bu familyaların Antarktika soğumadan önce ayrıldığını ifade eder (Balushkin, 1992; Pisano ve Ark., 1998).

Notothenioidler 8 familyadan oluşmaktadır (Şekil 11). Bu familyalardan 7'si kırmızı kanlıdır, bunun aksine Cannichthyidae familyası Hb üretme yeteneklerini kaybetmişlerdir ve onların genomu sadece DNA dizileri içerisinde sentezlenmeyen bir α -globin gen kalıntısına sahiptir.

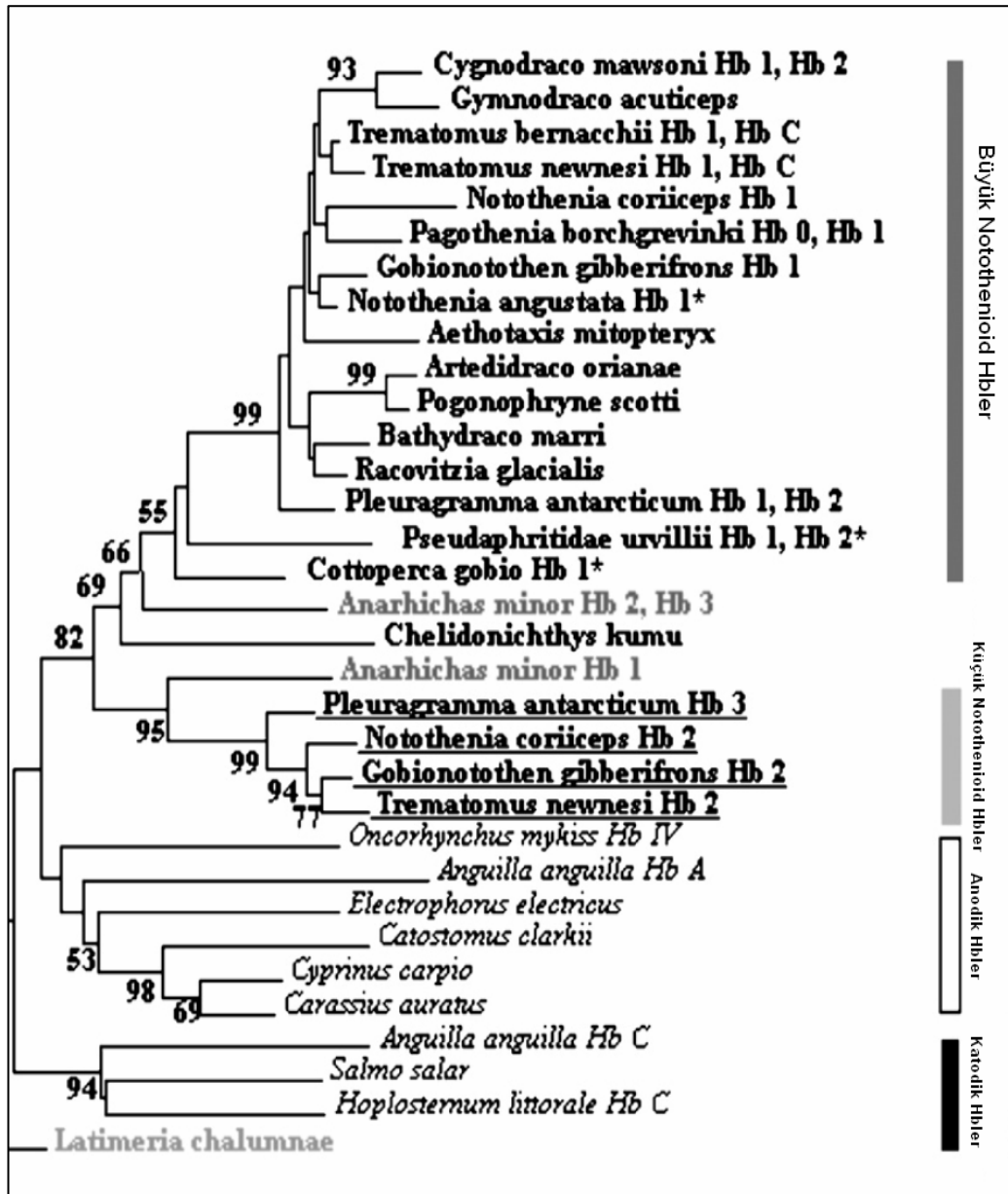
Cannichthyidae familyasında Hb ekspresyonunun eksikliğinin ve kaybının 2 mekanizma ile gerçekleştiği düşünülür. Birincisi gen delesyonu ile ikincisi ise transkripsiyonel inaktivasyonlarını kapsayan çok basamaklı bir süreç ile olduğunu göstermektedir.

Kırmızı kanlı Notothenioidlerin evrimi, ayrıca çok düşük yoğunlukta eritrosit ve farklı çeşitlerde Hb'lerin üretilmesine neden olmuştur. Bu türlerin çoğunluğu derinliklerde yaşarlar ve tek bir büyük Hb₁ ve bazen de ikinci bir küçük Hb₂ içermektedir (Şekil 12). Ayrıca Yüksek-Antarktik olan türler HbC küçük bileşen kalıntısını da içerebilirler (Di Prisco ve Ark., 1988).



Şekil 11. Notothenioidlerde, büyük ve küçük hemoglobinlerin gruptaki dağılımı.

Hemoglobinler sıcaklığa yüksek derecede duyarlıdır. Yapısal ve fonksiyonel nitelikleri, evrimsel süreç boyunca türlerin karşılaştıkları çevresel koşullara bağlı değişimleri açıklayan bir aynadır. Sonuç olarak soğuk ve soğuk olmayan sularda yaşayan balıkların hemoglobinlerinin kendi aralarında karşılaştırılması, pek çok biyolojik sorun için son derece aydınlatıcıdır (Weber, 2000).



Şekil 12. Notothenioid gruplarının Hb içerikleri.

1.9. Türkiye Balık Faunasının Tarihsel Süreci

Anadolu, Tetis denizinin kapanmasıyla şekillenen coğrafik bölgeler içinde olup, jeolojik açıdan aktif sayılan önemli bölgelerden biridir (Şengör ve Yılmaz, 1981). Tetis denizinin kapanmasıyla birlikte türleşmelerde artmaya başlamıştır (Hrbek ve Meyer, 2003; Bardakci ve Ark., 2006). Triyas'ta yani 250–205 milyon yıl önce, Dünya'da **Pangea** denen tek bir kıta bulunmaktaydı. Daha sonra bu ana kıta ikiye ayrıldı. Kuzeyde kalan kısmı Laurasia'yı, güneyde kalan kısmı ise Gondwana'yı ortaya çıkardı. İki kıtanın arasında ise, Kretase (142–65) döneminde, bütün Dünya'yı bir kuşak gibi saran ve karasal canlılar ile tatlı su canlıları için mutlak bir bariyer olan Tetis denizi meydana geldi (Şengör ve Yılmaz, 1983). Bu deniz Anadolu'yu oluşturacak kara parçasının güney kıyılarını, doğuda bugünkü Akdeniz, Suriye, Irak üzerinden geçerek Hindistan'ın doğusuna, batıda ise Mısır ve Sahra üzerinden geçerek orta Amerika'ya kadar ulaşıp Dünya'yı çepeçevre kuşatmaktaydı. Anadolu'nun güney kısımları o dönemde Gondwana'ya bağlıydı. Bu nedenle Paleotetis oluşuktan sonra Anadolu kuzeyde yer almış ve böylece güneydeki faunadan büyük ölçüde ayrı kalarak Gondwana'dan yalıtılmıştır. Anadolu'nun özellikle Miyosenin ortalarından sonra canlı formlarının Afrika elemanlarından daha çok Avrupa ve Asya elemanlarına benzemesi de bu nedendir (Demirsoy, 1999).

Triyas döneminde, Neotetis'in açılmasıyla sonuçlanan Anadolu'nun Gondwana'dan koparak ayrılması, Paleotetis'in kapanmasına neden olmuştur. Orta jura'da Neotetis'in kapanmasını izleyen evrede çarpışan kıtalar birbirine doğru yaklaşmaya devam etmişlerdir. Kretase sonunda ve erken Oligosen sırasında Tetis, birkaç bin kilometre genişliğinde olup, Hint Okyanusu'ndan Akdeniz'e kadar uzanıyordu. Bu şekilde Tetis denizinin etrafı kuşatılmış olup, tatlısu balıkları için bir bariyer durumundaydı. Oligosen'de Anadolu'yu oluşturan kara parçası hemen deniz seviyesinin altındaydı ve büyük bir olasılıkla birkaç küçük adadan oluşuyordu. Oligosen'in sonuna doğru önemli bir değişiklik ortaya çıkmıştır. Tetis kuzeye doğru Paratetis denen bir kol meydana getirmiştir. Paratetis ile Tetis arasında Alp Sıradağları yükselmeye başlamıştır; fakat arada bir

bağlantı devam etmektedir. Diğer taraftan Anadolu, bir kara köprüsüyle Avrupa kıtasına bağlıydı.

Oligosen'de (36–24) dağ sıralarına bağlı olarak yükselme nedeniyle Anadolu'nun hemen her yerinden deniz geri çekilmeye başlamıştır (Demirsoy, 1999). Anadolu o günden bu yana yükselmesini sürdürmektedir ve denizin daha gerilere çekilmesiyle, Paratetis okyanusundan ayrılmaya devam etmiştir. Paratetis'in kuzey ve batı kısımları karaya dönüşür; doğu kısımları ise iç deniz haline geçer. Bu iç deniz daha sona Kara Deniz, Hazar Deniz'i ve Aral Gölü'nü oluşturmuşlardır. İç deniz haline geçenler yağışın bol olması nedeniyle bir zaman sonra kısmen tatlısı ve büyük ölçüde acısu gölleri haline dönüşür (Demirsoy 1999). Tetis Denizi'nin kapanması zoocoğrafik açıdan önemli olan bariyerlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Hrbek ve Meyer, 2003).

1.10. Çalışılan Balık Örneklerinin Alındığı Yer Özellikleri

Bu çalışmada Van Gölü, Sivas Kangal Balıklı Kaplıcaları Topardıç Dere'si, Sivas Tödürge Gölü ve Sivas Şarkışla ilçesi sınırlarında bulunan küçük bir gölden farklı çevresel koşullara uyum sağlamış *Cyprinidae* familyasına ait cins gruplarındaki bireylerin hemoglobün molekülleri arasında fark olup olmadığına bakılması hedeflenmiştir. Bu alanlardaki suların özellikleri birbirlerinden farklılık gösterir.

Van Gölü, Türkiye'nin en büyük gölüdür. Suları yüksek derecede sodalı ve tuzludur. Bu su yapısı göle bir "soda gölü" özelliği kazandırmaktadır. Göl suyunun pH değeri 9,5 civarındadır. Tuzluluğu ise % 0.19 olarak bildirilmektedir (Kempe ve Ark., 1978). Denizlere göre daha fazla potasyum ve lityum içerir. Göl suyundaki karbonat ve bikarbonat iyonları toplam klorür iyonundan fazla olup deniz suyuyla karşılaştırıldığında karbonat iyonları 100 kat fazladır. Sülfat yoğunluğu ve fosfat iyonu denizlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Suyun kimyasal içeriği şu şekildedir; sodyum 7747 mg/L, potasyum 508 mg/L, magnezyum 94,8 mg/L, kalsiyum 5-10 mg/L, klor 5450 mg/L, karbonat 3331 mg/L, sülfat 2344 mg/L, bikarbonat 2191 mg/L, fosfat 0,52 mg/L, çözülmüş

oksijen 10,94mg/L'dir (Degens ve Ark., 1978). Göle dökülen akarsuların kimyasal özellikleri geçtikleri arazinin yapısına bağlı olarak değişmektedir. Akarsularda sodyum en önemli katyon olup, bunun bir kısmı bikarbonat ile dengelenerek Van Gölü'nün bir soda gölüne dönüşmesinde ana rolü oynamaktadır. Bu sebeple göldeki biyolojik çeşitlilik oldukça sınırlıdır. Gölün bu ekstrem su kalitesinde yaşamaya alışmış endemik tek balık türü *Chalcalburnus tarichi* (inci kefali) dir (Degens ve Ark., 1978).

Sivas Şarkışla Gölüne ait fazla bilgi bulunmamaktadır. Ancak, *Cyprinus carpio* örnekleri alınırken suyun özelliği ve pH değeri hakkında bilgiler edinilmiştir. Göl sazlıklaşmaya başlamış oksijen miktarı azalmış ve balçıklaşmış bir haldedir. Suyun pH 6–7 olarak belirlenmiştir.

Sivas Kangal Balıklı Kaplıcaları, izotermal olup yıl boyunca sıcaklığı yaklaşık (ort.) 35C°, berrak, kokusuz, aktığı yerde hiçbir çökelti bırakmamaktadır. pH'sı 7,2 olan ve içerisindeki suyun litresinde 1gr bulunan selenyum bu kaplıcaları dünyada eşinin bulunmadığı bir alan haline getirmiştir. Topardıç Deresi'nden *Garra rufa* ve *Cyprinion macrostomus* örnekleri alınmıştır.

Sivas Tödürge Gölü, Türkiye'nin en büyük karstik çöküntü gölüdür (Atiker,1993). Suyu alkali özelliklerde olmakla birlikte pH'sının yıllık ortalaması 8,2 civarındadır. Bu gölden *C.carpio* örnekleri alınmıştır. Suyun diğer özellikleri; fosfat 46,7 µg/L, nitrat 0,56 mg/L, sülfat 311 mg/L, kalsiyum 489 mg/L, sıcaklık ortalama olarak ilkbahar aylarında 15–19 C°, yaz aylarında 23–26 C°, sonbahar aylarında 13–15 C°, kış aylarında 4–10 C° arasındadır (Kılınç ve Ark., 2007).

Sivas Tecer Dağ'ı pınar kaynağından *Oncorhynchus mykiss* örnekleri toplanmıştır. Yapılan pH ölçümlerinde pH 7,2–7,5 olarak bulunmuştur. Suyun diğer özellikleri; sıcaklık 10,1 C°, katyon miktarları Na⁺ 0,2 Meq/L, K⁺ 0,005 Meq/L, Ca⁺⁺ 1,5 Meq/L, Mg⁺⁺ 0,9 Meq/L, anyon miktarları HCO₃ 1,9 Meq/L, Cl 0,26 Meq/L, SO₄⁻ 0,39 Meq/L (Ekemen, 2001)

2. METARYAL METOT

2.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada 5 farklı istasyon seçilmiştir; Tödürge Gölü'nden *Cyprinus carpio*'dan 17, Van Gölü *Chalcalburnus tarichi* (inci kefali)'den 13, Şarkışla ilçe sınırlarında bulunan gölden *Cyprinus carpio*'dan 12, Kangal balıklı kaplıcasından *Cyprinus macrostomus* (beni balığı) türüne ait 10 ve *Garra rufa* (yağlı balık) türüne ait 10 örnek. Kontrol grubu olarak ise Sivas Tecer Dağı su pınarından 10 adet *Oncorhynchus mykiss* balığı toplanmıştır. Tüm balık gruplarına ait olarak toplam 72 örnek toplanmış ve balıkların solungaç bölgesi kesilerek daha önce laboratuvar koşullarında hazırlanan (antikoagülant) 0.1M EDTA çözeltisiyle birlikte enjektör vasıtasıyla kanları alınıp steril (EDTA'lı) tüplerde saklanmışlardır. Tüpler soğuk ortam olarak termos ile muhafaza edilerek laboratuvara getirilip -20 C° olan dolapta saklanmışlardır. Ayrıca bu türler ile karşılaştırma yapabilmek için kontrol (dış grup) olarak Sivas Tecer Dağ pınarından 10 adet *Oncorhynchus mykiss* örneği, alabalık yetiştiricilerinden canlı olarak temin edilmiştir.

Balık örnekleri; Balık Kepçe, dip oltası ve serpmeye yardımıyla toplanmıştır.

2.2 Laboratuvar Uygulamaları

2.2.1. Kandan Hemoglobin İzolasyonu (Hemolizat Hazırlanması)

Kan hücreleri plazma içinde bulunurlar. Kanın bir antikoagülant ile pıhtılaşması engellendikten sonra kanı santrifüj edersek üstte kalan sarımtırak sıvı plazmayı oluşturur. Çöktürme işleminden sonra tüpün alt kısmında hücre tabakaları görülür. Ağırlıkları nedeni ile alyuvarlar en alttadır ve en fazla olan hücre tabakasıdır. Bunun üzerinde ince beyaz bir tabaka halinde akyuvar tabakası görülür. Ayrıca çok miktarda kan ile çalışıldığında en üstte inci taneleri gibi trombositlere de rastlanılabilir. Bu üst katmanlar dikkatlice pipet yardımıyla alınmıştır. Aşağıdaki yöntemlerde açıklandığı şekilde, kandan hemoglobin proteini saflaştırılmıştır.

Daha sonra örnekler spektrofotometre cihazı ile Bradford Assay metodu kullanılarak Hb protein miktar tayini yapıldı (Bollag ve Ark., 1996). Bulunan absorbasyon ve konsantrasyon miktarları tezin sonuna EK-1 olarak konuldu.

2.2.1.1. Kullanılan Kimyasalların Listesi

- Antikoagülanlı kan örneği
- % 0.9 NaCl veya 1x Retik Salin (NaCl, KCl, MgCl₂)
- Distile su
- Toluen

2.2.1.2. Deneyin Yapılışı

- 1 ml EDTA'lı kan örneği alınarak, 3000 rpm'de 5' santrifüj edilip üstteki plazma kısmı pipet ile uzaklaştırılmıştır.
- Kan örneği üç kez serum fizyolojik ile yıkandı.

Yıkama İşlemi: Örnek üzerine 1x Retik salin ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. Ardından 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı aspire edildi.

- Çöktürme işleminden sonra altta kalan alyuvar tabakası üzerine 1,5 katı distile su ve yarısı kadar da toluen ilave edildi.
- 8 dakika elle çalkalandı.
- 20 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi.
- Aradaki berrak kısım mikropipetle dikkatlice alındı.
- Alınan berrak kısım -20 C° olan dolapta muhafaza edildi.

2.2.2. Dikey Tabaka Doğal-PAGE jel Uygulaması

2.2.2.1. Bilgi

Doğal jel elektroforezinde proteinler moleküler ağırlıklarına göre denatüre olmadan ayrılırlar. Bir jel hazırlamak için 2 farklı faz oluşturulur. Bunlardan birincisi ayrıştırma, ikincisi ise toplama jelidir. Bu fazların pH'ları birbirlerinden

farklılık gösterir. Proteinler pH'sı 8,8 olan ayrıştırma jelinde moleküler ağırlıklarına göre bant profilleri oluştururlar. Elektroforez tamponu Doğal-PAGE uygulamaları için pH 8,8 olarak ayarlanır. Genelde proteinler hakkında temel bilgiler sağlamak amacıyla uygulanırlar. Bu çalışma Bollag ve Ark., (1996)'nın "Protein Methots" adlı kitabında yer alan Doğal-PAGE protokolü modifiye edilerek hazırlanmıştır.

2.2.2.2. Kullanılan Ekipmanlar

- Tabaka Jel elektroforez sistemi
- 20 x 20 elektroforez camları
- Güç kaynağı
- Pipetler
- Mikro enjektör
- Enjektörler
- Boyama kapları

2.2.2.3. Kullanılan Kimyasallar

- Akrilamid
- Bis-akrilamid
- Tris
- HCl
- Amonyum persülfat
- TEMED
- Glisin
- Gliserol
- Bromfenol blue
- Coomassie blue R-250
- Methanol
- Glacial asetik asit

2.2.2.4. Çalışma Solüsyonları

1. Solüsyon A : (%29 akrilamid, %1 bis-akrilamid 100 ml)

- 29 g Akrilamid
- 1 g Bis-akrilamid
- Hacim 100 ml oluncaya kadar distile su ile tamamlandı.
- Kapağı sıkıca kapatılıp soğuk ortamda saklandı. Polimerize olmayan akrilamid kanserojendir ve solunmamalıdır.

2. Solüsyon B: (4x ayırma tamponu,100 ml 1,5 M Tris-HCl)

- 18,2 g Tris 40 ml distile suda çözündürüldü.
- 1M HCl ile pH: 8,8 yapıldı.
- Hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

3. Solüsyon C: (4x düzenleme tamponu,100 ml 0,5 M Tris-HCl)

- 6 g Tris 40 ml distile suda çözündürüldü.
- 1M HCl ile pH: 6,8 yapıldı.
- Hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

4. %10 Amonyum Persülfat: (5 ml)

- 0,5 g Amonyum persülfat
- 5 ml distile su içerisinde çözündürüldü.

5. Elektroforez Tamponu: (1litre)

- 3 g Tris25 mM
- 14,4 g Glisin.....192 mM
- 1M HCl ile pH: 8,8 yapıldı.
- Hacim 1litre oluncaya kadar distile su eklendi.

6.5x Yükleme Tamponu: (10 ml)

- 3,1 ml 1M Tris-HCl (pH:6,8).....312,5 mM
- 5 ml Gliserol.....%50
- 0,5 ml %1 Bromfenol blue.....%0,05
- 1.4 ml distile su konuldu.

7. Coomassie Blue Boyama Solüsyonu: (1 litre)

- 1 g Coomassie blue R-250
- 450 ml Methanol
- 450 ml distile su
- 100 ml Glacial asetik asit
- Whatman No.1 kâğıdı ile süzüldü.

8. Coomassie Blue Berraklaştırma Solüsyonu: (1 litre)

- 100 ml Methanol
- 100 ml Glacial asetik asit (G.A.A)
- 800 ml distile su konuldu.

9. %1 Bromfenol Blue: (w/v, 10 ml)

- 100 mg Bromfenol blue
- 10 ml distile su konuldu.

2.2.2.5. Jellerin Hazırlanması

1. % X'lik Ayırıştırma Jelinin Miktarının Hesaplanması

Solüsyon A X / 3 ml

Solüsyon B 2,5 ml

Distile su (7,5 – X / 3) ml

%10 Amonyum persülfat50µl

TEMED5µl

2. Ayırıştırma Jelinin Hazırlanması (%8)

4,8 ml distile su 4,8 x 3 = 14,4 ml

2,7 ml Solüsyon A 2,7 x 3 = 8,1 ml

2,5 ml Solüsyon B 2,5 x 3 = 7,5 ml

50µl Amonyum persülfat.....50 x 3 = 150 µl

5µl TEMED5 x 3 = 15 µl

Total hacim 30 ml enjektör yardımı ile iki cam arasına döküldü. Jel döküldükten sonra üzerine 2 ml distile su yavaşça pipet yardımıyla konuldu ve 40 dk polimerleşmesi için bekletildi. Jel polimerleştikten sonra üzerindeki su enjektör ile alındı.

3. Toplama Jelinin Hazırlanması (%5)

2,3 ml distile su

0,67 ml Solüsyon A

1 ml Solüsyon C

30 µl Amonyum sülfat

5 µl TEMED

Total hacim 4 ml pipet ile polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine dökülerek 20 dişli tarak hava kabarcığı kalmaması için 45° açı ile yerleştirilip tarak tekrar düz konuma getirildi ve 1 saat bekletildi. Polimerleşen jeller elektroforez tankına alınarak taraklar tampon ortamında çıkarıldı.

2.2.2.6. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

- Dondurulmuş örnekler oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra 15 µl alınarak 5 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı. Hazırlanan örnekler jelin oyuklarına mikropipet aracılığı ile yüklendi.
- Zaman kaybetmeden elektroforez güç kaynağına bağlandı. 200-300 V 30 mA olacak şekilde örnekler bir gece yaklaşık 15 saat yürütüldü.

2.2.2.7. Jellerin Boyanması

- Jeller boyama kaplarına dikkatlice çıkarıldı.
- Hazırlanmış olan coomassie blue R-250 boyama solüsyonu jeller içerisine tamamen gömülecek şekilde dökülerek 15-30 dk (jellerin kalınlığına göre) bekletildi.

- Daha sonra bantların görünür hale gelebilmesi için bir gece jeller berraklaştırma solüsyonunda bekletildi.

2.2.3. Dikey Tabaka SDS-PAGE Jel Uygulaması

2.2.3.1. Bilgi

SDS-PAGE elektroforez uygulaması Doğal-PAGE uygulamasından farklı olarak jelin içerisinde ve tamponda SDS deterjanı içerir. Bu SDS deterjanı, proteinlerin denatüre olmasını sağlayarak monomer zincirlerine ayırır. Ayrıca SDS proteinin monomer alt ünitelerini (-) yükle yükleyerek düzgün bir yapı kazanmalarını sağlar. Elektroforezin çalışma prensibi, elektrik alanında proteinlerin moleküler büyüklüklerine göre ayırma (yük/kütle) esasına dayanır. Bu çalışma Bollag ve Ark., (1996)'nın "Protein Methods" adlı kitabında belirtilen SDS-PAGE protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır.

2.2.3.2. Kullanılan Ekipmanlar

- Tabaka Jel elektroforez sistemi
- 20 x 20 elektroforez camları
- Güç kaynağı
- Pipetler
- Mikro enjektör
- Enjektörler
- Ependorf santrifüj
- Su banyosu
- Karıştırıcı
- Boyama kapları

2.2.3.3. Kullanılan Kimyasallar

- Akrilamid
- Bis- akrilamid
- Tris
- SDS
- Amonyum persülfat
- TEMED
- 2-Merkaptoethanol
- Glisin
- Gliserol
- Bromfenol blue
- HCl
- Coomassie blue R-250
- Methanol
- Glacial asetik asit
- Sukroz

2.2.3.4. Stok Solüsyonlar

1. 2 M Tris-HCl: (100 ml pH:8,8)

- 24,2 g Tris
- 1M HCl ile pH: 8,8 yapıldı.
- Hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

2. 1 M Tris-HCl: (100 ml PH:6,8)

- 12,1 g Tris
- 1M HCl ile pH: 6,8 yapıldı.
- Hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi..

3. %10 SDS Çözeltisi : (w/v, 100 ml)

- 10 g SDS
- Hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

4. %50 Gliserol: (v/v, 100 ml)

- 50 ml %100 Gliserol
- 50 ml distile su konuldu.

5. %1 Bromfenol Blue: (w/v, 10 ml)

- 100 mg Bromfenol blue
- 10 ml distile su konuldu.

2.2.3.5. Çalışma Solüsyonları

1. Solüsyon A: (%29 akrilamid, %1 bis-akrilamid 100 ml)

- 29 g Akrilamid
- 1 g Bis-akrilamid
- Hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

2. Solüsyon B: (4x ayrıştırma jel tamponu, 100 ml)

- 75 ml stok 2 M Tris-HCl (pH:8,8).....1,5 M
- 4 ml %10 SDS%0,4
- 21 ml distile su konuldu.

3. Solüsyon C: (4x toplama jel tamponu, 100 ml)

- 50 ml stok 1 M Tris-HCl.....0,5 M
- 4 ml %10 SDS%0,4
- 46 ml distile su konuldu.

4. Amonyum Persülfat: (5 ml)

- 0,5 g Amonyum persülfat
- 5 ml distile su içerisinde çözüldü.
- Bir ay buzdolabında saklanabilir.

5. Elektroforez Tamponu: (1 litre pH: 8,3)

- 3 g Tris.....25 mM
- 14,4 g Glisin.....192mM
- 1 g SDS.....%0,1

6. 5xYükleme Tamponu: (10 ml)

- 0,6 ml 1 M Tris-HCl (PH: 6,8).....60 mM
- 5 ml %50 Gliserol.....%25
- 2 ml %10 SDS.....%2
- 0,5 ml 2-Merkaptoethanol.....14,4 mM
- 1 ml %1 Bromfenol blue.....%0,1
- 0,9 distile su konuldu.

7. Coomassie Boyama Solüsyonu: (1 litre)

- 1 g Coomassie blue R-250
- 450 ml Methanol
- 450 ml distile su
- 100 ml Glacial asetik asit
- Whatman No 1 kâğıdı ile süzüldü.

8. Coomassie Berraklaştırma Solüsyonu: (1 litre)

- 100 ml Methanol
- 100 ml Glacial asetik asit
- 800 ml distile su konuldu.

2.2.3.6. Jellerin Hazırlanması

• **Toplama Jelinin Hazırlanması (%5)**

Sukroz gradientli SDS-PAGE jeli döküldüğü zaman %8'lik jel için 0,6g sukroz, %12'lik için 0,935g sukroz kullanılmıştır. Ayrıca, dökülen jel yoğunluğuna göre sukroz miktarı temel olan oran üzerinden doğru orantı yolu ile hesaplanmıştır.

Tablo 1. Toplama jelinin hazırlanması için gereken kimyasal bileşenlerin, toplam miktara ve %5 oranına göre ayarlanması için gereken miktarlarının gösterilmesi

Bileşenler	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Distile su	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Solüsyon A	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
Solüsyon C	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
%10 APS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01
%10 SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1

- **%X Ayırıştırma Jel Miktarının Hesaplanması**

Tablo 2. Ayırıştırma jelinin hazırlanması için gereken kimyasal bileşenlerin, istenen toplam (ml) miktara ve istenen %X oranına göre ayarlanması gereken miktarlarının gösterimi

Bileşenler (10 ml)	%6	%8	%10	%12	%15
Distile su	5,3	4,6	4,0	3,3	2,3
Solüsyon A	2,0	2,7	3,3	4,0	5,0
Solüsyon B	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
%10 Amonyum persülfat	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,008	0,006	0,004	0,004	0,004
%10 SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Bileşenler (20 ml)	%6	%8	%10	%12	%15
Distile su	10,6	9,3	7,9	6,6	4,6
Solüsyon A	4,0	5,3	6,7	8,0	10,0
Solüsyon B	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
%10 Amonyum persülfat	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,016	0,012	0,008	0,008	0,008
%10 SDS	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

2.2.3.7. Jellerin Dökülmesi ve Polimerleştirilmesi

Dökülmesi kararlaştırılan ayrıştırma jelinin yüzde miktarı hesaplandı. Ayrıştırma jelinin applike edilmesi için 50 ml olan erlen içerisinde solüsyon A, solüsyon B, %10 SDS, amonyum persülfat ve TEMED konulduktan sonra enjektör ile alınarak hızlı bir şekilde, hazırlanan camlar arasına applike edildi. Jelin üst yüzeyinin dalgalanmaması için üzerine distile su yavaşça pipet ile konuldu ve polimerleşme için 45 dakika beklenildi. Polimerize olan jelin üzerindeki su tabakası enjektör ile dikkatlice üzerinden alındı. Daha sonra ilk jelin hazırlanmasından farklı olarak Solüsyon B yerine Solüsyon C solüsyonu kullanılarak %5'lik ayrıştırma jelinin ¼ 'ü kadar olacak şekilde toplama jeli applike edildi. 20 oyuklu tarak toplama jelinin içerisine gömüldü ve polimerleşme için 1 saat beklenildi. Polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra jeller elektroforez tankına yerleştirilerek taraklar tampon içerisinde çıkarılarak jeller yükleme için hazır hale getirildi.

2.2.3.8. Örneklerin Yüklmesi ve Yürütülmesi

- Örneklerden 20 µl alınarak 5 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı.
- 1 dk santrifüj edildi.
- 85° C olan su banyosunda 5 dk süre ile denatüre edildi.
- Hazırlanan örnekler jelin oyuklarına mikropipet aracılığı ile yüklendi.
- 200–300 V 40 mA olacak şekilde örnekler bir gece yaklaşık 15 saat yürütüldü.

2.2.3.9. Jellerin Boyanması

- Jeller boyama kaplarına dikkatlice çıkarıldı.
- Hazırlanmış olan Coomassie blue R-250 boyama solüsyonu jeller içerisine tamamen gömülecek şekilde dökülerek 15–30 dk (jellerin kalınlığına göre) bekletildi.

- Daha sonra bantların görünür hale gelebilmesi için bir gece jeller berraklaştırma solüsyonunda bekletildi.
- Ayrıca tam olarak boyanın alınamaması durumunda jel yoğunlukları değişen (%50, %25) alkol çözeltilerinde kısa süre çalkalandı.
- Bant profilleri incelendi.

2.2.4. Tüplü Jel Sistemi ile İzoelektrik Odaklama

2.2.4.1. Bilgi

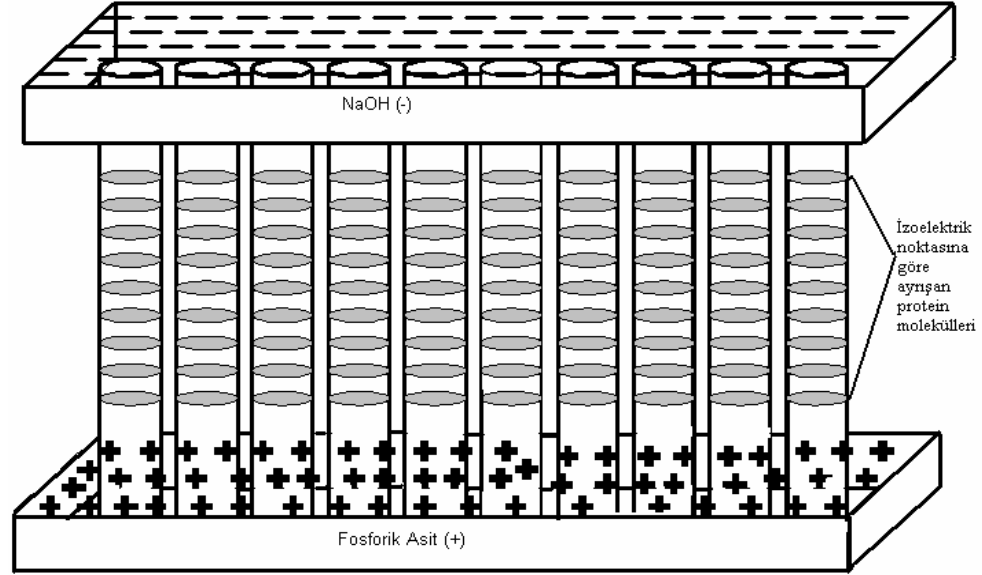
İzoelektrik odaklama (IEF) jel elektroforez tekniği proteinleri yüklü amfolit varlığında (pH 3,5–10) net yüklerine göre ayırma prensibine dayalı çalışır. Proteinler, yapısında bulunan amino asitlerin yüklerine göre izoelektrik pH'da toplanırlar ve disk görüntüsü oluştururlar. Bu gerekli olan ayrışmayı sağlamak için pH'sı farklı asidik ve bazik özellik gösteren iki farklı tampon kullanılır. IEF sistemi proteinlerin ayrıştırılmasında en etkili ve kesin sonuçları vermesi bakımından tercih edilir. Verimli bir ayrışma için yüksek Volt verebilen güç kaynaklarının kullanılması gerekir (Şekil 13).

Bu çalışma Bollag ve Ark., (1996)'nın "Protein Methods" adlı kitabında belirtilen IEF protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Ayrıca çözünürlüğü düşük olan proteinlerin çözünürlüğünü artırmak, protein alt ünitelerini tümünden denatüre ederek alt ünitelerine ayırmak ve net yükünü artırmak için deneysel ortama protokolda belirtildiği gibi 6–8 M arasında üre ilave edilmiştir.

2.2.4.2. Kullanılan ekipmanlar

- Tüplü Jel elektroforez sistemi
- 2.5 mm çapında 15 cm uzunluğunda cam tüpler
- Sıcaklık ayarlayıcı
- 500 V 100 mA Güç kaynağı
- Mikropipetler

- Enjektörler
- Boyama kapları



Şekil 13. IEF yöntemi için uyarlanan disk-PAGE sisteminin şematik gösterimi.

2.2.4.3. Kullanılan Kimyasallar

- Akrilamid
- Bis- akrilamid
- Amonyum persülfat
- TEMED
- Üre moleküler saflıkta
- Amfolit Çözeltisi (pH 3,5-10)
- Fosforik asit
- Sodyum hidroksit (NaOH)
- Potasyum Klorür (KCl)
- Trikloroasetik asit (TCA)
- Coomassie blue R-250
- Methanol

- Glacial asetik asit

2.2.4.4. Çalışma Solüsyonları

1. Solüsyon A: (100 ml)

- 29,2 g Akrilamid
- 0,8 g Bis-akrilamid
- Hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

2. %10 Trikloroasetik asit: (100 ml)

- 10 ml Trikloroasetik asit
- 90 ml distile su konuldu.

3. 10 mM Potasyum klorür: (100 ml)

4. %10 Amonyum Persülfat: (5 ml)

- 0,5 g Amonyum persülfat
- 5 ml distile suda çözündürüldü.

5. Elektroforez Tamponları

- Üst tampon 20 mM sodyum hidroksit (NaOH)
- Alt tampon 10 mM fosforik asit
- Taze ve jeller yüklenince hazırlandı.

6. Coomassie Blue Boyama Solüsyonu: (1 litre)

- 1 g Coomassie Blue R-250
- 450 ml Methanol
- 450 ml distile su
- 100 ml Glacial asetik asit
- Whatman No 1 kâğıdı ile süzüldü.

7. Coomassie Berraklaştırma Solüsyonu: (1 litre)

- 100 ml Methanol
- 100 ml Glacial asetik asit
- 800 ml distile su konuldu.

2.2.4.5 Jellerin Hazırlanması

5,4 mlDistile su
2,0 ml Solüsyon A
48 µl Amfolit çözeltisi (pH: 3,5–10)
6 g Üre (moleküler saflıkta)
25 µl % 10 Amonyum persülfat
20 µl TEMED

Cam tüpler aplikatörüne yerleştirildikten sonra konulacak olan üre miktarı ısıtılmış distile su içerisinde çözündürülerek üzerine solüsyon A, amfolit çözeltisi ve klasik örnek yüklemesinden farklı olarak hemoglobin örneği direk olarak jel karışımının içerisinde yukarıda verilen oranlarda konulmuştur. Bu karışım enjektör ile aplikatöre monte edilerek birleşik kap modeliyle applike edildi ve 15 dakika polimerleşme için bekletildi. Hafif polimerize olan tüpler elektroforez tank kabinine monte edilerek üst tampon tüpler içerisinde gömülecek şekilde ilave edildi. Tüplerin üst kısmında kalan hava boşluğu ise üste konulan tampon çözeltisinden pipet ile alınarak tüplerin içerisinde enjekte edilmesi ile giderildi.

Cihaz güç kaynağına bağlanarak ilk bir saat 300V 15 mA ve diğer 2.5 saat ise 500 V 5–8 mA olacak şekilde örnekler 40C^o sıcaklıkta sirkülasyon soğutmalı banyo eşliğinde 3,5–4 saat yürütüldü.

2.2.4.6. Jellerin Boyanması

Jeller uzun uçlu iğne yardımıyla, iğnenin jel etrafında dikkatlice gezdirilmesi ile oluşan boşluğa su verilerek uygun bir kap ortamına kırılmadan çıkarıldı. Jel yoğunluğu düşük olduğundan bu işlem normal uygulamaya göre daha kolay gerçekleştirildi.

- Tüplerden çıkarılan jeller 10 mM KCl' de 30 dakika amfolitlerin uzaklaştırılması için bekletildi. Çözeltinin pH'sı belirlendi.

- Distile suda çalkalanana jeller % 10'luk TCA çözeltisinde, jelde bulunan proteinlerin yüklerini bloklamak için, 10 dakika bekletildi.
- 30 dakika Coomassie Blue R-250 boyama solüsyonunda bekletildi.
- Boyanın tekrardan giderilmesi ve bantların görünür hale gelmesi için bir gece jeller berraklaştırma solüsyonunda bekletildi.
- Çıkan bantların fotoğrafları çekildi ve grafik kâğıdı ile milimetrik olarak yerleri tayin edildi.

2.3. Verilerin Değerlendirilmesi

IEF yöntemi ile bulunan bant profil mesafeleri pH metre çizelgesine göre belirlendi (Katsuhiko, 1973). pH metre çizelgesi şu şekilde hazırlandı. Kullanılan amfolit çözeltisinin pH aralığına göre (3,5-10) her bir pH artışı 1 cm olacak şekilde 6,5 cm'lik cetvel oluşturuldu. Bu 6,5 cm'lik cetvel ile 10 cm'lik resimlerin aynı noktalarda olması için cetvel 10cm olacak şekilde Word belgesinde büyütüldü. Cetvel aralıkları orantı yoluyla da belirlenebilir, ancak orantı ile bulunan rakamlardaki bindelik ve yüzdeler oynamalar pH metrenin yaklaşık 0,5 cm sapmasına neden olmaktadır.

IEF yöntemi ile elde edilen bant profillerinin, aynı tür için karşılaştırmaları yapılırken toplu olarak resimlerin çekilmesi sırasında bazı kaymalar meydana gelmiştir. Buda değişik bir bant profili gibi görülen yanıltıcı bir izlenim vermiştir.

IEF yöntemi ile elde edilen jellerin boyanması sırasında ilk basamak olan KCl'de bekletme işleminden sonra çözeltinin pH'sı ölçülmüş ve 7-8 arasında bulunmuştur.

Verilerin değerlendirilmesinde bant profillerine numaralar verilmiş ve bu numaralara göre pH tabloları oluşturulmuştur. Aynı şekilde SDS ve Doğal-PAGE uygulamaları içinde bantlara numara verilmiş ve değerlendirme bu numaralar üzerinden yapılmıştır.

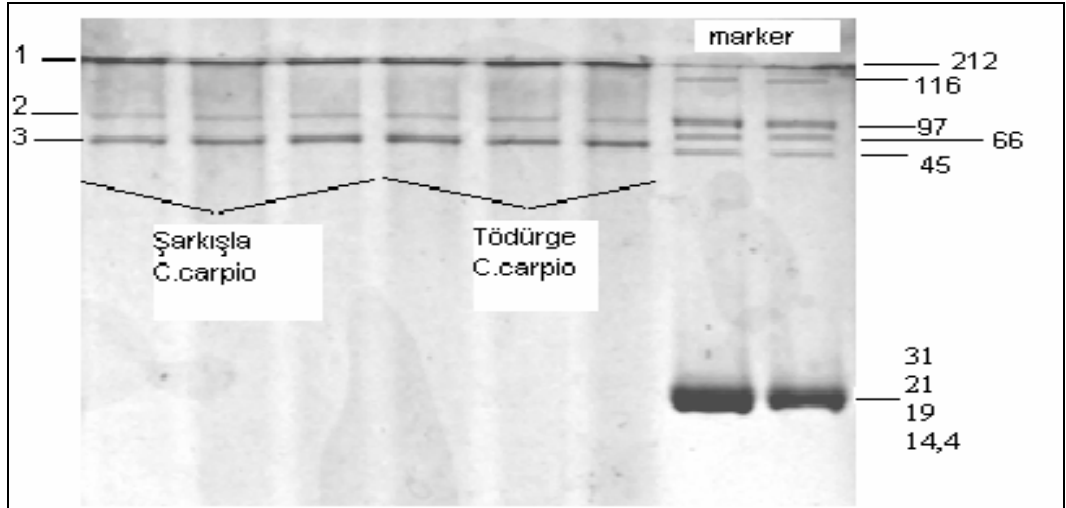
Tüm grupların IEF tekniği ile yapılan analizleri sonucu elde edilen izohemoglobin bantlarının pH noktalarına göre filogeni ağacı oluşturulmuştur (Tablo 24). Bu filogeni ağacının oluşturulmasında şu programlar ve yöntemler

kullanılmıştır. Bulunan Hb bantlarının pH noktalarına numaralar verilmiştir. Oluşturulan veri matriksinde pH noktaları karakter olarak seçilmiş ve bu pH'larda Hb bandı olup olmamasına göre 1 ve 0 rakamları kullanılarak PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0b 10 (Swofford, 1997) programı için veri matriksi oluşturulmuştur. Verilerin programa girilmesi ile tablo 26'da belirtilen filogeni ağacı elde edilmiştir.

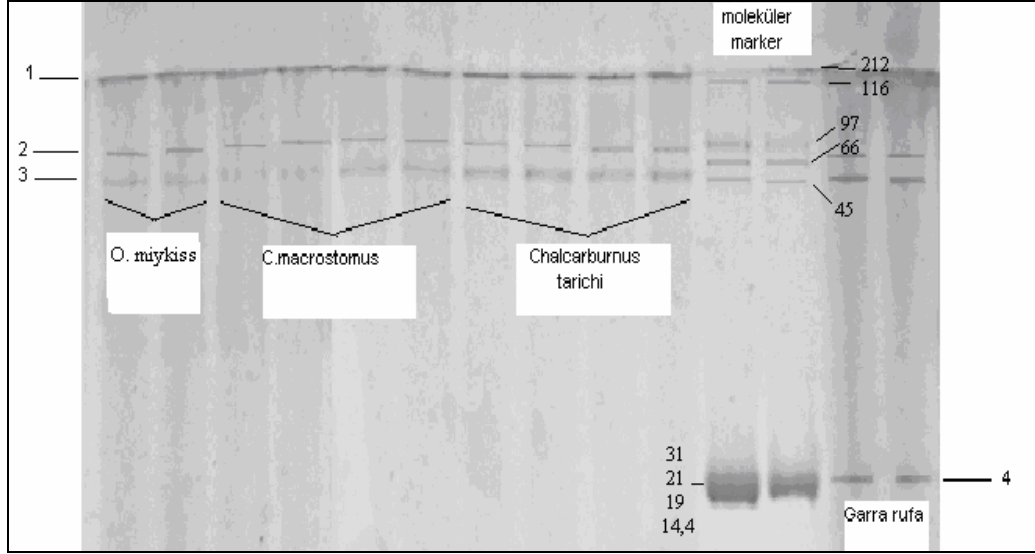
3. BULGULAR

3.1. Doğal-PAGE Bulguları

Bu çalışmada, doğal elektroforetik ortamlarda yürütülen balık hemoglobinlerinin vermiş olduğu bant örnekleri tayin edilmiştir. İlk doğal uygulama *C. carpio* (Şarkışla) ve *C. carpio* (Tödürge) örneklerinin moleküler belirteç ile yürütülmesini kapsamaktadır (Şekil 14). Şekilde görüldüğü gibi bant büyüklükleri moleküler belirteç ile karşılaştırıldığında 45–212 kDa arasında konuşlandırılmıştır. Moleküler belirtecin diğer bantları ise en önde kalın bir bant olarak yer almış ve birbirinden ayrışmamıştır. Gerek Şekil 14 gerekse Şekil 15’deki verilerde üç belirgin balık Hb bant profiline rastlanmıştır. 3. bandın test edilen tüm türlerdeki asıl (majör) bant, diğer bantların ise küçük (minör) Hb bandı olduğu gözlenmiştir. *G. rufa* örneğinin moleküler belirtecin ön kalın bandı ile eşleşen bir fazla bant örneği daha sergilediği görülmüştür (Şekil 15).



Şekil 14. Şarkışla *C. carpio* ve Tödürge *C. carpio* örneklerinin Doğal-PAGE ile elde edilen bant profilleri.



Şekil 15. *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinion macrostomus* ve *Chalcalburnus tarichi* türlerinin Doğal-PAGE elektroforez uygulaması ile görülen bant profilleri.

Şekil 14 ve Şekil 15’de görüldüğü üzere Doğal-PAGE uygulamasında görülen 1, 2 ve 3 numaralı bantlar karşılaştırılan tüm gruplarda aynı moleküler ağırlıktadır. Ancak *Garra rufa* örneğinin Doğal-PAGE uygulamasında diğer gruplardan farklı olarak 4. bir bant profili görülmüştür.

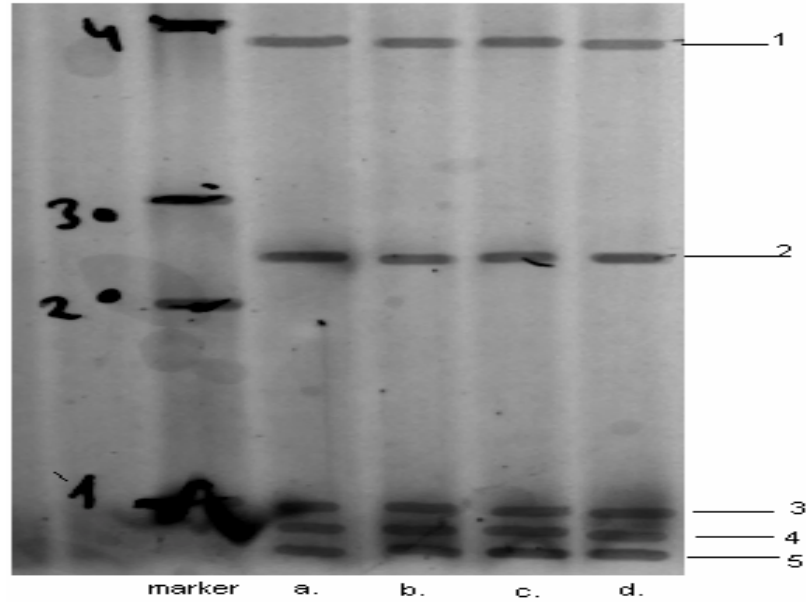
Tüm uygulamalar her türün farklı bireyleri için yapılmış ve her seferinde tüm uygulamada kullanılan her türün farklı bireyleri için aynı sonuç elde edildiğinden, bunlar arasında en iyi görüntü veren jeller resimlenmiş ve değerlendirilmiştir.

3.2. SDS-PAGE Bulguları

3.2.1. Normal Homojenizatların Yürütülmesi ile Elde Edilen Bulgular

Bu uygulamada protein içeren normal homojenizatlar SDS varlığında denatüre edilerek yürütülmüşlerdir. Şekil 16, Şekil 17 ve Şekil 18’de görüldüğü gibi bant profilleri bulunmuş, bulunan bant profilleri moleküler belirteçle karşılaştırılmış ve moleküler ağırlıkları tayin edilmiştir. Normal örnekler tüm

grupların kendi Hb içeriğini bulundurduğundan tüm Hb bant profillerinin görülebilmesi için bu şekilde bir çalışma yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler ile gruplardaki karşılaştırmalar yapılmış ve belirlenen bantlar numaralandırılmıştır.

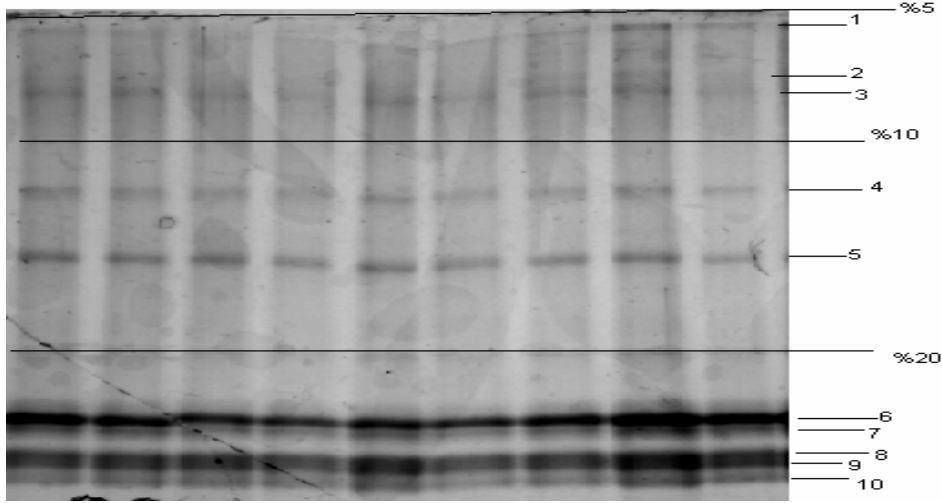


Şekil 16. Sukroz gradientli jel (%5, %12, %15) ile SDS-PAGE uygulamasında görüntülenen bant profilleri (**a.** Tödürge *C. carpio*, **b.** Şarkışla *C. carpio*, **c.** *C. macrostomus*, **d.** *G. rufa*) (moleküler belirteç büyüklükleri **1:** 14,4 kDa, **2:** 19 kDa, **3:** 21 kDa, **4:** 31 kDa).

Şekil 16'da görüldüğü gibi Tödürge *C. carpio*, Şarkışla *C. carpio*, *C. macrostomus* ve *G. rufa* türleri arasında SDS-PAGE (sukroz gradientli) uygulaması ile yapılan karşılaştırmalarda tüm türlerde 1, 2, 3, 4, 5 numaralı olmak üzere 5 bant profilleri teşhis edilmiştir. Bu gözlenen bant profillerinin tamamı %15'lik olan alanda görülmüştür. Jelin üst tarafında bulunan %5 ve %12'lik kısımda bant profili gözlenmemiştir. Fakat bu oranlara sahip jellerin proteinleri daha net görünür hale getirmesi, toplanmasını ve keskinleşmesini sağladığı bilinmektedir. Sukroz şekerinin jellerin içerisinde farklı yoğunlukta bir gradient

oluşturması bu keskinleşmenin, toplanmanın ve net görüntü vermenin nedeni olduğu bilinmektedir.

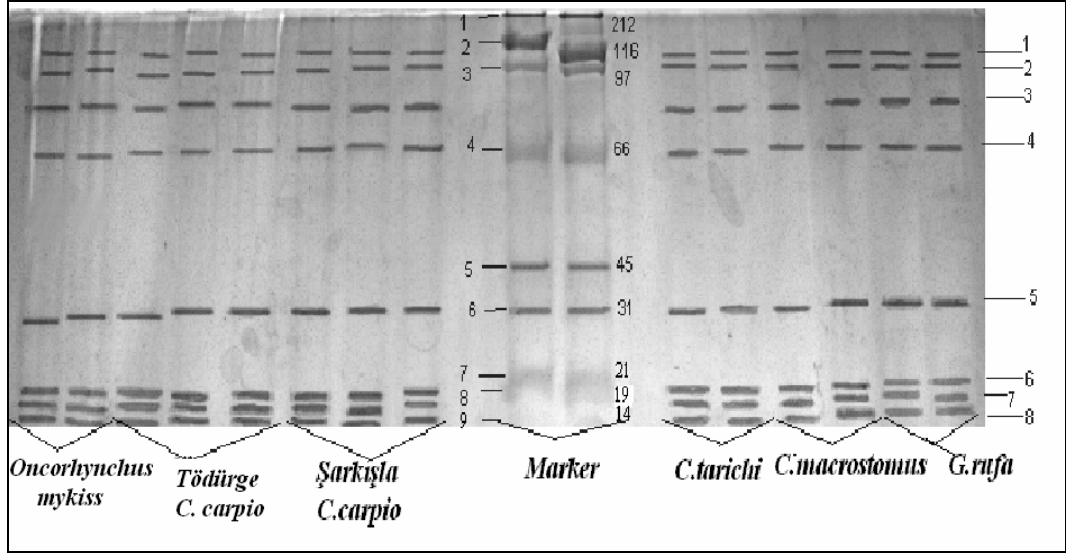
Birinci hattaki protein markeri numaralandırılmıştır ve bantlarının büyüklüğü şu şekildedir; 4. bant 31 kDa, 3. bant 21 kDa, 2. bant 19 kDa, 1. bant ise 14,4 kDa olduğu bilinmektedir. Türlerdeki bant profilleri protein marker ile karşılaştırıldığında 1. bandın 31–21 kDa, 2. bandın 21–19 kDa, 3, 4, 5 numaralı bantların ise 19–14,4 kDa arasında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 17. *Chalcalburnus tarichi* türünün bireyleri arasında yapılan sukroz gradientli (%5, %10, %20) SDS-PAGE uygulaması.

Şekil 17’de *Chalcalburnus tarichi* türlerinin bireyleri arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. Sukroz gradient SDS-PAGE uygulaması ile yapılan karşılaştırmada türün farklı bireyleri arasında farklılık tespit edilememiştir. Bu SDS-PAGE jeline yüklenen örnekler, Hb elde etmek için kullanılan yöntemden farklı olarak santrifüjden sonra alınan ara faz yerine altta kalan tortu lizis edilerek elde edilmiştir. Bu yüzden 1, 2, 3, 4, 5 numaralı bantların Hb iskelet proteini olduğu düşünülmektedir.

Şekil 18’de SDS-PAGE yöntemi ile tüm grupların karşılaştırılması yapılmıştır. Her bir grup için bant sayıları hem tür içi hem türler arasında eşit sayıda olup birbirleri ile hiçbir bant profili farklılığı göstermediği tespit edilmiştir.



Şekil 18. Tüm grupların SDS-PAGE karşılaştırması (%10).

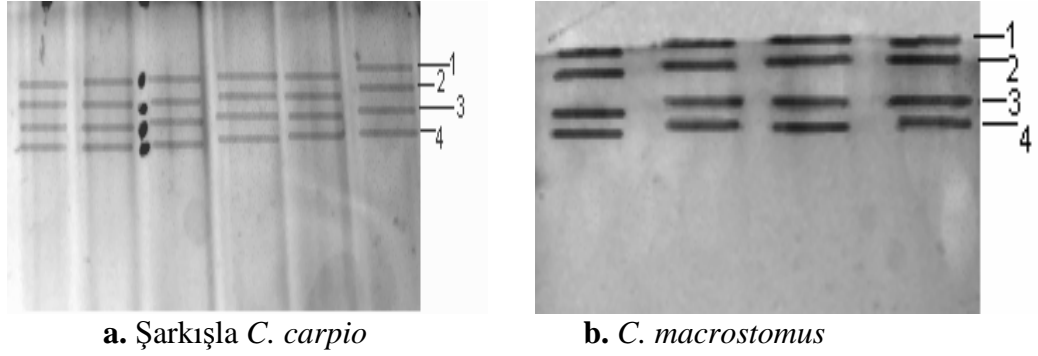
Ayrıca Şekil 16’da görünen 5 bant, Şekil 18’de 8 band olarak görülmüştür. Bu farklı görüntünün, %15’lik sukroz jelinde 1 ve 2 numaralı bantların tam ayrılmadığı, %10’luk sukrozuz jelde ise monomer şeklinde ayrışmasından kaynaklandığı sanılmaktadır. Şekil 18’de sunulan sonuçlar esas alındığında, bantların hemen hepsi aynı büyüklükte gözlemlendiğinden, hangi bandın majör, hangilerinin minör bantları temsil eden alt üniteler olduğunu söylemek bu sonuçlara göre oldukça zor görünmektedir.

3.2.2. IEF Yöntemi ile Bulunan Bantların Kesilip SDS-PAGE’de Yürütülmesi

3.2.2.1. Kesilen Bantların Ezilerek SDS-PAGE Jel ile Yürütülmesi

IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin, dikkatlice tek bir Hb bandına boyanan örnekler dikkate alınarak bantlara denk gelecek şekilde boyanmamış örnek karşılığı kesildikten sonra yükleme tamponu içerisinde ezilmesi ile elde edilen örnekler üre içerikli SDS-PAGE jelinde yürütülmüştür. Şekil 19’da görüldüğü gibi her bir hatta 4 bant olduğu gözlemlenmiştir. Bu 4’lü bantların tek bir Hb bandının alt ünitelerinden oluşmasından kaynaklanmaktadır. Bu uygulama ile tüm türlerin Hb bant profillerinin karşılaştırılmasından ziyade IEF tekniğiyle

bulunan bantların her birinin bir alt ünitemi yoksa her birinin tek bir üniteli Hb'imi temsil ettiği kesinleştirilmiştir.

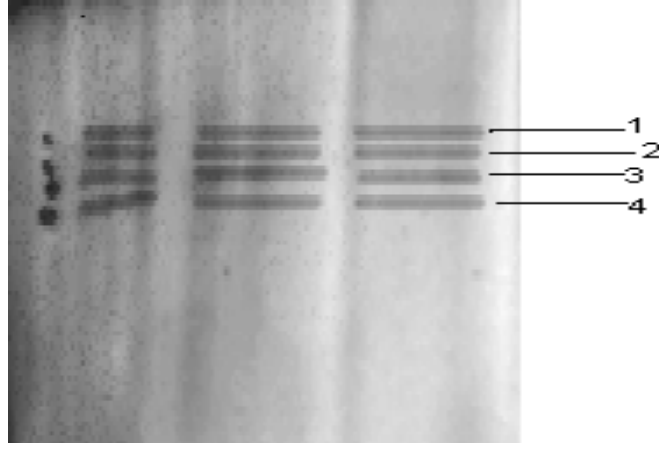


Şekil 19. IEF yöntemi ile bulunan bantların kesildikten sonra ezilerek ayrı olacak şekilde SDS-PAGE jeline uygulanmasıyla bulunan Şarkışla *C. carpio* (a) ve *C. macrostomus* (b) bant profillerinin gösterimi (Her hat tek bir Hb molekülünü göstermektedir).

3.2.2.2. Kesilen Bantların Direk SDS-PAGE Jel ile Yürütülmesi

IEF tekniği ile bulunan Hemoglobin bant profilleri dikkatlice cetvel ve jilet aracılığı ile tek bir Hb bandına denk gelecek şekilde (jel) kesildi ve ezilmeden uygulandı. Yükleme tamponu içerisinde beş dakika denatüre edildikten sonra jel dikkatlice SDS-PAGE jelinin üzerine konuldu. Bu şekilde tek bir Hemoglobin proteini yürütülmüş oldu.

Şekil 20'de gösterildiği gibi her bir hatta 4 bant olduğu gözlenmiştir. Bu 4'lü bantların, tek bir hemoglobin bandının *alfa* ve *beta* alt ünitemi olduğu teşhis edilmiştir. Bu uygulama IEF çalışmasında gözlenen hemoglobin formlarının üreli ortamda SDS, 2-merkaptöanol ve triton X-100 olmadan alt ünitemlerden ayrılmadığını göstermiştir.

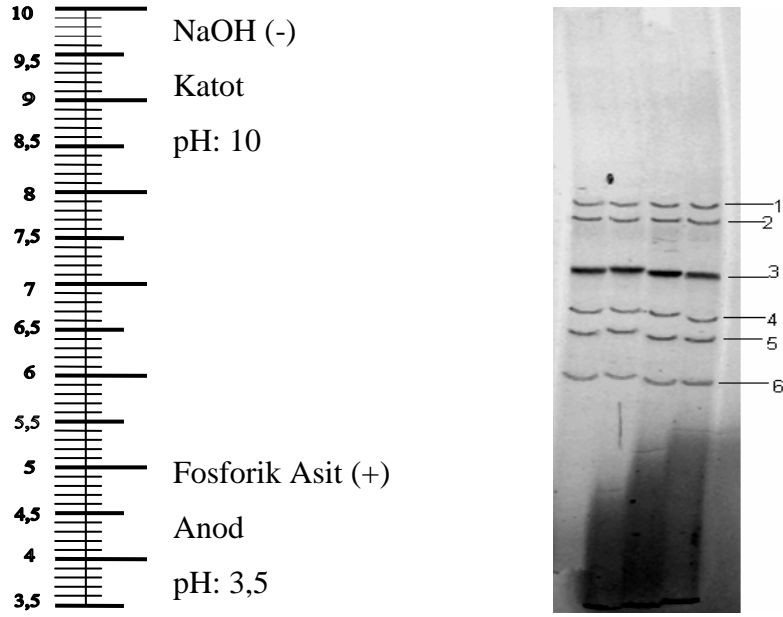


Şekil 20. IEF yöntemi ile bulunan Şarkışla *C. carpio* izo-hemoglobin bantların kesildikten sonra jel parçalarının alınarak ayrı bir şekilde SDS-PAGE jeline uygulanmasıyla bulunan Hb bant profilinin gösterimi (Her hat tek bir Hb proteinini göstermektedir).

Şekil 18'deki %10'luk SDS esas alındığında uygulamalarda tek başına SDS ile tür içi ve türler arasında bir fark gözlenmediği belirlenmiştir. Hangi alt üniteleri içerdiği bilinmemesine karşın toplam 8 band profili tüm tür ve türün bireylerinde gözlenmiştir.

3.3. IEF Üre-PAGE Bulguları

3.3.1. Her Bir Türün Kendi İçerisinde Değerlendirilmesi



Şekil 21. *Oncorhynchus mykiss* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.

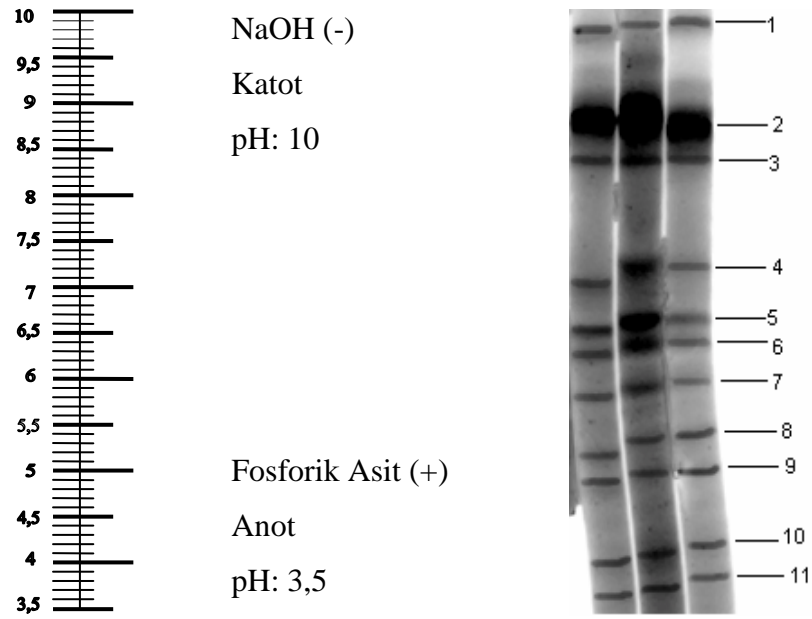
Sivas Tecer Dağ'ı yetiştirme çiftliğinden alınan *Oncorhynchus mykiss* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Kaynakta yapılan pH ölçümünde suyun pH'sı 7,2- 7,5 arasında bulunmuştur. Ayrıca suyun yüksek oksijen miktarına sahip olduğu bilinmektedir.

Tablo 3. *Oncorhynchus mykiss* türünün farklı bireylerinin Hb band ve pH noktaları

Hb	1	2	3	4	5	6
pH	8,0	7,7	7,2	6,7	6,5	6,0

Oncorhynchus mykiss türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile tür içinde Hb bant farklılığının olmadığı ve aynı

pH noktasında odaklandığı belirlenmiştir (jellerin resimleri çekilirken tam olarak bir araya getirilmesinde ufak pozisyon kaymaları olmuştur). Buna göre anod ve katodik alanlarda proteinlerin eşit dağıldığı, daha çok ise pH 7'nin her iki yanında eşit sayıda dağılım gözlenmiştir. 3. protein bandının baskın (majör) Hb, 1-2 ile 4-5 ile kendi aralarında daha özdeş (izo) Hb olduğu görülmüştür.



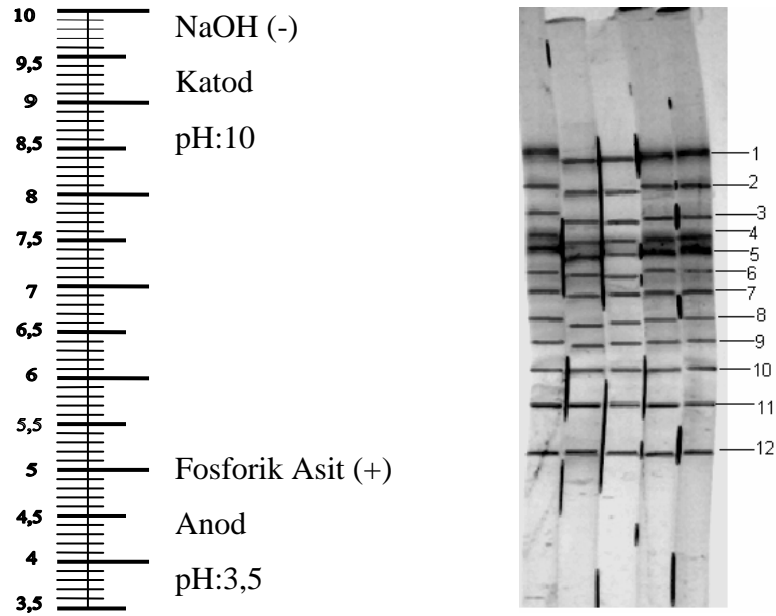
Şekil 22. *Garra rufa* (yağlı balık) örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.

Sivas Kangal Balıklı Kaplıcası'ndan alınan *Garra rufa* (yağlı balık) bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Balıklı Kaplıca suyunda yapılan pH ölçümünde suyun pH' sı 7,2 bulunmuştur. Ayrıca bu suyun yüksek selenyum miktarına sahip olduğu ve sıcaklığının 35 C° olduğu bilinmektedir.

Tablo 4. *Garra rufa* (yağlı balık) türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pH	9,8	8,7	8,5	7,2	6,7	6,5	6,0	5,4	5,1	4,3	3,9

Garra rufa türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile bireylerin arasında bir bant farklılığının olmadığı ve aynı pH noktasına sahip olduğu belirlenmiştir (jellerin resimleri çekilirken tam olarak bir araya getirilmesinde ufak pozisyon kaymaları olmuştur). pH'ya göre protein dağılımlarına bakıldığında ise: 7 bandın asidik, 4 bandın ise alkali alanda olmak üzere 11 band olduğu gözlenmiştir.



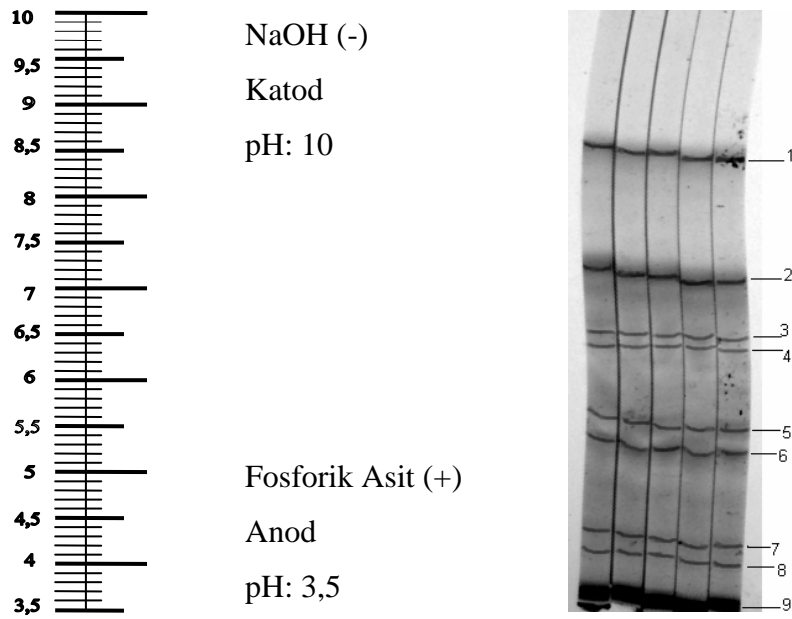
Şekil 23. Tödürge *C. carpio* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.

Sivas Tödürge Gölü'nden alınan *C. carpio* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Tödürge Gölü'nün suyunda yapılan pH ölçümünde suyun pH'ı 8,6 civarlarında bulunmuştur. Ayrıca bu suyun alkali olduğu bilinmektedir.

Tablo 5. Tödürge *C. carpio* türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	8,5	8,2	7,9	7,6	7,4	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	5,6	5,3

Tödürge *C. carpio* türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile bireylerin arasında bir bant farklılığının olmadığı ve aynı pH noktasına sahip olduğu belirlenmiştir (jellerin resimleri çekilirken tam olarak bir araya getirilmesinde ufak pozisyon kaymaları olmuştur). 12 bandın 7'si alkali, 5'i ise asidik lokasyon sergilemiştir.



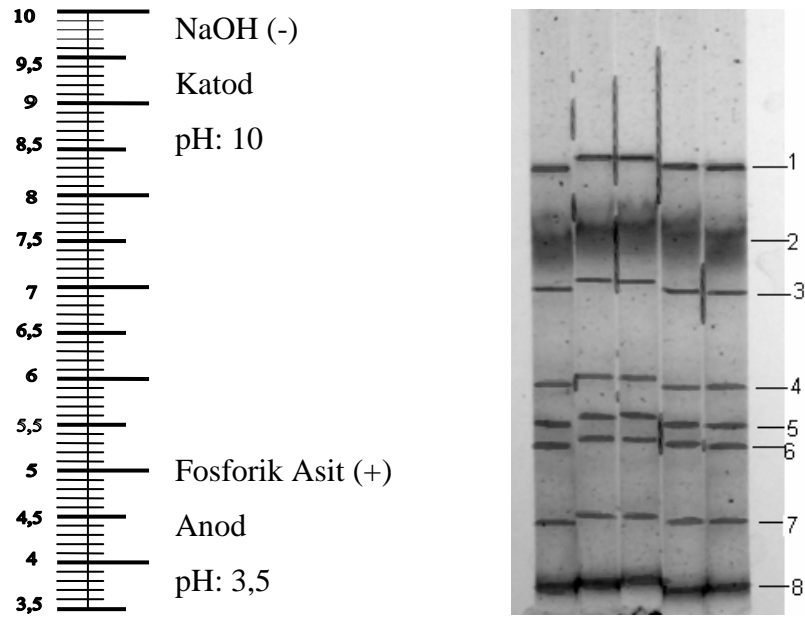
Şekil 24. Şarkışla *C. carpio* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.

Sivas Şarkışla ilçesinde bulunan sazlık olan büyük su birikintisinden alınan *C. carpio* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Suda yapılan pH ölçümünde suyun pH' sı 6,8- 7,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca bu suyun çok kirli balçıklaşmış ve sazlıklarla kaplı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 6. Şarkışla *C. carpio* türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	8,5	7,2	6,5	6,4	5,6	5,3	4,3	4,2	3,7

Şarkışla *C. carpio* türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile bireylerin arasında bir bant farklılığının olmadığı ve aynı pH noktasına sahip olduğu belirlenmiştir (jellerin resimleri çekilirken tam olarak bir araya getirilmesinde ufak pozisyon kaymaları olmuştur). Genelde 7 bandın asidik, kalan 2 bandın ise bazik alanda yerleşik olduğu gözlenmiştir.



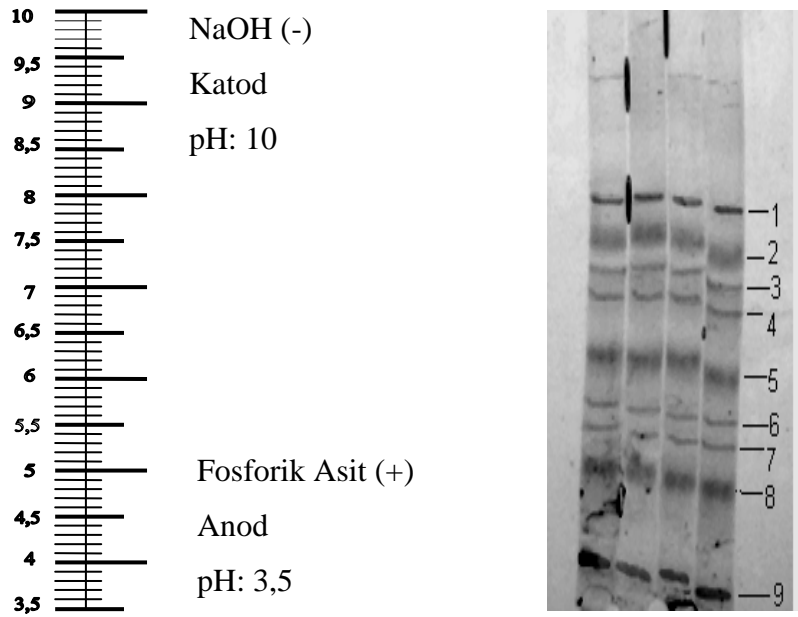
Şekil 25. *Chalcalburnus tarichi* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.

Van Gölü'nden alınan *Chalcalburnus tarichi* bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Suda yapılan pH ölçümünde suyun pH' sı 9.8 olarak bulunmuştur. Ayrıca bu suyun yüksek miktarda sodalı olduğu da bilinmektedir.

Tablo 7. *Chalcalburnus tarichi* türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	8,5	7,5	7,2	6,0	5,6	5,4	4,5	3,7

Chalcalburnus tarichi türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile bireylerin arasında bir bant farklılığının olmadığı ve aynı pH noktasına sahip olduğu belirlenmiştir (jellerin resimleri çekilirken tam olarak bir araya getirilmesinde ufak pozisyon kaymaları olmuştur). 5 band asidik, 3 band ise bazik alanda yer almıştır.



Şekil 26. *Cyprinion macrostomus* örneklerinin Hb bant profillerinin IEF yöntemi ile belirlenip karşılaştırılması.

Sivas Kangal Balıklı Kaplıcası'ndan alınan *Cyprinion macrostomus* (beni balığı) bireyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Balıklı Kaplıca suyunda yapılan pH ölçümünde suyun pH' sı 7,2 bulunmuştur. Ayrıca bu suyun yüksek selenyum miktarına sahip olduğu ve sıcaklığının 35 derece olduğu bilinmektedir.

Tablo 8. *Cyprinion macrostomus* (beni balığı) türünün farklı bireyleri arasında IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin pH noktaları

Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pH	8,0	7,5	7,2	6,9	6,2	5,6	5,4	4,9	3,9

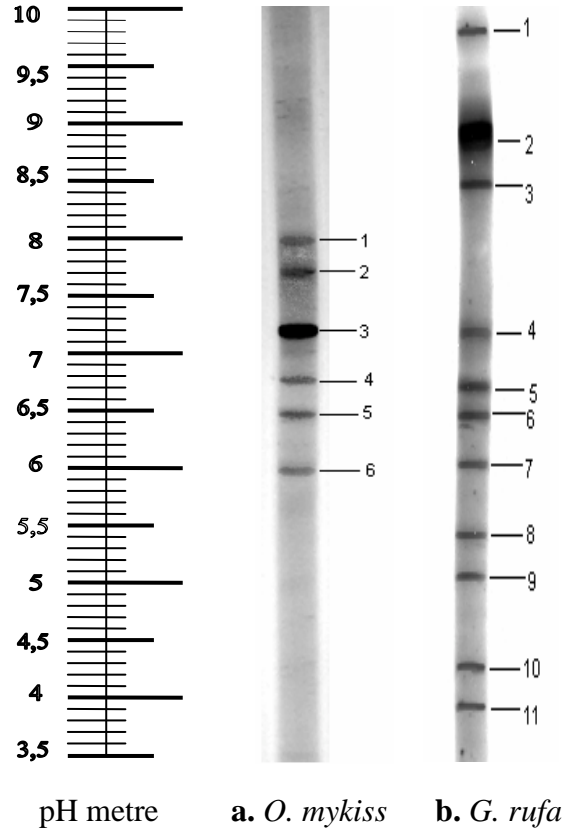
Cyprinion macrostomus türünün farklı bireyleri arasında yapılan Hb bant profillerinin karşılaştırılması ile bireylerin arasında bir bant farklılığının olmadığı ve aynı pH noktasına sahip olduğu belirlenmiştir (jellerin resimleri çekilirken tam olarak bir araya getirilmesinde ufak pozisyon kaymaları olmuştur). 6 band asidik, 3 band ise bazik alanda tespit edilmiştir.

3.3.2. Her Türün Birbirleri ile Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi

3.3.2.1. *Oncorhynchus mykiss* ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması

Tablo 9.a. *O. mykiss* ve *G. rufa*'nın ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	4	1	1
4	5	2	2
5	6		3
6	7		8
			9
			10
			11



Şekil 27. *O. mykiss* (a) ve *G. rufa* (b) türlerinin Hemoglobin bant profilleri.

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 27'de gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen *Oncorhynchus mykiss* örneğinde bulunan 6 bant, *Garra rufa* örneğinde bulunan 11 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH

noktaları (Tablo 9.b) belirlenmiştir. Görüldüğü üzere Hb band sayıları oldukça farklı iken dört band benzer bulunmuştur (Tablo 9.a)

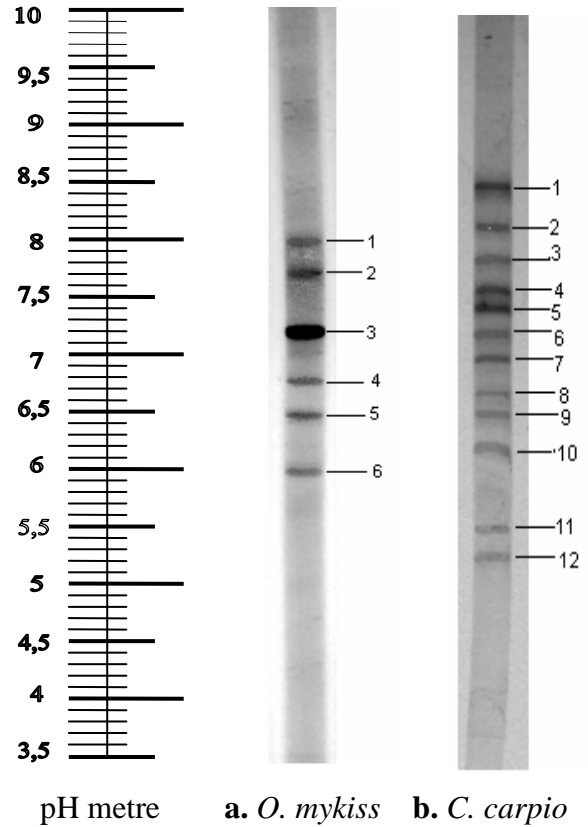
Tablo 9.b. *O. mykiss* ve *G. rufa* Hb bantlarının odaklanma (pH) noktaları

Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6
pH	8,0	7,7	7,2	6,7	6,5	6,0

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9	b.10	b.11
pH	9,8	8,7	8,5	7,2	6,7	6,5	6,0	5,4	5,1	4,3	3,9

Tablo 10.a. *O. mykiss* ve Tödürge *C. carpio*'nun ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	6	1	1
4	8	2	2
5	9	6	3
			4
			5
			7
			10
			11
			12



Şekil 28. *O. mykiss* (a) ve Tödürge *C. carpio* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 10.b. *O. mykiss* ve Tödürge *C. carpio* Hb bantlarının (pH) noktaları

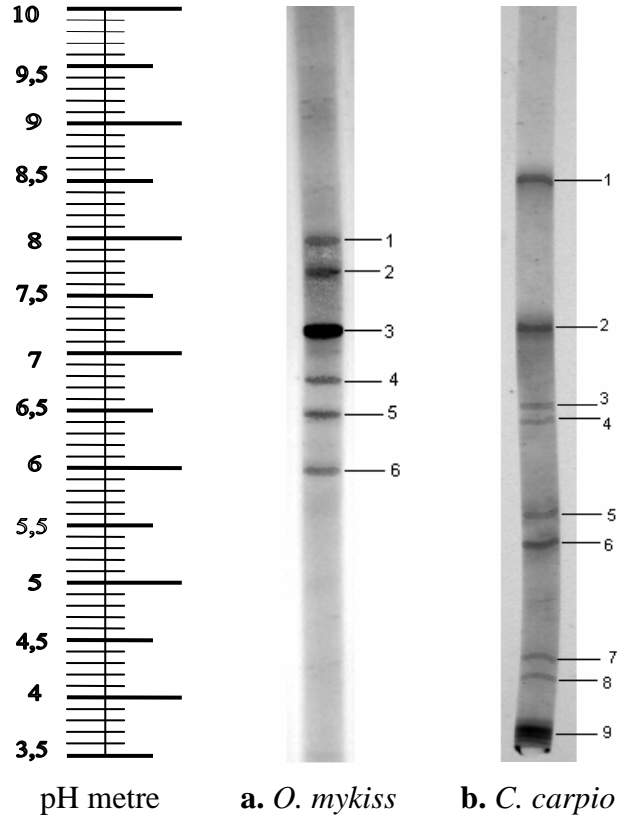
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6
pH	8,0	7,7	7,2	6,7	6,5	6,0

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9	b.10	b.11	b.12
pH	8,5	8,2	7,9	7,6	7,5	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	5,6	5,3

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 28’de gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen *Oncorhynchus mykiss* örneğinde bulunan 6 bant, Tödürge Gölü’nden alınan *Cyprinus carpio* örneğinde bulunan 12 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH noktaları (Tablo 10.b) belirlenmiştir. Yalnızca üç bantın ortaklaşa paylaşıldığı görülmüştür (Tablo 10.a).

Tablo 11.a. *O. mykiss* ve Şarkışla *C. carpio*’nun ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	2	1	1
5	3	2	4
		4	5
		5	6
			7
			8
			9



Şekil 29. *O. mykiss* (a) ve Şarkışla *C. carpio* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 11.b. *O. mykiss* ve Şarkışla *C. carpio* Hb bantlarının (pH) noktaları

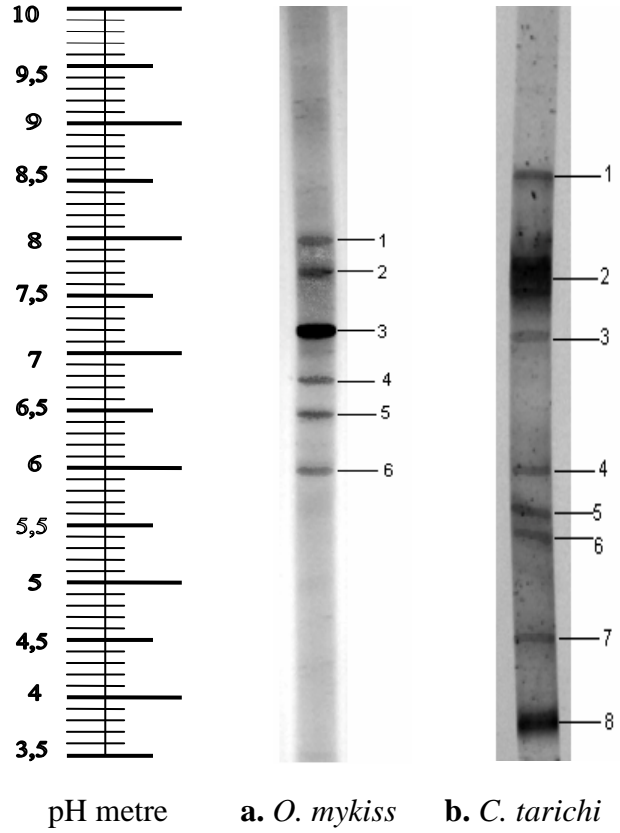
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6
pH	8,0	7,7	7,2	6,7	6,5	6,0

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,5	7,2	6,5	6,4	5,6	5,3	4,3	4,2	3,7

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 29'da gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen *O. mykiss* örneğinde bulunan 6 bant, Şarkışla'dan alınan *C. carpio* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH noktaları belirlenmiştir. Yalnız 2 Hb bandı ortaktır (Tablo 11.a ve b).

Tablo 12.a. *O. mykiss* ve *C. tarichi*'nin ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	3	1	1
6	4	2	2
		4	5
		5	6
			7
			8



Şekil 30. *O. mykiss* (a) ve *C. tarichi* (b) türlerinin Hemoglobin bant profilleri.

Tablo 12.b. *O. mykiss* ve *C. tarichi* Hb bantlarının odaklanma (pH) noktaları

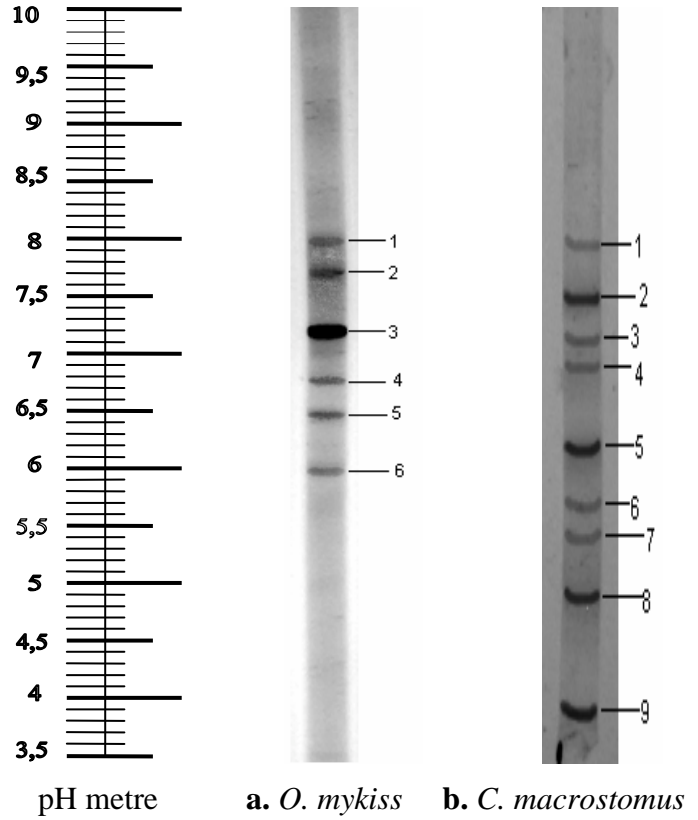
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6
pH	8,0	7,7	7,2	6,7	6,5	6,0

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8
pH	8,5	7,5	7,2	6,0	5,6	5,4	4,5	3,7

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 30'da gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen *Oncorhynchus mykiss* örneğinde bulunan 6 bant, *Chalcalburnus tarichi* örneğinde bulunan 8 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH noktaları belirlenmiştir (Tablo 12.b). İki bantın izoelektrik özellik açısından benzer olduğu belirlenmiştir (Tablo 12.a).

Tablo 13.a. *O. mykiss* ve *C. macrostomus*'un ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
1	1	2	2
3	3	4	4
		5	5
		6	6
			7
			8
			9



Şekil 31. *O. mykiss* (a) ve *C. macrostomus* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 13.b. *O. mykiss* ve *C. macrostomus* Hb bantlarının (pH) noktaları

Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6
pH	8,0	7,7	7,2	6,7	6,5	6,0

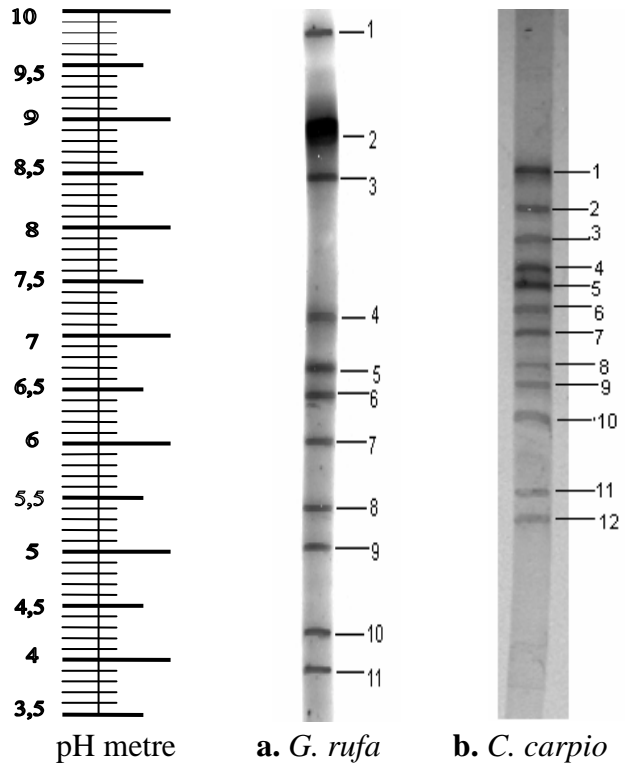
Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,0	7,5	7,2	6,9	6,2	5,6	5,4	4,9	3,9

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 31’de gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen *O. mykiss* örneğinde bulunan 6 bant, *C. macrostomus* örneğinde bulunan 11 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH noktaları (Tablo 13.b) belirlenmiştir. Benzer şekilde iki protein bandının (Tablo 13.a) ortaklaşa paylaştığı görülmektedir.

3.3.2.2. *Garra rufa* ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması

Tablo 14.a. *G. rufa* ve Tödürge *C. carpio*’nun ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	1	1	2
4	6	2	3
5	8		4
6	9		5
			7
			10
			11
			12



Şekil 32. *G. rufa* (a) ve Tödürge *C. carpio* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 14.b. *G. rufa* ve *C. carpio* Hb bantlarının odaklanma (pH) noktaları

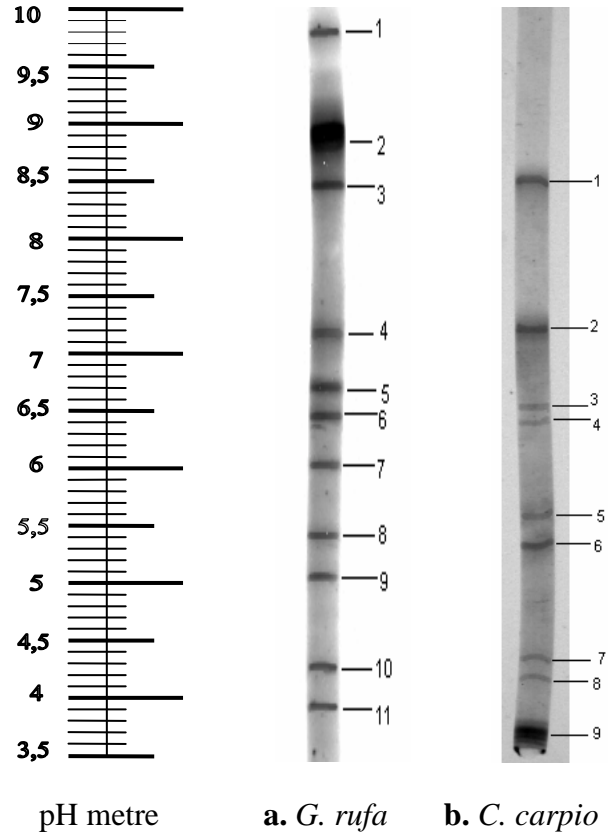
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9	a.10	a.11
pH	9,8	8,7	8,5	7,2	6,7	6,5	6,0	5,4	5,1	4,3	3,9

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9	b.10	b.11	b.12
pH	8,5	8,2	7,9	7,6	7,5	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	5,6	5,3

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 32’de gösterilmiştir. *G. rufa* örneğinde bulunan 11 bant, Tödürge Gölü’nden alınan *C. carpio* örneğinde bulunan 12 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH noktaları belirlenmiştir (Tablo 14.b). İki tür arasında dört bandın paylaşıldığı (Tablo 14.a) görülmektedir.

Tablo 15.a. *G. rufa* ve Şarkışla *C. carpio*’nun ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	1	1	2
6	3	2	4
10	7	4	5
		5	6
		7	8
		8	9
		9	
		10	
		11	



Şekil 33. *G. rufa* (a) ve Şarkışla *C. carpio* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 15.b. *G. rufa* ve Şarkışla *C. carpio* Hb bantlarının pH odaklanma noktaları

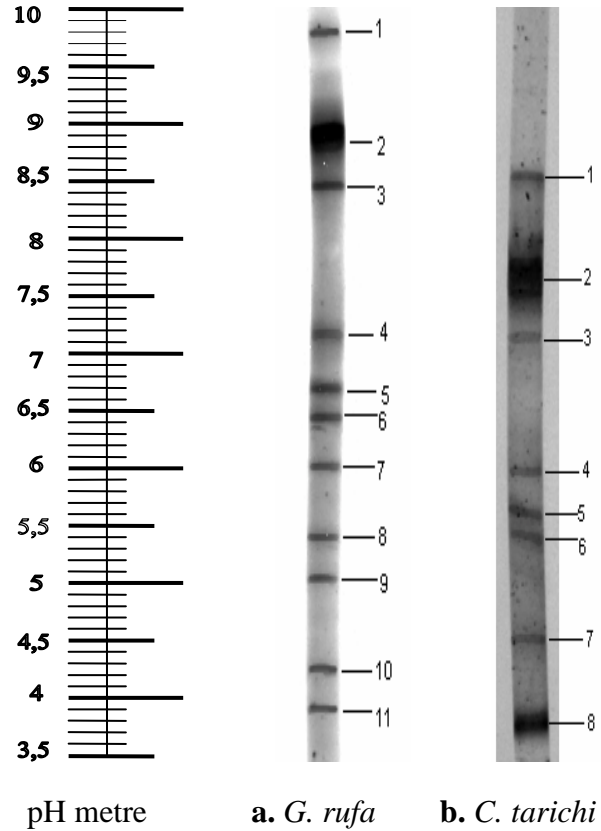
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9	a.10	a.11
pH	9,8	8,7	8,5	7,2	6,7	6,5	6,0	5,4	5,1	4,3	3,9

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,5	7,2	6,5	6,4	5,6	5,3	4,3	4,2	3,7

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 33'de gösterilmiştir. *G. rufa* örneğinde bulunan 11 bant, Şarkışla *C. carpio* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hemoglobin bantlarının odaklandığı (pH) noktalar belirlenmiştir (Tablo 15.b). Burada üç bantın her iki türde ortak olduğu görülmektedir (Tablo 15.a).

Tablo 16.a. *G. rufa* ve *C. tarichi*'nin ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	1	1	2
4	3	2	5
7	4	5	7
8	6	6	8
		9	
		10	
		11	



Şekil 34. *G. rufa* (a) ve *C. tarichi*(b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 16.b. *G. rufa* ve *C. tarichi* Hb bantlarının odaklanma (pH) noktaları

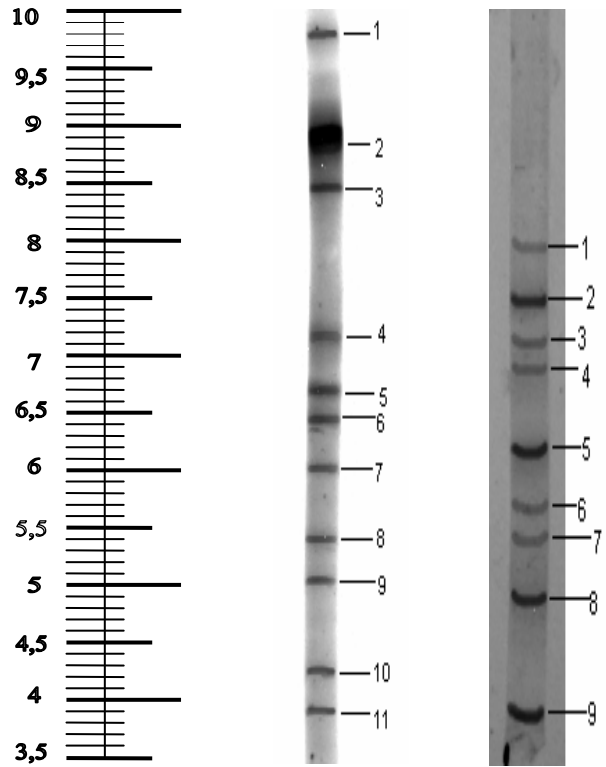
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9	a.10	a.11
pH	9,8	8,7	8,5	7,2	6,7	6,5	6,0	5,4	5,1	4,3	3,9

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8
pH	8,5	7,5	7,2	6,0	5,6	5,4	4,5	3,7

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 34'de gösterilmiştir. *Garra rufa* örneğinde bulunan 11 bant, *Chalcalburnus tarichi* örneğinde bulunan 8 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hemoglobün bantlarının odaklanma (pH) noktaları (Tablo 16.a-b) belirlenmiştir. Burada 4 bant ortaklaşa paylaşılmaktadır.

Tablo 17.a. *G. rufa* ve *C. macrostomus*'un ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
4	3	1	1
8	7	2	2
11	9	3	4
		5	5
		6	6
		7	8
		9	
		10	



pH metre

a. *G. rufa*

b. *C. macrostomus*

Şekil 35. *G. rufa* (a) ve *C. macrostomus* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 17.b. *G. rufa* ve *C. macrostomus* Hb bantlarının odaklanma (pH) noktaları

Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9	a.10	a.11
pH	9,8	8,7	8,5	7,2	6,7	6,5	6,0	5,4	5,1	4,3	3,9

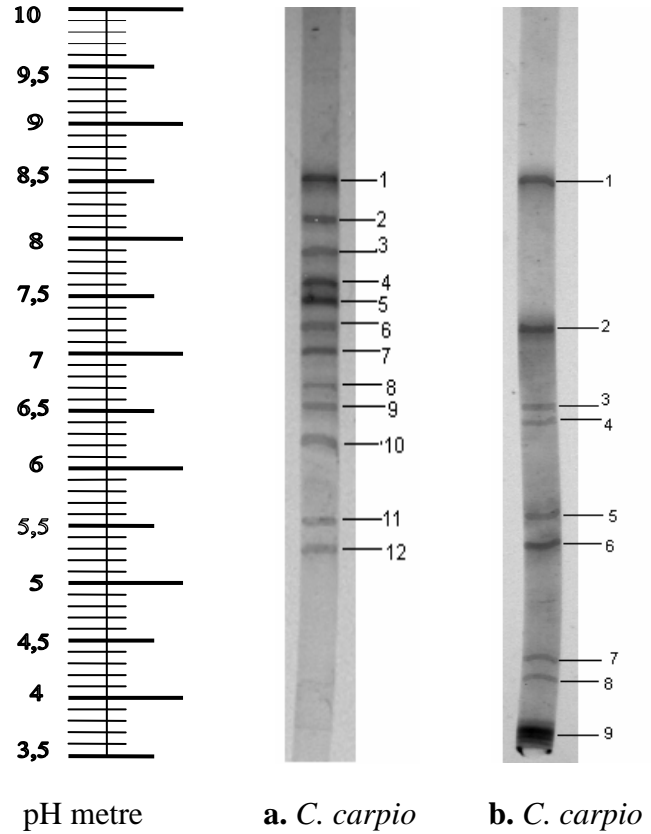
Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,0	7,5	7,2	6,9	6,2	5,6	5,4	4,9	3,9

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 35’de gösterilmiştir. *Garra rufa* örneğinde bulunan 11 bant, *Cyprinion macrostomus* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının odaklanma (pH) noktaları belirlenmiştir (Tablo 17.a ve b). 3 band iki tür tarafından paylaşılmaktadır.

3.3.2.3. Tödürge *C. carpio* ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması

Tablo 18.a. Tödürge *C. carpio* ve Şarkışla *C. carpio*’nun ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
1	1	2	4
6	2	3	7
9	3	4	8
11	5	5	9
12	6	7	
		8	
		10	



Şekil 36. Tödürge (a) ve Şarkışla (b) *C. carpio* türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 18.b. Tödürge ve Şarkışla *C. carpio* Hb bantlarının odaklanma noktaları

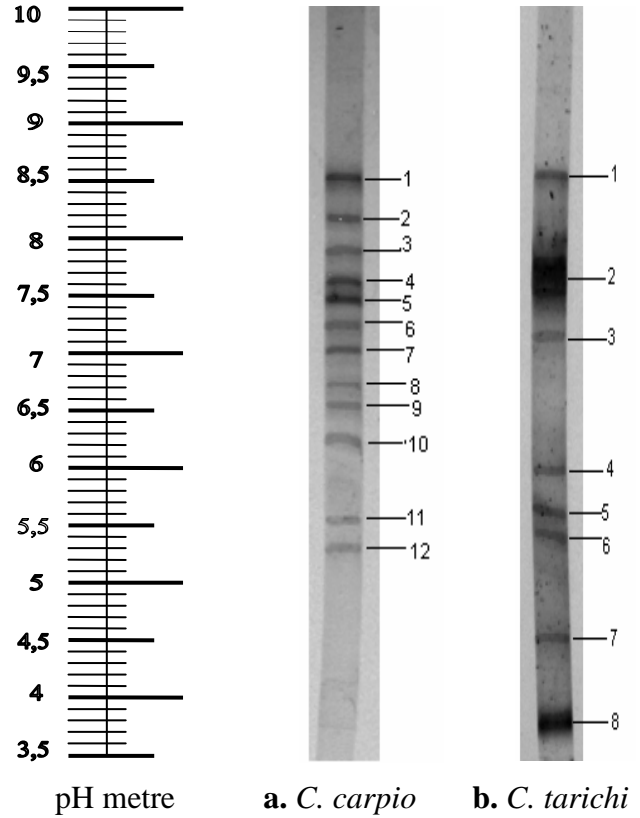
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9	a.10	a.11	a.12
pH	8,5	8,2	7,9	7,6	7,5	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	5,6	5,3

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,5	7,2	6,5	6,4	5,6	5,3	4,3	4,2	3,7

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 36'da gösterilmiştir. Tödürge *C. carpio* örneğinde bulunan 12 bant, Şarkışla *C. carpio* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hemoglobin bantlarının pH noktaları belirlenmiştir. En fazla ortak proteinin bulunduğu bu aynı türün iki popülasyonunda 5 protein bandı paylaşılmaktadır (Tablo 18.a ve b).

Tablo 19.a. Tödürge *C. carpio* ve *C. tarichi*'nin ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
1	1	2	4
5	2	3	6
6	3	4	7
11	5	7	8
		8	9
		9	
		10	
		12	



Şekil 37. Tödürge *C. carpio* (a) ve *C. tarichi* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 19.b. Tödürge *C. carpio* ve *C. tarichi* Hb bantlarının odaklanma noktaları

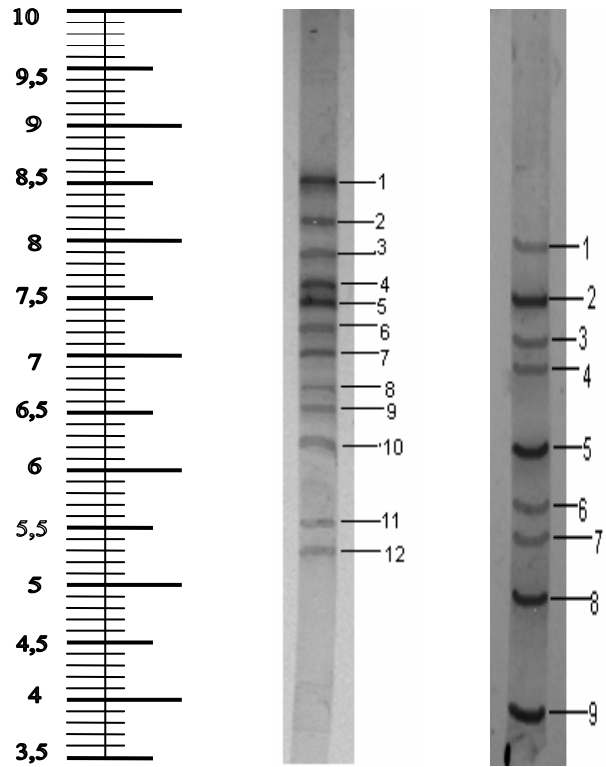
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9	a.10	a.11	a.12
pH	8,5	8,2	7,9	7,6	7,5	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	5,6	5,3

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8
pH	8,5	7,5	7,2	6,0	5,6	5,4	4,5	3,7

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 37’de gösterilmiştir. Tödürge *C. carpio* örneğinde bulunan 12 bant, *C. tarichi* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hemoglobin bantlarının (pH) noktaları belirlenmiştir. Görüldüğü üzere 4 band ortaktır (Tablo 19.a ve b).

Tablo 20.a. Tödürge *C. carpio* ve *C. macrostomus*’un ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
5	2	1	1
6	3	2	4
11	6	3	5
		4	7
		7	8
		8	9
		9	
		10	
		12	



pH metre a. *C. carpio* b. *C. macrostomus*

Şekil 38. Tödürge *C. carpio* (a) ve *C. macrostomus* (b) türlerinin Hb profilleri.

Tablo 20.b. Tödürge *C. carpio* ve *C. macrostomus* Hb bantlarının (pH) noktaları

Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9	a.10	a.11	a.12
pH	8,5	8,2	7,9	7,6	7,5	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	5,6	5,3

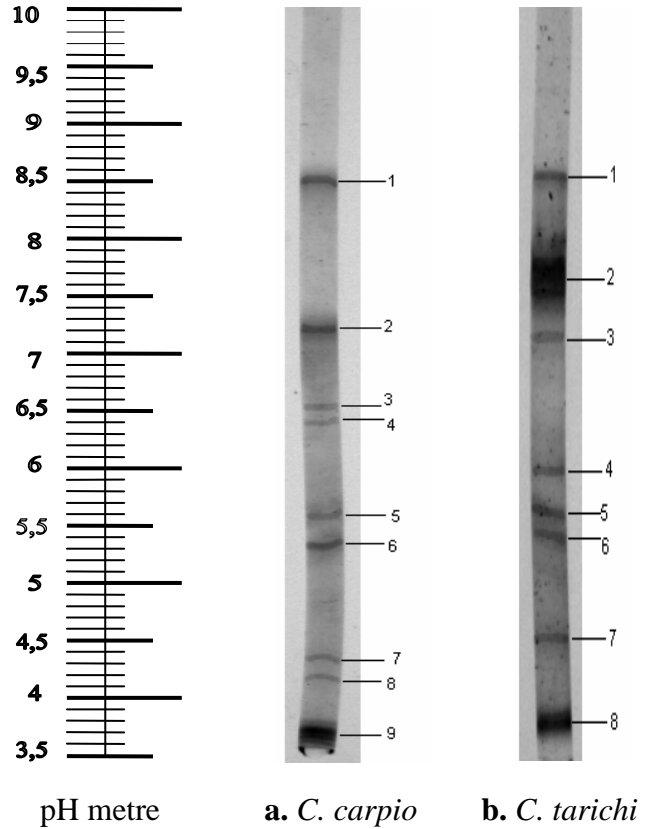
Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,0	7,5	7,2	6,9	6,2	5,6	5,4	4,9	3,9

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 38’de gösterilmiştir. *Tödürge C. carpio* örneğinde bulunan 12 bant, *C. macrostomus* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hemoglobin bantlarının pH noktaları belirlenmiştir. 3 protein bandı ortak gözükmemektedir (Tablo 20.a ve b).

3.3.2.4. Şarkışla *C. carpio* ve Diğer Türlerin Karşılaştırılması

Tablo 21.a. Şarkışla *C. carpio* ve *C. tarichi*’nin ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
1	1	3	2
2	3	4	4
5	5	6	6
9	8	7	7
		8	



Şekil 39. Şarkışla *C. carpio* (a) ve *C. tarichi* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

Tablo 21.b. Şarkışla *C. carpio* ve *C. tarichi* Hb bantlarının pH noktaları

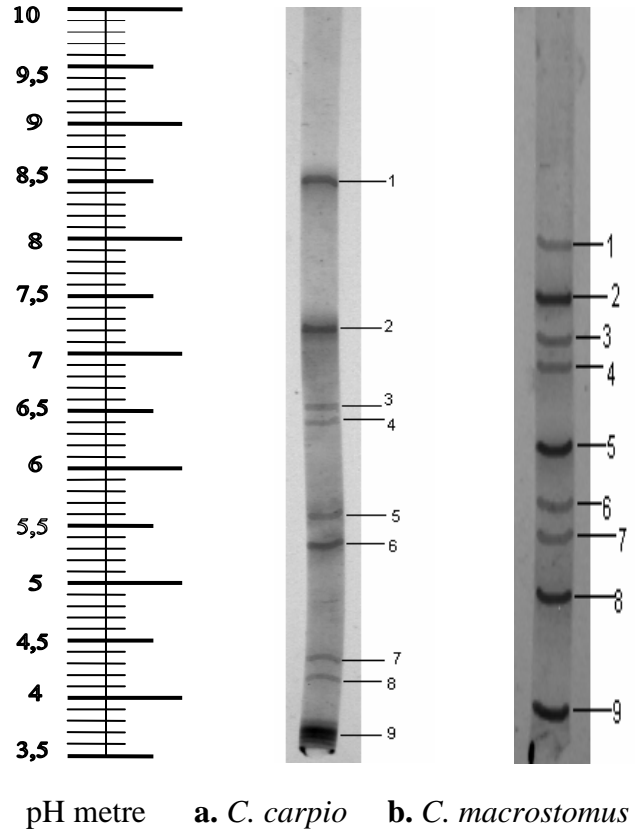
Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9
pH	8,5	7,2	6,5	6,4	5,6	5,3	4,3	4,2	3,7

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8
pH	8,5	7,5	7,2	6,0	5,6	5,4	4,5	3,7

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 39'da gösterilmiştir. Şarkışla *C. carpio* örneğinde bulunan 9 bant, *C. tarichi* örneğinde bulunan 8 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH noktaları belirlenmiştir. Band sayıları birbirine en yakın duran bu iki türün 4 bandı ortak gözükmemekte, fakat protein dağılımlarındaki fark göze çarpmaktadır (Tablo 21.a-b).

Tablo 22.a. Şarkışla *C. carpio* ve *C. macrostomus*'un ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
2	3	1	1
5	6	3	2
		4	4
		6	5
		7	7
		8	8
		9	9



Şekil 40. Şarkışla *C. carpio* (a) ve *C. macrostomus* (b) türlerinin Hb profilleri.

Tablo 22.b. Şarkışla *C. carpio* ve *C. macrostomus* Hb bantlarının pH noktaları

Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8	a.9
pH	8,5	7,2	6,5	6,4	5,6	5,3	4,3	4,2	3,7

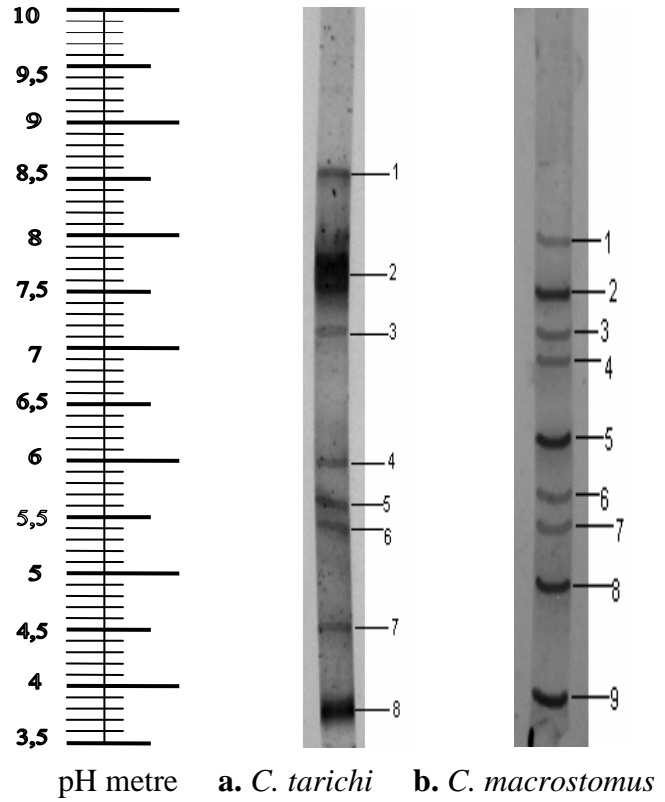
Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,0	7,5	7,2	6,9	6,2	5,6	5,4	4,9	3,9

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 40'da gösterilmiştir. Şarkışla *C. carpio* örneğinde bulunan 9 bant, *C. macrostomus* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hb bantlarının pH noktaları belirlenmiştir (Tablo 22.a ve b). Protein bant sayıları tamamen aynı olan bu iki tür aksine yalnız 2 bantı ortaklaşa paylaşmaktadır.

3.3.2.5. *Chalcalburnus tarichi* ve Diğer Türlerin karşılaştırılması

Tablo 23.a. *C. tarichi* ve *C. macrostomus*'un ortak ve farklı bantları

Aynı pH		Farklı pH	
a	b	a	b
3	3	1	1
5	6	2	2
6	7	4	4
		7	5
		8	8
			9



Şekil 41. *C. tarichi* (a) ve *C. macrostomus* (b) türlerinin Hb bant profilleri.

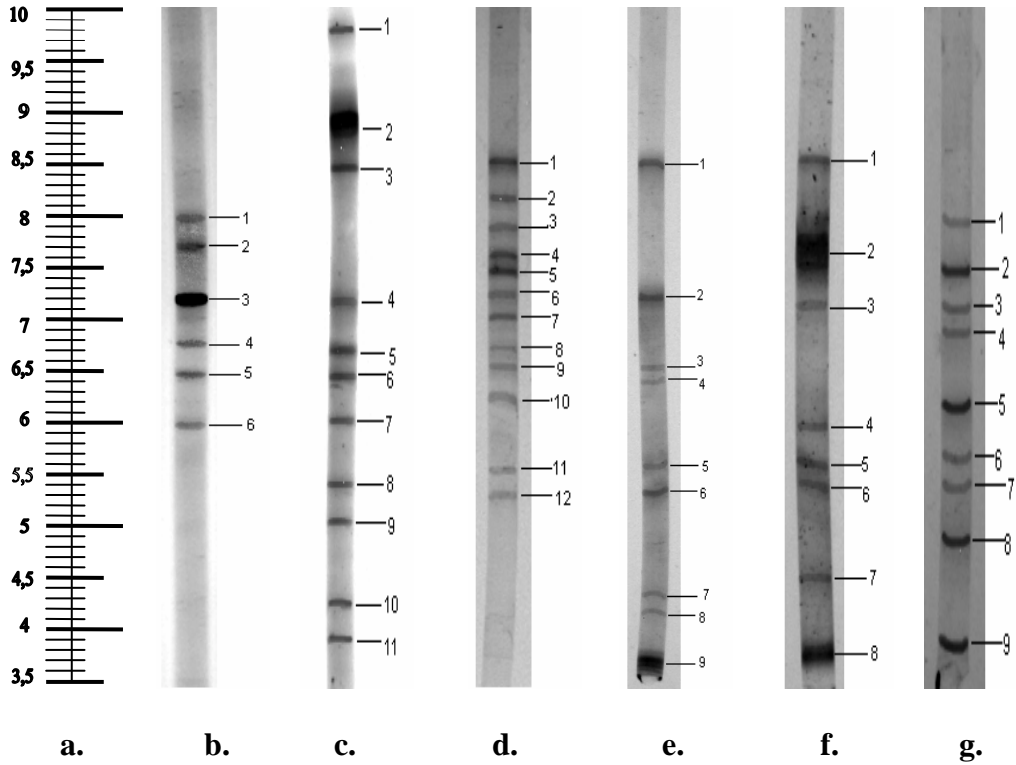
Tablo 23.b. *C. tarichi* ve *C. macrostomus* Hb bantlarının odaklanma pH noktaları

Hb	a.1	a.2	a.3	a.4	a.5	a.6	a.7	a.8
pH	8,5	7,5	7,2	6,0	5,6	5,4	4,5	3,7

Hb	b.1	b.2	b.3	b.4	b.5	b.6	b.7	b.8	b.9
pH	8,0	7,5	7,2	6,9	6,2	5,6	5,4	4,9	3,9

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 41’de gösterilmiştir. *C. tarichi* örneğinde bulunan 8 bant, *C. macrostomus* örneğinde bulunan 9 bant ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hemoglobün bantlarının odaklanma (pH) noktaları belirlenmiştir. Band sayıları yakın olan bu iki tür genel dağılım farklılığı yanında 3 bandı ortak taşımaktadır (Tablo 23.a ve b).

3.3.3. Türlerin Hepsinin Aynı pH Çizelgesinde Karşılaştırılması



Şekil 42. IEF yöntemi ile bulunan Hb bant profillerinin tüm türlerde karşılaştırılması (a. pH skalası, b. *O. mykiss*, c. *G. rufa*, d. Tödürge *C. carpio*, e. Şarkışla *C. carpio*, f. *C. tarichi*, g. *C. macrostomus*).

IEF yöntemi ile bulunan bant profilleri Şekil 42’de gösterilmiştir. *O. mykiss* örneğinde bulunan 6 Hb bandı, *G. rufa* örneğinde bulunan 11 Hb bandı, Tödürge *C. carpio* örneğinde bulunan 12 Hb bandı, Şarkışla *C. carpio* örneğinde bulunan 9 Hb bandı, *C. tarichi* örneğinde bulunan 8 Hb bandı, *C. macrostomus* örneğinde bulunan 9 Hb bandı karşılaştırılmıştır. Ayrıca tüm Hemoglobin bantlarının odaklanma (pH) noktaları belirlenmiştir. Yapılan belirlemelerde, 7,2 pH’da odaklanan Hb bandının tüm bireylerde ortak olduğu ortaya çıkmıştır (Tablo 24). Göze çarpan diğer bulgular ise pH 8,5’in dört türde (Şarkışla *C. carpio*, Tödürge *C. carpio*, *G. rufa* ve *C. tarichi*) ortaklaşa paylaştığı, pH: 6,5’in yine dört tür (*O. mykiss*, Şarkışla ve Tödürge *C. carpio*, *G. rufa*) arasında paylaşılmakta olduğu. pH: 5,6’nın ise yine dört tür (*C. macrostomus*, Şarkışla ve Tödürge *C. carpio*, *C. tarichi*) arasında paylaştığı gözlenmesidir. Onun dışında Tablo 24’e bakıldığında bazı türler arasında üçlü ortak protein bantlarına ve ikili ortak bantlar gözlenmektedir. Bazı bantlar ise türe özgü olduğu gözükmemektedir.

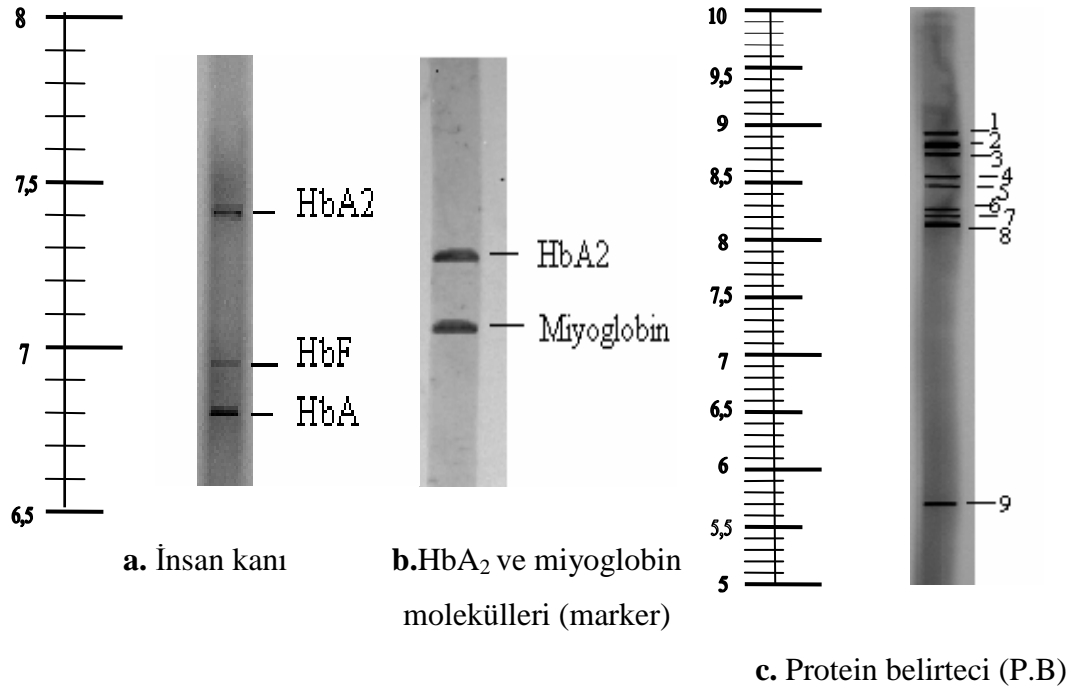
Tablo 24. Tüm grupların kendi aralarında karşılaştırılması ile oluşturulmuş Hb bant profillerinin odaklanma (pH) noktaları

pH	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Cyprinion macrostomus</i>	Şarkışla <i>C. carpio</i>	Tödürge <i>C. carpio</i>	<i>Garra rufa</i>	<i>Chalcalburnus tarichi</i>
9,8	-----	-----	-----	-----	Var	-----
8,7	-----	-----	-----	-----	Var	-----
8,5	-----	-----	Var	Var	Var	Var
8,2	-----	-----	-----	Var	-----	-----
8,0	Var	Var	-----	-----	-----	-----
7,9	-----	-----	-----	Var	-----	-----
7,7	Var	-----	-----	-----	-----	-----
7,6	-----	-----	-----	Var	-----	-----
7,5	-----	Var	-----	-----	-----	Var
7,4	-----	-----	-----	Var	-----	-----
7,2	Var	Var	Var	Var	Var	Var
7,0	-----	-----	-----	Var	-----	-----

6,9	-----	Var	-----	-----	-----	-----
6,7	Var	-----	-----	Var	Var	-----
6,5	Var	-----	Var	Var	Var	-----
6,4	-----	-----	Var	-----	-----	-----
6,3	-----	-----	-----	Var	-----	-----
6,2	-----	Var	-----	-----	-----	-----
6,0	Var	-----	-----	-----	Var	Var
5,6	-----	Var	Var	Var	-----	Var
5,4	-----	Var	-----	-----	Var	Var
5,3	-----	-----	Var	Var	-----	-----
5,1	-----	-----	-----	-----	Var	-----
4,9	-----	Var	-----	-----	-----	-----
4,5	-----	-----	-----	-----	-----	Var
4,3	-----	-----	Var	-----	Var	-----
4,2	-----	-----	Var	-----	-----	-----
3,9	-----	Var	-----	-----	Var	-----
3,7	-----	-----	Var	-----	-----	Var

3.3.4. Belirteçlerin ve İnsan Hb'ninin Değerlendirilmesi

Yöntem ile ilgili bir farklılığın olup olmadığını, genelde deneyde kullanılan türlerin birbirine yakınlığı nedeniyle ortaya konulan farklılığın ne ölçüde geçerli olduğunu test etmek için insan eritrosit Hb'si ve standart protein belirteçleride izoelektrik uygulamaya tabi tutulmuştur. Aksine insan Hb'si 3 band, kontrollerdeki HbA₂ ve miyoglobin tek band olarak gözlenmiştir (Şekil 43). Özellikle protein moleküler belirteç örneklerin aksine net ayrılmak yerine, hepsinin dar alanda odaklandığı gözlenmiştir.



Şekil 43. IEF tekniği ile bulunan bant profillerinin gösterilmesi. **a.** İnsan kanı, **b.** HbA₂ ve miyoglobin belirteçleri (marker), **c.** protein belirteci (marker).

Tablo 25. IEF analizleri sonucu bulunan pH noktaları

Hb	HbA ₂	HbF	HbA
pH	7,4	6,9–7,00	6,8

Hb	HbA ₂	Miyoglobin
pH	7,3	7,1

P.B.	c.1	c.2	c.3	c.4	c.5	c.6	c.7	c.8	c.9
pH	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5	8,3	8,2	8,1	5,7

IEF analizi ile yapılan değerlendirmelerde; insan kanında bulunan üç adet Hb, HbA₂ ve miyoglobin moleküllerinin tetramer yapılarının ayrışıp denatüre olmasına karşın birbirinden ayrı noktalarda kümelenmediği belirlenmiştir. Ayrıca 9 bant profili içeren protein belirtecinde de bir protein alt ünite ayrışması gözlenmemiştir.

3.3.5. Hb Bantlarının Odaklanma pH'larına Göre Hazırlanan Filogeni Ağacı

Herhangi bir izoelektrik pH band değeri esas alındığında, bunun var (1) veya yok (0) ile ifade edildiğinde aşağıdaki tablo (Tablo 26) elde edilmekte ve bunun filogenetik ağaç ifadesi olan şekil ise (Şekil 44) bir ağaç görüntüsü ve buna bağlı olarak bu türlerin soyağacındaki birbirlerine olan mesafeleri görülmektedir.

Tablo 26. Filogeni ağacı oluşturmada kullanılan veri matrisi

Türler/ pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>O. mykiss</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>C. macrostomus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
Şarkışla <i>C. carpio</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Tödürge <i>C. carpio</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
<i>G. rufa</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>C. tarichi</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0

Türler/ pH	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>O. mykiss</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. macrostomus</i>	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1
Şarkışla <i>C. carpio</i>	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Tödürge <i>C. carpio</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
<i>G. rufa</i>	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
<i>C. tarichi</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0

- | | | |
|-------------|-------------|-------------|
| 1-) 9,8 pH | 11-) 7,2 pH | 21-) 5,4 pH |
| 2-) 8,7 pH | 12-) 7,0 pH | 22-) 5,3 pH |
| 3-) 8,5 pH | 13-) 6,9 pH | 23-) 5,1 pH |
| 4-) 8,2 pH | 14-) 6,7 pH | 24-) 4,9 pH |
| 5-) 8,0 pH | 15-) 6,5 pH | 25-) 4,5 pH |
| 6-) 7,9 pH | 16-) 6,4 pH | 26-) 4,3 pH |
| 7-) 7,7 pH | 17-) 6,3 pH | 27-) 4,2 pH |
| 8-) 7,6 pH | 18-) 6,2 pH | 28-) 3,9 pH |
| 9-) 7,5 pH | 19-) 6,0 pH | 29-) 3,7 pH |
| 10-) 7,4 pH | 20-) 5,6 pH | |

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Hemoglobinler, proteinlerin yapı/fonksiyon ilişkisi ile ilgili bilgilerimizin derinliğinin anlaşılmasını sağlayan bugüne kadar en geniş kapsamlı çalışılmış protein ailesidir. Çalışmalar yalnızca protein yapısını kapsamakla kalmayıp, aynı zamanda gerek gen ailesi olarak, gerekse bu ailenin protein ürünleri gen-protein ürününün birebir sonuçlarının gözlenmesi bakımından önemli bir sınıfı teşkil etmektedir. Yine allosterik olan protein yapı ve işlevinin anlaşılmasında kullanılan etkin bir model kabul edildiğinden, Hb proteinine “**Protein Dünyasının Fahri Enzimi**” olarak bakılmaktadır (Jensen, 1988).

Özellikle hemoglobin gen ve protein ailesi olarak, bu gen ve gen ürününü içermekte olan canlıların oldukça çeşitlilik göstermesi ve değişik gruplardaki yaygınlığı, farklı yaşam formlarında yer alıyor olması, bu gruplar arasındaki evrimsel filogeni oluşturulmasında, bu gen ve proteinin etkin olarak kullanılabilmesini önemli hale getirmiştir. *Alfa* ve *beta* gen kümelerinin tek tek analizi aynı zamanda gen ailelerinin tarihçesinin anlaşılmasında önemli bir belirteç olarak kullanılmasına yol açmış ve benzeri gen ailelerinin oluşmasında duplikasyonun rolüne de ışık tutmuştur. Günümüz hemoglobin türlerinin yaşam tarihindeki sürecinin aydınlatılmasında, *beta* globin gen varyasyonu moleküler bir saat olarak etkin biçimde kullanılmıştır (Aguilata, 2006).

Hemoglobin proteinlerinde gözlenen bir diğer özellik ise, protein gen ailesi üzerinde işleyen evrimsel mekanizmaların, farklı çevresel koşullara uyum sağlamada, sadece oldukça uzak olan gruplar arasında farklılaşmanın gözlenmesine olanak sunmakla kalmayıp, aynı zamanda türler arasında ve bazen ise tür içindeki farklı populasyon gruplarında dahi bu çeşitliliğin fenotipik bir etki olarak gözlenmesine olanak sunmaktadır. Gerek gen yapısı, gerekse protein yapı ve işlevi açısından aktif çalışmalar için oldukça kullanışlı bir grup olarak bakılmaktadır. Katalitik bir protein olmamasına karşın, tartışmanın giriş kısmında da vurgulandığı gibi, oksijen bağlama özelliği allosterik enzimlerin kinetiğinin anlaşılmasında, bir işlevi yerine getirmede proteinler arasındaki işbirliğini anlamada önemli bir rol sergilemektedir.

Bu ve benzeri gerekçeler daha çok artırılabilmesine karşın, hemoglobin gen ve bunların ürünleri olan hemoglobin proteinleri moleküler saat olarak kullanımındaki özelliği kadar, işlevsel olarak sunduğu avantajlar aktif gözlem yapabilme konusunda önemli avantajlar sunmaktadır. Bu önemli kazanımlar günümüzde, başladığı ilk günden buyana halen aktif araştırmaların önemli bir alanını teşkil etmektedir.

Aynı şekilde balıkların yaşam süreci boyunca uyumsal olma özelliklerinin kazanılmasında izohemoglobin formları oldukça önemlidir. Çünkü değişken ısı, yani bulunduğu çevresel koşulların sıcaklık ve diğer etkilerine doğrudan maruz kalan balıkların, bu koşullara karşı sergiledikleri uyumsal özelliklerin en başında Hb proteininde gözlenen varyasyon, ilk göze çarpan biyokimyasal özelliklerin başında gelmektedir. Çevresel faktörlere bağlı olarak gen ailesi tarafından oluşturulan bu kadar önemli bir biyokimyasal süreçle ilgili yapılan çalışmalar ve kaynaklar bizce yeterli bulunmamaktadır (Hashimoto ve Matsuura, 1960).

Omurgalı ve balık hemoglobinleri en detaylı araştırılanlar arasındadır. Fakat balık hemoglobinleri daha çok Antarktik bölgelerde yaşayan ve hemoglobinlerin oldukça farklı sınıfını teşkil eden grup üzerinde yoğunlaşmaktadır (Jensen, 1988). Günümüzde hemoglobin molekülünün varyantları daha çok klinik önemi nedeniyle insan kanında araştırmalar yapılarak incelenmektedir. Bunun nedeni, insanlarda bulunan Hb varyantlarının sağlık ve yaşam açısından kritik öneme sahip olmasıdır. Görünen o ki, değişken ısı genomların çevresel etkilere maruz kaldığında sergilemiş oldukları uyumsal metabolik düzenlemeler, Antarktik alanlar hariç tutulduğunda, balık gruplarında henüz beklenen ilgiyi uyandırmış gözükmemektedir. Bu özellikle bir işlevsel proteinin genetik olarak belirlenmesine bağlı olarak, bu proteinin ilgili genoma bağlı bulunduğu çevreye uyum sağlamada, çevrenin nasıl bir seçim baskısı ortaya koyduğunu anlamak açısından da önemlidir.

Başlangıç olarak sonuçları daha detaylı yorumlamadan önce kısaca vurgulamak gerekirse bu çalışma iki etkin sonuç ortaya koymaktadır:

Farklı çevresel koşullara uyum sağlamada hemoglobin proteininin, çalışılan grupların yakınlığına rağmen oldukça farklı protein modelleri ortaya koymuş

olmaları. Bu farklılığın temelinde seçilen türlerin yaşam koşullarında gözlenen farklılıklar kadar, değişken ısılı olan balık türlerinin, yaşadıkları koşula bağlı olarak uyumsal fenotipik etkiler ortaya koymuş olmalarıdır. Yani hemoglobin geninde gözlenen varyasyonun, protein varyasyonu ile sonuçlanan uyumsal değişimle sonuçlanmış olması yatmaktadır. Her ne kadar henüz çalışmaya konu olan balık örneklerinin detaylı olarak gen yapısı çalışılmamış olmasına karşın, protein varyasyonunun teorik temelde gen varyasyonu ile birlikte işlemesi gerektiğinden, globin gen çeşitliliğinin bu türlerde, Antarktik Notothenioid türlerin aksine daha çok artmış olabileceğini çıkarsamak çok da fazla uzak olasılık gözükmemektedir.

Çalışma başlangıç olarak geleneksel izoelektrik odaklama (İEF) ile elde edilen jellerin SDS-PAGE ortamına aktarımı ile elde edilecek hemoglobin modellerinin ilgili örneklerin 2D tekniği ile karşılaştırılmasını amaçlamaktaydı. İEF sisteminin teknik zorluklar nedeniyle elde edilememiş olmasına bağlı olarak, çalışma başka bir yöntem arayışına yönelmek durumunda kalmıştır. Doğal ve Denatüre uygulamaları için kullanılan Disk Jel Elektroforez Sistemi, izoelektrik uygulama için kullanılmış ve sistemin homojenat ortamından elde edilen balık hemoglobinlerin ayrıştırılmasında oldukça etkin kullanılabildiğini bize göstermiştir. Hemoglobin proteinleri yüklü amino asitleri, diğer proteinlere göre daha fazla içerdiği bilindiğinden, bu proteinlerdeki tek bir amino asitlik değişimleri bile izoelektrik alanda net ayrışma sergilemekte ve bu farklı türler kadar aynı türün farklı adaptif formları (populasyon) arasında dahi protein modellerinin farklılığının belirlenmesinde kolaylık sunmaktadır. Bu çalışmada elde sonuçlar bu açıdan önemli bulgular sunmaktadır.

Bu verilerin ışığında yukarıda vurgulanan bu iki önemli ve çarpıcı sonuç yapılan çalışmalar eşliğinde tartışılmıştır. Sonuçlar gerek seleksiyon ajanı olarak çevresel koşula bağlı gözlenen hemoglobin varyasyonunu, gerekse bu çalışma için ilk defa modifiye edilen yöntemin sınırlı ölçüde filogenetik çalışmalarda kullanılması bakımından dikkate değer gözükmemektedir. Bu sonuçlar her ne kadar daha fazla detaylı çalışmalar ile desteklenmeye ihtiyaç duysa da, başlangıç olarak elde edilen veriler bizce oldukça dikkate değer niteliktedir.

Bu tez ile Cyprinidae familyası içerisinde bulunan *Cyprinus*, *Cyprinion*, *Chalcalburnus*, *Garra* genuslarına ait bireylerin izohemoglobin formları SDS-PAGE, Doğal-PAGE, IEF teknikleri kullanılarak ortaya konmuştur. Bulunan sonuçlar kontrol grup olarak seçilen Salmonidae familyasında bulunan *Oncorhynchus mykiss* türleri, aynı ailenin farklı genusları ve bir türün farklı populasyonları kendi aralarındaki karşılaştırıldığında önemli farklılıkların olduğu göze çarpmaktadır. Kullanılan yöntemlere göre elde edilen sonuçlar izohemoglobinlerin önemli ölçüde türlerin yaşadıkları çevreye adaptasyon sağlaması için önemli olduğunu işaret etmektedir.

İzohemoglobinlerin artması ve azalması balık türlerinin yetiştiği ve adapte olduğu çevresel koşullara bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Bu konuyla ilgili yapılan bir takım araştırmalar, Antarktika'nın soğuk sularında yaşamakta olan balık türleri için Hb moleküllerinin azaldığını, ılıman ve sıcak sularda yaşayan balık türleri için ise Hb moleküllerinin arttığını işaret etmektedir. Bu artış ve azalışların oksijen miktarı, suyun pH değeri, sıcaklığı ve kirliliği ile bağlantılı olduğunu söylemek tartışmaya açık olmakla birlikte, mümkün gözükmemektedir (Weber, 2000). Soğuk sulara doğru gidildikçe bu adaptasyonun etkisi ileri düzeyde olacak şekilde kritik değişiklikler göstermektedir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, Notothenioidlerin Cannichthyidae familyası üyelerinin Hb moleküllerini tamamen kaybettiği ve yerine oksijen alımını sağlayacak antifiriz gibi plazma glikoproteinleri içerdiği saptanmıştır (Di Prisco ve Ark., 1988). Bu tür formlarda metabolizmada gözlenen azalmalar kadar, suyun kalitesinde gözlenen ileri düzeydeki artışlar (temizlik, oksijen içeriğindeki artış vs.) böylesi bir uyumun ortaya çıkmasında belirleyici rol oynamaktadır.

Fakat ılıman iklim kuşaklarında durum bunun tam tersine bir oluşum sergilemektedir. Bu bağlamda ayrıntılı olarak bakıldığında *homoterm* olan omurgalıların aksine, *poikloterm* olan balıkların yaşadığı çevresel ortam olan ve oksijen alımında belirleyici olan su kalitesinde bir azalma olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmanın sonuçlarının da ortaya çıkardığı oksijen almak bu tür canlılar için bir zorunluluk olduğunda, çevresel ajana bir tepki olarak hemoglobin çeşidinde bir artış gözlenmektedir. *Homoterm* olan insan dâhil memeli gruplarında

hemoglobinin mutant varyantları ile birlikte toplam sayısı beşi geçmemektedir. Bunlardan uyumsal olanı yalnızca HbA formu kabul edilirken, diğer formların metabolik etkileri henüz araştırılmaktadır.

Hb molekülünün evrimsel süreç içerisinde sağladığı adaptasyon yeteneği, daha çok Antarktik bölgelerde yaşayan balıkların incelenmesi ile açığa çıkarılmıştır. Notothenioid türlerde gözlenen hemoglobin azalmalarını ortaya koyan çalışmalar, aynı ölçüde ılıman iklimsel alanlara uyum sağlamada hemoglobin molekülerindeki artış olup olmadığının belirlenmesi kadar, nedenlerinin ortaya konması için de yeterli gözükmemektedir. Yapılan çalışma belkide bu alanda önemli destekler sunacak veriler içermektedir. Bu çalışmada, Antarktik bölgede yaşayan balık türlerinin Hb moleküllerindeki azalmanın aksine ılıman ve aşırı çevre koşullarında yaşayan balık türlerinin Hb moleküllerinde bir artış olduğu net olarak gözlenmektedir. Henüz kullanmış olduğumuz metodoloji yayınlanmadığı ve tartışılmadığı için, daha kesin ifadeler kullanmak her ne kadar bu aşamada bilimsel mantığa aykırı gibi dursa da, yine de kayda değer gözükmemektedir. Çünkü elde edilen sonuçlar ağırlıklı olarak tek bir yöntem ve buna destek sağlayan diğer iki yöntemin verilerine dayanmaktadır. İzoelektrik uygulama sonuçlarının bir ucu tartışmaya açık dursa da, bunların tümünün hemoglobin proteini olduğuna dair kanıtlar takip eden paragraf içinde yer almakta ve geçerli bir mantık oluşturmaya çalışmaktadır.

Her şeyden önce, izoelektrik alanda yürütüldükten sonra bazı jel örnekler için elde edilen boyanmış bantlara karşılık gelen paralel jeller ile elde edilen band alanları dikkatlice kesilerek SDS-PAGE ortamına aktarıldığında, aktarılan her bandın bir tetramer (dört monomerli-alt üniteli) protein olduğu açıkça gözlenmektedir (Şekil 19–20). Hemoglobin proteini de dört üniteli bir tetramer olduğundan, bu türev bantların tümünün izohemoglobin derivatları olduğunu iddia etmek güçlü bir ihtimaldir. Ama yinede nihai sonuç ancak bir protein dizi analizi ile söylenebilecektir.

Doğal-native jel uygulamasında tüm türler üç doğal band görüntüsünü ortaya koyarken, *G.rufa* türünde bir band fazladan gözlenmektedir (Şekil 14–15). Ama *G.rufa* dâhil tüm türlerde gözlenen üç band her tür için aynı gözükmemektedir.

Native elektroforez tanımlayıcı bir yöntem olmadığından bu sonuçlar normal kabul edilmektedir. Şekil 14'deki 1 no'lu bandın diğer bantların kümelenmesi ile oluşan band topluluğu olduğunu düşünmekteyiz. Asıl majör hemoglobin denilen bandın molekül kütlesi 66 kDa'na karşılık gelen 3 no'lu band olduğunu düşünülmektedir. 2 no'lu band ise ikinci en yaygın minör band olduğu sanılmaktadır. Yapılan çalışmalar bunu destekler niteliktedir (Basaglia F., 2004). Zira Amfibiler dâhil sıcak kanlı tüm homoterm organizmalara kadar uzanan geniş yelpazede aynı model gözlenmektedir. Burada tek farklı olan *G.rufa* türünde gözlenen küçük molekül kütleli fazladan bir band örneğidir. Bu bir veya iki monomerli band gibi durmaktadır. Şu an için ise tanımlaması zor gözükmektedir (Şekil 15). Mied ve Powers, (1977) Killifish, *Fundulus heteroclitus* için yaptığı saflaştırma çalışmasında, nişasta jel elektroforez ortamında hemolizat ile dörtlü band modeli elde ettiği görülmektedir. Bunlardan hemoglobin I, II, III ve IV olarak bahsetmektedir. Saflaştırma işlemini takiben yapılan dizi analizinde bu hemoglobin alt üniteleri ayırt edilerek her birinin (α^a , α^b ile βa , βb ünitelerinden oluşan tetramer olduğunu belirtmektedir.

SDS-PAGE band modelleri analiz edildiğinde gözlenen sonuçlar uygulanan sukroz ve akrilamid gradientine bağlı olarak farklı sonuçlar sunmaktadır. 20 x 20 cm ebatlı SDS-PAGE gel uygulamasında yapılan dört tür için 5 band modeli gözlenmektedir. Fakat bu uygulama % 5, % 10 ve %15'lik akrilamid ve sukroz gradientine bağlı olduğundan, her bir katmanın yeterince mesafe sunmamış olmasına bağlı olarak bantların ayrışmadığı veya başka bir olumsuzluğun olduğu düşünülmektedir (Şekil 16). Aynı şekilde % 5- %10 ve % 20'lik akrilamid uygulamasında band ayrışmasındaki kalitenin azaldığı ve buna paralel band sayısının arttığı (tahminen 10) gözlenmiştir (Şekil 17). Şekil 17 aynı zamanda tür içindeki aynı popülasyon bireyleri arasında SDS-PAGE ile bir band farklılığının olup olmadığının testi olmuştur. Yapılan çalışmanın bir fark vermemesine karşın, kullanılan homojenat fazına bağlı olarak tortudan başka proteinlerinde geçtiği sanılmaktadır. Buna karşın tüm gruplar doğrudan % 10'luk SDS-PAGE ortamında daha uzun mesafeli ayrıştırıldığında daha net bir band ayrışması sergilemiştir (Şekil 18). İlk göze çarpan genel sonuç kontrol grubu dâhil tüm örnekler 8 band

görüntüsü sunmakta ve türler arasında bir farklılık gözlenmemektedir. Kullanılan jelin tam bir ayrıştırma jeli olmaması (yürütülen mesafenin kısa olması) nedeniyle bantların farklılık vermediğini düşünmekteyiz. Fakat SDS-PAGE uygulamasında tüm amino asit çeşit ve farklılıkları SDS molekülü tarafından aynı ölçüde maskelenmiş olmasına bağlı olarak bu farklılık zaten beklenmemektedir. Burada farklılık oluşturacak olan ayrışan alt ünitelerde gözlenen moleküler kütle farklılıklarıdır. Bununda tam olarak gözlenebilmesi daha uzun ayrıştırma jellerinin hazırlanmasını gerektirmektedir ve bu yapılamamıştır. Ancak, Şekil 18'deki sonuç bize doğrudan homojenatin SDS-PAGE ortamına uygulanması ile türler arasında hemoglobin band görünümü açısından bir farkın oluşmadığını söylemektedir. Hemoglobin ile ilgili doğrudan SDS-PAGE uygulamasını kapsayan bir çalışmaya ulaşamadığından, sonuçların burada karşılaştırılması yapılamamıştır. Bu bantların oluşturulmasında yaygın olarak bulunan hemoglobin formları yanında, izohemoglobin denilen her bir alt ünitenin molekül kütledeki farklılığa bağlı olarak aynı alanda yer almış olmasına bağlı olduğunu tahmin edilmektedir. Budanmış veya hiçbir adaptif özelliği olmayan formlarında buradaki ayrışmada rol aldığı düşünülmektedir. Elde herhangi bir alt ünite kontrol örneği (α veya β gibi) olmadığından burada kesin bir sonuçtan bahsedilememektedir. Ama kesin olarak söylenebilecek tek sonucun mevcut sonuçlara göre türlerin bir birinden bir farklılaşma sergilemediği şeklinde olanıdır (Şekil 18). SDS-PAGE sonuçları bu açıdan doğrudan diskriminasyona yönelik bir sonuç sunmamaktadır. Geleneksel uygulamada da ancak izoelektrik uygulamanın devamı olduğunda bir anlam ifade etmektedir.

Bu çalışmanın göze çarpan ve doğrudan farklılık gözlemeye yönelik uygulaması izoelektrik uygulaması ile elde edilen verilerdir. Bu çalışmada kullandığımız yöntem geleneksel izoelektrik uygulamasından birçok yönüyle farklıdır ve etkin sonuç vermektedir. Geleneksel uygulamada yatay olarak hazırlanan nişasta, agar veya asetat üzerinde bir noktaya uygulanan örnek izoelektrik tabakalaşma sunan Amfolit elektrolitler varlığında ayrıştırılmakta. Yani proteinler bir orta noktadan aşağı veya yukarı yönlü olmak üzere uygun alana taşınmaktadır. Böylece proteinler orta noktadan başlandığında bulunduğu

alana taşınma konusunda daha az mesafe kat etmektedir. Ama daha çok da proteinler yükleme tamponu varlığında üst kısma tabakalaştırılmakta ve proteinler net elektrik yükü altında olduğu kadar, geleneksel çekim kuvvetine bağlı olarak taşınmaktadır. Fakat bizim uygulamamızda, proteinler normal jel bileşeni gibi doğrudan jel ortamına katılmakta ve jelin her tarafında rasgele ve eşit dağılmış olan proteinler yüklü amfolitlerin varlığında oluşan gradient etkisine göre, gruplara ve protein çeşitlerine göre gruplaşarak bantlaşma sergilemektedir (Şekil 21–26). Geleneksel yöntemde yer çekimi eşliğinde koşmanın aksine bazıları ise yer çekimine karşı yönde taşınmakla, bantlar daha keskin olarak gözlenmektedir. Bu uygulama ile proteinler Şekil 21'deki *O. mykiss* örneklerindeki gibi bantlar çok keskin ve ayırt edilebilir özelliktedir. Bu yönüyle dahi analiz edilen türlerin izohemoglobin formları, gruplar arasındaki farklılığı gözlemede etkin sonuçlar sunmaktadır. Jel ortamında boyama sonucu elde edilen bantlar ile boyanmayan örneklerdeki karşılık gelen alanlar kesilip, SDS-PAGE aktarılmış ve her bandın dördümlü monomerik ayrışma sergilediği gözlenmiştir. Bu daha önce vurgulandığı gibi bunların tetramer kümeleşme sergilediğini ifade etmektedir. İzoelektrik jel ortamında üre ilave edilmiş olsa bile, aynı özellikteki alt üniteler yine aynı alana göçeceğiinden, her bir bandın dördümlü olarak tekrardan kümeleşmesi ile sonuçlanmaktadır (Şekil 20 ve Şekil 21). Eldeki Disk-Jel Sisteminin su sirkülasyonu eşliğinde ısıtılabilmesi, moleküler mobilitayı, bu ise ayrışmayı daha etkin kılmaktadır.

IEF yöntemi, tek bir amino asit değişimine bile duyarlı bir yöntem kabul edildiğinden, sonuçları da tanımlayıcı olabilmektedir. Protein moleküllerinin daha çok yük değişimlerine göre ayrılmasını sağlaması, hemoglobinin yüklü amino asitlerce görece fazlalığı bu çalışmada bulunması amaçlanan izohemoglobin moleküllerinin tam olarak incelenmesi ve sonuçların doğru alınabilmesi için uygulanmıştır.

Temelde aynı türün farklı populasyon bireyleri kendi içinde topluca karşılaştırıldığı uygulamalarda hiçbir birey diğerinden ayrı durmamaktadır. Diğer çalışılan kontrol ve gruplarda ise şu sonuçlar elde edilmiştir.

Dış grup olarak seçilen *O. mykiss* türü ılıman iklim kuşağında yaşamakta olan balık türleri arasında su kalitesi açısından oldukça yüksektir ve bu türün hemoglobin band modelleri çalışılan türler arasında en az sayıdadır (bkz. Şekil 21). *Oncorhynchus mykiss* türlerinde 6 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin bandı görülmüştür. Türün farklı bireylerinin bant sayılarında bir farklılık olmadığı ve çevresel koşullara uyum sağlayabilmek için aynı özellikte izohemoglobine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 21). Bu bantlardan %50'sinin (3 tanesinin) katodik-bazik, %50'sinin (3 tanesinin) anodik-asidik olduğu saptanmıştır. Bazik ve asidik izohemoglobin miktarları oranlandığı zaman oranın 1 olduğu görülmüştür. Bulunan bu orana göre bireylerin çevresel koşullardan ne kadar etkilendiği ortaya çıkarılmaktadır. Genelde alabalık türleri su kalitesi açısından en iyi koşulları tercih ettiğinden, alınan sonuçlara bakıldığında bu türün bireylerinin bulunduğu bölgeye uyum sağlama bakımından daha az izohemoglobin formuna sahip olduğunu ortaya çıkmaktadır. Sivas Tecer Dağı pınarından alınan *Oncorhynchus mykiss* örneklerinin çevresel koşulları göz önünde bulundurulduğunda, karşılaştırma yapılan diğer gruplar arasında en az oranla etkilendiği bunun nedeninin ise suyun içerisinde bulunan yüksek oksijen miktarı, suyun temizliği ve pH'sı olduğu düşünülmüştür.

G. rufa türünün farklı bireyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında 11 izohemoglobin bant profili görülmüştür. Türün bireyleri arasında yapılan bant değerlendirmelerinde bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Şekil 22). Bantlardan %36,36'sının (4 tanesinin) katodik-bazik pH'da, %63,63'ünün (7 tanesinin) anodik-asidik pH'ya sahip olduğu saptanmıştır. Bazik ve asidik pH' da bulunan bantlar birbirleri ile oranlandıkları zaman oranın 0,571 olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre *G. rufa* 'nın yaşadığı ortama ve su kalitesine bağlı olarak asidik amino asit içeriğince zengin izohemoglobin oranında belirgin bir artış vardır. Bu balığın yaşadığı suyun en önemli kimyasal özelliği suyun her dönem sıcak olmasıdır. Buda suda çözünen oksijen miktarını azalttığından, oksijen alabilme konusunda artan izohemoglobin içeriği mantıklı gözükmektedir.

Aynı çevresel ortamda uyumlu olan *C. macrostomus* türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada, 9 farklı izoelektrik noktaya sahip

izohemoglobin protein bant görüntüsü elde edilmiştir. Değerlendirmelerde türün farklı bireyleri arasında bir bant farklılığı görülmemiştir (Şekil 26). Bulunan bantların, %33,33'ünün (3 tanesinin) katodik-bazik, %66,66'sının (6 tanesinin) anodik-asidik pH'ya sahip olduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre bazik ve asidik izohemoglobinler oranlandığı zaman oranın 0,5 olduğu ortaya çıkmıştır.

Sivas Kangal Balıklı Kaplıcaları Topardıç Deresi'nden alınan *G. rufa* ve *C. macrostomus* türlerinde yapılan incelemelerde, iki grubunda bazik ve asidik izohemoglobinleri oranlandığı zaman 0,5 değeri elde edilmiştir. Bu değer aynı olmasının sebebi iki şekilde yorumlanmıştır. Her ne kadar aynı çevresel koşullarda yaşıyor olsalar da iki farklı genusun türlerinin buldukları ortama farklı şekilde uyum sağladıkları gözlenmektedir. Çünkü *G. rufa* 11, *C. macrostomus* ise 9 izohemoglobin sentezlemektedir. İkinci yaklaşım ise, protein sayısı farklı olsa da, katodik ve anodik proteinlerde gözlenen yaklaşık 0.5'lik değer aynı çevresel koşullardan oksijen alabilme konusunda yeterli olduğudur. Bunun aynı etkiye ve kısıtlamaya maruz kalmanın bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Tödürge Gölü'nde yaşayan *C. carpio* türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada 12 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin protein bantı elde edilmiştir. Değerlendirmelerde türün farklı bireyleri arasında bir bant farklılığı görülmemiştir (Şekil 23). Bulunan bantların, %50'sinin (6 tanesinin) katodik-bazik, %41,6'sının (5 tanesinin) anodik-asidik ve %8,33'ünün (1 tanesinin) nötr pH'da odaklanmış olduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre bazik ve asidik Hb bant miktarları yüzdesi oranlandığı zaman oranın 1,2 olduğu ortaya çıkmıştır.

Şarkışla su gölcüğünde yaşayan *C. carpio* türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada 9 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin protein bant görüntüsü elde edilmiştir. Türün farklı bireylerinde yapılan incelemelerde bulunan Hb bantlarında bir farklılık görülmemiştir (Şekil 24). Bulunan bantların, %22,22'sinin (2 tanesinin) katodik-bazik, %77,7'sinin (7 tanesinin) anodik-asidik pH'da odaklanmış olduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre bazik ve

asidik Hb bant miktarları yüzdesi oranlandığı zaman oranın 0,285 olduğu ortaya çıkmıştır.

Bu aynı türün su oksijen kalitesi açısından farklı olduğu bilinen farklı ortama uyumlu bu iki popülasyonda, bulunduğu çevreye uyum sağlamada tür içi belirgin bir kimyasal farklılaşma sergilenmektedir. Bu, farklılaşan sayıda izohemoglobin üretiminde gözleendiği kadar, amino asit kompozisyonu açısından da farklılık sergilenmektedir. Çünkü Şarkışla *C. carpio* popülasyonunda, Tödürge popülasyonuna göre belirgin bir anodik-asidik amino asit içeriğinde artış gözlenmektedir. Aksine Tödürge Göl popülasyonu daha çok nötral denge yönündedir. Bu açıdan bu türün farklı iki popülasyonunun çevresel koşulda gözlenen dramatik değişikliğe vermiş olduğu tepkinin temelinde, hemoglobin proteininin kimyasal farklılaşma yatmaktadır. Zira Şarkışla popülasyonu oldukça yoğun kirli bir sazlıkta yaşamaktadır. Bu oksijen kalitesinin ve pH'nın nötral değerinin altında ve hafif asidite yönünde olmasına bağlı olarak, popülasyon bireyleri anodik-asidik amino asit içeriğini artırmaktadır. Tödürge Göl popülasyonu ise alkali bir suda yaşıyor olması nedeniyle burada ise katodik-bazik yönde göreceli olarak bir artış göze çarpmaktadır. Burada pH'daki göreceli olarak düşüşün oksijen çözünürlüğünde belirgin bir azalışı meydana getiriyor olması, balıkların anodik-asidik amino asit içeriğini artırma yönünde uyum gücü geliştirmelerinde, bizi **Seçilim Ajanı** olarak iş gördüğünü söylemine yönlendirmektedir. Zira *G. rufa* ile *C. macrostomus*'ta elde edilen 0,5 değeri ile bunlardaki pH'nın yaklaşık olarak nötral değere yakın olması bu beyanımızı destekler niteliktedir. Bunun oksijen bağlamaktan çok, dokulara ulaşıldığında, oksijeni dolaşımdan hücreye aktarmada fizyolojik bir uyumsal tepkinin sonucu olduğu bilinmekte ve söylenmektedir (Weber, 1990; 1996).

C. tarichi türünün farklı bireylerinde yapılan karşılaştırmada 8 farklı izoelektrik noktaya sahip izohemoglobin protein bantı elde edilmiştir. Türün farklı bireylerinde yapılan incelemelerde bulunan Hb bantlarında bir farklılık görülmemiştir (Şekil 25). Bulunan bantların, %37,5'unun (3 tanesinin) bazik, %62,5'unun (5 tanesinin) asidik pH'da odaklandığı hesaplanmıştır. Bu

hesaplamaya göre bazik ve asidik izohemoglobinler oranlandığı zaman oranın 0,6 olduğu ortaya çıkmıştır.

Burada elde edilen sonuç, yukarıdaki çıkarsamalarla az da olsa çakışıyor gözükse de, artan alkali oranı ile oksijen çözünürlüğü, asidik pH'ya göre daha az etkilemesi beklenir (çünkü alkali ortam çözünen CO₂ yi daha hızlı etkisizleştirerek, moleküler oksijen çözünürlüğüne ortam sunacak, asidik pH ise daha çok CO₂ içerdiğinden, oksijen çözünürlüğünü azaltacaktır). Burada asıl nedenin çözünen oksijen miktarı ve bunun **Bohr Etkisi, Root Etkisi** ile **İyonik Fosfat etkisi** denilen ayrışmaya sunduğu katkıdır. Birazdan tartışılacağı gibi etkiler bununla da sınırlı değildir. Genel bir sonuca gitmek gerekirse, balık türleri çevresel olarak maruz kaldıkları aşırı koşullara, genel anlamıyla anodik-asidik amino asit kompozisyonu ile yanıt vermektedir.

Bulunan oranlara göre; *O. mykiss* kontrol grubu olarak seçilmiş olmasına bakıldığında diğer türlerin çevresel koşullarına kıyasla daha iyi bir ortamda uyumlu olduğundan katodik ve anodik Hb bantlarının miktarlarının birbirlerine olan oranının (**C/A=1**) eşit olduğu belirlenmiştir. Bu değere en yakın duran Tödürge *C. carpio* popülasyonudur (**C/A=1.2**). Bu popülasyon su pH kalitesi açısından alkali durmakta ve diğer iyonik özellikleri karstik göl kökeni nedeniyle bazı farklılıklar sunmakta, fakat oksijen çözünürlüğü daha iyi durumda bulunmaktadır. Bu açıdan izohemoglobin sayısı ve kimyasal özellikleri açısından *O. mykiss*'in vermiş olduğu çevresel tepkilere benzer tepkiler sunmaktadır. *G. rufa*, *C. macrostomus*, *C. tarichi* ve Şarkışla *C. carpio* türlerinin katodik ve anodik Hb bant miktarlarının birbirlerine benzer olan oransal düzenlemeye sahip olması, bu türlerin çevresel kısıtlamalara maruz kaldığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu dört türde C/A oranı 0–1 arasında değişiklik göstermektedir. Dört türde gözlenen söz konusu çevresel kısıtlama şüphesiz ki oksijen çözünürlüğündeki düşüştür. Şarkışla *C. carpio* türünde ise bu oranın 0.285'e düşmesi, çevresel koşulları zor olan bu türün en fazla etkilendiğini göstermiştir. Topluca bakıldığında oksijen çözünürlüğü açısından katodik/anodik dengenin 1'e yaklaşması, yük dağılımı açısından dengeli bir hemoglobin yapısı oluşumu ortaya koymakta. Tödürge Göl'ündeki *C. carpio* popülasyonu ise alkali özelliğine

karşın halen oksijen içeriğindeki yüksekliğe bağılı olarak C/A dengesi 1'e yakın durmasına yol açmaktadır. Diğer türlerde sıcaklık veya görece olarak pH'daki düşüşler ve diğer gerekçeler oksijen çözünürlüğünü düşürdüğünde ise, türler veya bazen populasyonlar buna asidik amino asit içeriğini artıran bir hemoglobin yapısı ($C/A < 1$ 'e) ile uyumsal özellik sergilemektedir. Aynı zamanda bu uyumsal özellik değişen izohemoglobin sayısında da farklılık sergilemektedir.

İzoelektrik odaklama ile saptanan bu kadar etkin varyasyon bizi başlangıçta şaşırtmıştır. Bu yüzden yöntemin etkinliği kontrol etmek için bir takım uygulamalar yapmak durumunda kaldık. İlk iş olarak moleküler belirteç için kullanılan protein örneği aynı koşullarda üre varlığında yürütülmüştür. Çünkü ortamda üre varlığına bağılı olarak, uygulanan örneklerin türün sunmuş olduğu band modeli dışında, bir girişime bağılı olarak olumsuzluk olup olmadığı ile ilgili şüphelerin ortadan kaldırılması gerekiyordu. Bu amaçla moleküler belirteç gerek katalog bilgisinde, gerekse doğal koşullarda 9 band sunduğundan, izoelektrik alanda da aynı sayıda band sunmakta idi (Şekil 18 ve 43c). Ticari olarak elde edilen HbA₂ ve miyoglobin de beklendiği şekilde bir olumsuzluk vermemiş, geçerli band modelleri oluşturmuşlardır (Şekil 43b). Aynı zamanda insan kanından da hemoglobin saflaştırılmış ve insan için beklenen 3 band modeli (Şekil 43a) oldukça belirgin ve net olarak gözlenmiştir. Bu sonuç aynı zamanda izolasyona bağılı bir protein kırılmasının olup olmadığının da doğrulaması kabul edilmiştir. Zira aynı yöntem balıklar içinde kullanıldığından, burada gözlenen band farklılığı kullanılan yöntemin genel bir olumsuzluğu olamayacağını kanıtı olmaktadır.

Peki, burada elde edilen sonuçların moleküler dinamikleri neler olabilir. Bununla ilgili güncel bir çalışma olmasa da, bazı ders kitapları ve burada yer alan kaynaklar (oldukça eski olduklarından, mevcut yayın tarayıcılar tarafından elde edilememiştir) bu konuya yaklaşım sunmaktadır.

İnsan ve memelilerin temel bir hemoglobin bileşeni içermelerinin aksine, balık ve diğer düşük omurgalı formlarında çoklu hemoglobinlerin varlığı kabul edilmiş bir olgu olarak sunulmaktadır. Balıkların hemoglobin çeşitliliği (aynı bireyde farklı veya aynı gelişimsel biyolojisine bağılı olarak meydana gelen farklı

“izohemoglobinler”) ve hemoglobin polimorfizmi (aynı türün genetik olarak farklı nesillerin farklı “allohemoglobinleri”) içerdiği öteden beri bilinmektedir. Bu çeşitlilik ya genetik-ilişkili heterojenite (gen aktivitesindeki varyasyon) veya genetik olmayan heterojenite (*in vivo* veya *in vitro* kimyasal modifikasyon) sonucu oluşabilmektedir (Weber, 1990). Fakat bunların gerçek sayıları, özellikleri ve türe özgü bileşenlerinin yapısal ve işlevsel özellikleri ile ilgili tutarsızlıklar göze çarpmaktadır. Bu farklılıkların temelinde, ısısal-iklimsel faktörler, gelişimsel farklılıklar ve hemolizat eldesinde kullanılan yöntemin yol açabileceği protein polimerizasyon farklılıkları, protein ayrışmaları ve oto-oksidasyona maruz kalmanın bu tür bir varyasyonla sonuçlanacağından bahsedilmektedir (Mied ve Powers, 1978). Fakat bu son vurgulanan olumsuzluklar daha çok eskiden kullanılan yöntemdeki aksaklıklara bağlı olarak gözlenmekte idi. Yaptığımız çalışma da gerekli kontrol çalışmaları eklenerek bu tür olumsuzlukların meydana gelmediği, sonucuna varılmıştır. Bu durumda gözlenen varyasyon yaşanan çevresel ortama uyumsal bir tepkinin sonucu olduğunu kabul etmek durumundayız.

Hemoglobin çeşitliliğine bağlı olarak teleostat balıklar üç temel sınıfta toplanmıştır.

Sınıf: Normal Bohr, Root, fosfat ve sıcak etkilerine sahip olan Anodal Hemoglobinler. Bunlar sazanları kapsadığından, bizim sazan örnekleri bu sınıf içinde sınıflandırılmaktadır. *C. macrostomus*, *G.rufa*, *C. tarichi* ve Tödürge *C.carpio* bu sınıf içinde yer almaktadır.

Sınıf: Anodal ve Kathodal Hemoglobinleri kapsamakta olup, yüksek oksijen yatkınlığı sergilemekte olan küçük fakat çoğunlukla geri dönüşlü Bohr etkisi (bu yolla düşük pH’da yüksek yatkınlık elde edilmektedir) ve düşük sıcaklık duyarlılığı sergilemektedir. Bunlar genellikle alabalıkları kapsamaktadır. Bu sonuca bağlı olarak *O. mykiss* bu sınıfı temsil etmektedir. Tödürge *C. carpio* bu tanımlama kriterlerine göre bu sınıfta yer almaktadır. Fakat yine de Tödürge popülasyonunun su sıcaklığı alabalık sıcaklığı ile her dönem aynı olmadığından, bu sınıfa konulsa da, bu statü tartışmalıdır.

Sınıf: pH duyarlı gözükten fakat sıcaklığa duyarsız olanlar. Bunlar genellikle kırmızı etli ve warm-bodied (sıcak bedenli) olarak bilinen orkinosları kapsamaktadır (Weber, 1990; 1996). Sıcak bedenli kabul edilen bu balıklarla birlikte hemoglobin sayısında memelilere gidildikçe bir azalma kadar, yük dengesinde de bir eşitlenme gözlenmektedir. Yaptığımız çalışmalar da bu paraleldedir.

Hemoglobin molekülünün oksijenasyonu ekzotermik (ısı üreten) bir reaksiyon süreci olup, Hb bir ısı taşıyıcısı olarak bilinir. Dokularda oksijen yüklü olmadığı durumda soğurulmuş olan ısı, oksijenleşmenin olduğu dokularda serbest bırakılır. Oksijenasyonun ekzotermik doğası gereği sıcaklıktaki bir artış, oksijen yatkinliğini doğrudan düşürecektir. Ayrıca, Bohr etkisine katılan grupların sağlamış olduğu yüklerin asit-baz statüsündeki sıcaklık bağımlılığı ile pH azalışlarına bağılı olarak oksijen yatkinlikleri etkilenme sergilemektedir. Bütün bu süreç hemoglobin merkezinde oksijen bağlayan gruplardan çok, hemoglobinin oksijenasyonuna yol açan ve hemoglobin molekülünün allosterik konformasyonundan sorumlu diğere yüklü gruplar üzerinde gerçekleşmekte ve bunlar Bohr ve Root etkisi denilen etkileşimlere katılmaktadır. Bohr etkisi oksijenin solungaçlarda bağlanıp dokularda serbestlenmesine eşlik eden grupların pH davranışlarını açıklarken, Root etkisi eritrositlerin düşük oksijen koşulunda düşük pH ortamına oksijen transfer sürecini açıklamaktadır.

Son olarak analiz edilen türlerin hemoglobin homolojisi ve farklılaşmalarına bağılı olarak, izoelektrik alanda elde edilen band modelleri, pH dağılımına bağılı olarak veriler bir matris formuna, buradan da filogenetik ağaca döküldüğünde, Şekil 44'deki ağaç elde edilmiştir. pH 8.5' e karşılık gelen bandın baskın hemoglobin ve daha çok bazik amino asitle yüklü olduğunu göstermektedir. pH 6.5 ve diğere düşük pH'lar için paylaşılanların ise anodik amino asit dağılımını ifade etmektedir. Yapılan çalışma da *O. mykiss* mevcut verilere bağılı olarak, başlangıç için öngörülen dış grup formülasyonu ile uyumlu bulunmaktadır. Ağacın sunduğu en çarpıcı sonuç ise, aynı ekolojik koşulu paylaşan iki farklı genusun birbirine uzak durmasıdır. *C. carpionun* tür içindeki farklılaşması ise, ekolojik farklılaşmanın bir başka örneğini oluşturmaktadır.

Sonuç olarak tez projesinde önerildiği gibi, ekolojik koşulları açısından oldukça sınırlayıcı özelliklere sahip farklı çevresel koşullara uyumlu olan farklı ve aynı türlerin, yaşam koşulları açısından daha elverişli olan türlere göre hemoglobin proteininde bir varyasyon olduğu göze çarpmaktadır. Türler Antartik balıkların aksine ılıman koşullarda yaşayan türlerin sergilediği türden izohemoglobin çeşitliliğinde bir artış sergilemekte ve hatta bu çeşitlilik aynı türün farklı adaptif popülasyonlarında dahi gözlenmektedir. Balık türlerinde farklılaşan çevre koşullarına bağlı olarak anodik protein içeriği artarken C/A oranında genel olarak bir azalma olmaktadır. Çevresel kısıtlayıcı ne olursa olsun, azalan oksijen miktarı buradaki en belirgin seçim ajanı olarak iş görmektedir. İlgili varyasyonunun protein düzeyde gözlenmesinde kullandığımız izoelektrik yöntemi oldukça etkin sonuçlar sunmaktadır. Çalışma her ne kadar protein saflaştırması ve protein dizi analizleri gibi ilave teknikleri gerektirse de bu haliyle de farklı çevresel koşullara uyumlu türlerin hemoglobin varyasyonunu saptamada yeterli gözükmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Aguilata, G., Bielawski, J. And Yang, Z. (2006).** Evolutionary rate among vertebrate beta globin genes: Implications for dating gene family duplication events. *Gene: Section Evolutionary Genomics*. 380: 21-29.
- Andersson, C.R., Jensen, E.O., Llewellyn, D.J., Dennis, E.J. (1996).** Peacock, A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5682e5687.
- Antonarakis, S.E., Kazazian, H.H., Orkin, SH., (1985).** DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet.* 69:1-14
- Appleby, C.A., Bogusz, D., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (1997).** A role for hemoglobin in all plant roots? *Plant Cell Environ.*, 11: 359e367.
- Arredondo-Peter, M.S., Hargrove, J.F., Moran, G., Sarath, R.V. (1998).** Plant hemoglobins: what we know six decades after their discovery, *Gene* 398 78e85.
- Atiker, M. (1993).** Tödürge (Demiryurt) Gölü. *Bilim ve Teknik Dergisi*, Ağustos, 625-626.
- Balushkin, A.V. (1992).** Classification, phylogenetic relationships, and origins of the families of the suborder Notothenioidei (Perciformes). *Journal of Ichthyology* 32, 90–110.
- Bardakci, F., Degerli, N., Ozdemir, O. (2006).** Phylogeography of the Turkish brown trout *Oncorhynchus mykiss* L.: mitokondrial DNA PCR-PFLP variation. *Journal of Fish Biology* Volume: 68 Pages: 36-55 Supplement: Suppl. A Published: MAR Time Cited: 5.
- Bargelloni, L., Ritchie, P.A., Patarnello, T., Battaglia, B., Lambert, D.M. (1994).** Molecular evolution at subzero temperatures: mitochondrial and nuclear phylogenies of fishes from Antarctica (suborder Notothenioidei), and the evolution of antifreeze glycopeptides. *Molecular Biology and Evolution* 11, 854–863.

- Basaglia, F. (2004).** Comparative study of electrophoretic and isoelectrophoretic characteristics of osteichthyan and amphibian hemoglobin. *Ital. J. Zool.*, 71:287-295.
- Bollag, M., Rozycki, D., Edelstein, J. (1996).** *Protein Methods Book*. Wiley- liss New York, Page: -107-156-173.
- Bolognesi, M., Bordo, D., Rizzi, M., Tarricone, C., Ascenzi, P. (1997).** Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol*, 68:29-68.
- Brittain, T. (2005).** Root effect hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.* 99: 120-129.
- Brown, J.L., Ingram, V.M. (1974).** Structural studies on chick embryonic hemoglobins. *J. Biol. Chem.* 249, 3960–3972.
- Bunn, H.F., Forget, B.G. (1986).** *Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects*. W.B. Saunders Com., Philadelphia.
- Cheng, C-H.C., Chen, L., Near, T.J., Jin, Y. (2003).** Functional antifreeze glycoprotein genes in temperate-water New Zealand nototheniid fish infer an Antarctic evolutionary origin. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1897–1908.
- Chui, D.H.K., Hardison, R.C., Riemer, C.R., Miller, W. (1998).** An Electronic Database of Human Hb Variants of The World Wide Web. *Blood*, 91: 2643-2644.
- Cooper, S.J.B., Wheeler, D., Hope, R.M., Dolman, G., Saint, K.M. (2005).** The -globin gene family of an Australian marsupial *Macropus eugenii*: long evolutionary history of the globin gene and its functional status in mammals. *J. Mol. Evol.* (in press).
- Czelusniak, J., Goodman, M., Hewett-Emmett, D., Weiss, M.L. (1982).** Phylogenetic origins and adaptive evolution of avian and mammalian haemoglobin genes. *Nature* 298, 297–300.
- De Oliveira, C., Taboga, S.R., Smarra, A.L., Bonilla-Rodriguez, G.O. (2001).** Microscopical aspects of accessory air breathing through a modified stomach in the armoured catfish *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytobios*; 105: 153-162.

- De Young, A., Kwiatkowski, L.D., Noble, R.W. (1994).** Methods Enzymol. Department of Medicine, State University of New York at Buffalo. PMID: 8041247 [PubMed - indexed for MEDLINE], 1994;231:124-50.
- Degens, E.T. (1978).** The Geology of Lake Van, MTA yayınları No:169, Ankara.
- Demirsoy, A. (1999).** Genel ve Türkiye Zoocoğrafyası “Hayvan Coğrafyası”. Meteksan A.Ş., Ankara. 3. Baskı, Yayın no: 98-06-0057-01, ISBN: 975-7746-26-6.
- Di Prisco, G., Giardina B., D’Avino R., Condo S.G., Bellelli A. (1988).** Antarctic fish hemoglobin: an outline of the molecular structure and oxygen binding properties-II. Oxygen binding properties. Comparative Biochemistry and Physiology 90B, 585–591.
- Di Prisco, G. (1998).** Molecular adaptation of Antarctic fish hemoglobins. In: di Prisco, G., Pisano, E., Clarke, A. (Eds.), Fishes of Antarctica. A Biological Overview. Springer, Milano, pp. 339–353.
- Eastman, J.T. (1993).** Antarctic Fish Biology: Evolution in A Unique Environment. Academic Press Inc., San Diego.
- Eberhard, P. (2000).** Color atlas of genetics, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Ekemen, T. (2001).** Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, Seri A-Yerbilimleri Bölüm:18
- Emery, A.E.H., Mueller, R.F. (1992).** Elements of Medical Genetics. 8.th ed., Churchill Livingstone Com., London.
- Freitas, T.A., Dioum, E.M., Saito, J.A., Newhouse, J., Gonzalez, G. (2004).** Ancestral hemoglobins in Archaea. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 6675-6680.
- Fushitani, K., Higashiyama, K., Moriyama, E.N., Imai, K., Hosokawa, K. (1996).** The amino acid sequences of two α chains of hemoglobins from Komodo dragon *Mu-anus komodoensis* and phylogenetic relationships of Amniotes. Mol. Biol. Evol. 13, 1039–1043.
- Garrocho-Villegas, V., Gopalasubramaniam, S.K., Arredondo-Peter, R. (2007).** Plant hemoglobins: what we know six decades after their discovery, Gene 398, 78e85.

- Giles, M.A., Vanstone, W.E. (1976).** Ontogenetic variation in the multiple hemoglobins of coho Salmon and effect and environmental factors on their expression *J.Fish Canada* 33, 1144-1149.
- Goodman, M., Miyamoto, M.M., Czelusniak, J. (1987).** Pattern and process in vertebrate phylogeny revealed by coevolution of molecules and phylogenies. In: Patterson, C. (Ed.), *Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or Compromise?* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 140–176.
- Hagopian, H.K., Ingram, V.M. (1971).** Developmental changes of erythropoiesis in cultured chick blastoderms. *J. Cell Biol.* 51, 440–451.
- Hardison, R.C., Margot, J.B. (1984).** Rabbit globin pseudogene psi beta 2 is a hybrid of delta- and beta-globin gene sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1, 302–316.
- Hardison, R.C. (1998).** Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 8), 1099–1117.
- Hardison, R.C., Chui D.H., Riemer, C., Giardine, B., Lehvaslaiho, H. (2001).** Databases of Human Hemoglobin Variants and Other Resources at the Globin Gene Server. *Hemoglobin*, 25:183-193.
- Hashimoto, K., Matsuura, F. (1960).** Comparative studies on hemoglobins salmon. V. Change in proportion of hemoglobins with growth. *Bull. Jpn. Soc, Sci, Fish* 26, 931-937.
- Hayasaka, K., Fitch, D.H., Slightom, J.L., Goodman M. (1992).** Fetal recruitment of anthropoid gamma-globin genes. Findings from phylogenetic analyses involving the 5'-flanking sequences of the psi gamma 1 globin gene of spider monkey *Ateles geoffroyi*. *J. Mol. Biol.* 224, 875–881.
- Hill, D.R., Belbin, T.J., Thorsteinsson, M.V., Bassam, D., Brass, S. (1996).** GlbN (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc* spp. *J Bacteriol*, 178:6587-6598.
- Hrbek, T., Meyer, A. (2003).** Closing of the Tethys Sea and the phylogeny of eurasian killifishes (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). *Journal of Evolution Biology*. 16(2003) 17-36.

- Huisman, T.H.J. (1986).** The Hemoglobinopathies. Churchill Livingstone Com., Edinburgh.
- Huisman, T.H.J. (1993).** The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins. *Baillieres Clin Haematol*, 6:1-30.
- Huisman, T.H.J. (1995).** Human Hemoglobin. (Blod Disease of Infancy and Childhood. 7.th ed., Mosby- Year Book. Inc., St Louis: Ed. Miller, D.R., Baehner, R.L).
- Ingram, V.M. (1956).** A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*, 178:792-794.
- Jensen, F.B., Fago, A. And Weber, R.E. (1988).** Hemoglobin structure and function. *Fish Physiology*. Vol. 6. page:1-31.
- Katsuhiko, Y. (1973).** Starch-gel Elektrophoresis of Hemoglobins of Freshwater Salmonid Fishes in Northeast Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 39(4) 449-459.
- Kempe, S., Khoo, F., Gürleyik, Y. (1978).** Hydrography of Lake Van, The Geology of Lake Van , E. T. Degens and F. Kutman Eds, MTA Yayınları, No: 169 s.30 -43.
- Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Phillips, D.C. (1958).** A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature*, 181: 662-666.
- Kennett, J.P. (1977).** Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the Circum-Antarctic Ocean, and their impact on global paleoceanography. *J. Geophys. Res.* 82, 3843–3860.
- Kılıç, N. (Çev. Ed.) (2005).** Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Palme Yayıncılık, Ankara. (Nelson Dl., Cox MM.: Lehninger Principles of Biochemistry)
- Kılınç, S., Dere, Ş., Sivacı, R. (2007).** Tödürge Gölünün (Sivas) Epilitik Diatom Florasının Mevsimsel Değişimi. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. Cilt/Volume 24, Sayı/Issue (1-2): 45–50
- Landini, G.F., Schwantes, A.R., Schwantes, M.L. (2002).** *Astyanax scabripinnis* (Pisces: Characidae) hemoglobins: structure and function. *Braz J Biol*; 62: 595-599.

- Lehmann, H., Huntsman, R.G. (1974).** Man's hemoglobins. Amsterdam: North-Holland.
- Levin, B. 2000.** Genes VII. Oxford University Press.
- Lukens, J.N., Lee G.R. (1993).** The Abnormal Hemoglobins. (Wintrobe's Clinical Hematology, Lea and Febiger Com., Pennsylvania: Ed. Lee, G.R.,
- Maruyama, K., Yasumasu, S., Naruse, K., Mitani, H., Shima, A., Iuchi, I. (2004).** Genomic organization and developmental expression of globin genes in the teleost *Oryzias latipes*, 335: 89-100.
- Mied, P.A., and Powers, D.A. (1977).** Hemoglobins of Killifish *Fundulus heteroclitus*: separation, characterization and a model for the subunit compositions. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 253. No. 10, 3521-3528.
- Milani, M., Pesce, A., Nardini, M., Ouellet, H., Ouellet, Y., Dewilde, S., Bocedi, A., Ascenzi, P., Guertin, M., Moens, L., Friedman, J.M., Wittenberg, J.B., Bolognesi, M. (2005).** Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. J. Inorg. Biochem. 99, 97–109.
- Molecular evolution at subzero temperatures: mitochondrial and nuclear phylogenies of fishes from Antarctica (suborder Notothenioidei), and the evolution of antifreeze glycopeptides. Molecular Biology and Evolution 11, 854–863.
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965).** On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J Mol Biol, 12:88-118.
- Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J., Wells, I.C. (1956).** Sickle-cell anemia: a molecular disease. Science, 110:543-548.
- Perutz, M.F., Kendrew, J.C., Watson, H.C. (1965).** Structure and function of haemoglobin II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. J Mol Biol, 13: 669-678.
- Perutz, M.F. (1979).** Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. Annu. Rev. Biochem. 48, 327–386.

- Perutz, M.F. (1990).** Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Prirodina, V. (1998).** Chromosome diversification in Antarctic fish (Notothenioidei). In: di Prisco, G., Pisano, E., Clarke, A. (Eds.), Fishes of Antarctica. A Biological Overview. Springer, Milano, pp. 275–285.
- Proudfoot, N.J., Gil, A., Maniatis, T. (1982).** The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell* 31, 553–563.
- Reichert, E.T., Brown, A.P. (1909).** The differentiation and specificity of corresponding proteins and other vital substances in relation to biological classification and organic evolution: the crystallography of hemoglobin. Carnegie Institution of Washington, publication number 116.
- Riggs, A. (1979).** Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes: An overview. *Comp Biochem Physiol A*; 62: 257-271.
- Şengör, A.M.C., Yılmaz, Y. (1981).** Tethyan evolution of Turkey: a plate tectonic approach. *Tectonophysics*, 75, 181-241.
- Şengör, A.M.C., Yılmaz, Y. (1983).** Türkiyede Tetis'in evrimi: Levha tektoniği açısından bir yaklaşım. Türkiye Jeoloji Kurumu, Yerbilimleri Özel Dizisi No:1, 1-75.
- Swofford, D.L. (1997).** PAUP* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony Sinauer Associates. Phylogenetic analysis using parsimony
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994).** Clustalw: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E. (1997).** Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul. (Champe, P.C., Harvey, R.A. 1994. Biochemistry.)

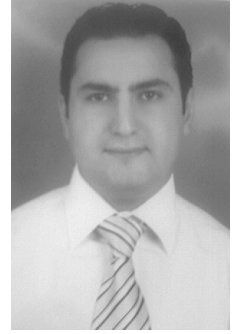
- Val, A.L. (1996).** Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (Editors), Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon. Manaus: INPA; p 59-73.
- Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R. (2006).** A phylogenomic profile of globins. BMC Evol. Biol. 6, 31.
- Vuletich, D.A., Lecomte, J.T. (2006).** A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins. J. Mol. Evol. 62, 196–210.
- Weber, R.E., DeWilde, J.A.M. (1976).** Comp. Biochem. Physiol. 54B, 433-437 .
- Weber, R.E. (1990).** Functional significance and structural basis of multiple hemoglobin with special reference to ectothermic vertebrates.. In “Animal Nutrition and Transport Processes. 2. Transport, Respiration and Excretion: Comparative and Environmental Aspects” pp. 58-75. Karger, Basel.
- Weber, R.E. (1990).** Hemoglobin adaptasyon in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. In “ Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon”. Pp. 75-90. Brazil.
- Weber, R.E. (2000).** Adaptations for oxygen transport: lessons from fish hemoglobins. In: di Prisco, G., Giardina, B., Weber, R.E. (Eds.), Hemoglobin Function in Vertebrates, Molecular Adaptation in Extreme Environments. Springer, Milano, pp. 23–37.
- Weber, RE, Vinogradov, S.N. (2001).** Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. Physiol Rev 2001, 81:569-628.
- Wilkins, 1985.** International Review of Cytology volume: 94 sayfa 289
- Wittenberg, J.B., Bolognesi, M., Wittenberg, B.A., Guertin, M. (2002).** Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. J Biol Chem, 277: 871-874.
- Yamanaka, H., Yamaguchi, K. (1965).** Jap. Soc. Sci. Fish. 31, 827-832.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burçin ZÖNGÜR

Doğum Yeri: : Sivas

Doğum Tarihi: :10.08.1984



Öğrenimi Hakkında

Lise: 1998–2001, H. M. Sabancı Lisesi

Lisans: 2002–2006 Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü.

Yüksek Lisans: 2006-, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D

Yabancı Dil: İngilizce

EK-1

Bradford Assay yöntemiyle, O. mykiss, Şarkışla ve Tödürge C. carpio, Kangal Balıklı Kaplıca balıkları Garra rufa ve C. macrostomus, Van Gölü C. tarichi türlerdeki absorbans değerlerinden hesaplanan total Hb protein miktarları.

Tür ismi	absorbans	y=ax+b x değerleri	µg/µl	1 ml içindeki Total protein miktarı (µg)
1. <i>Garra rufa</i>	0,945±0,008	70,86	0,35	350
2. <i>Garra rufa</i>	0,966±0,005	7263	0,36	360
3. <i>Garra rufa</i>	0,887±0,006	66	0,33	330
4. <i>Garra rufa</i>	0,594±0,009	41,63	0,20	200
5. <i>Garra rufa</i>	0,747±0,024	54,38	0,27	270
6. <i>Garra rufa</i>	0,705±0,028	50,88	0,25	250
7. <i>Garra rufa</i>	0,799±0,012	58,72	0,29	290
8. <i>Garra rufa</i>	0,582±0,049	40,63	0,20	200
9. <i>Garra rufa</i>	0,846±0,033	62,6	0,31	310
10. <i>Garra rufa</i>	0,815±0,051	60	0,30	300
1. <i>C. macrostomus</i>	0,981±0,008	73,88	0,73	730
2. <i>C. macrostomus</i>	0,839±0,006	62,02	0,62	620
3. <i>C. macrostomus</i>	0,710±0,012	51,25	0,51	510
4. <i>C. macrostomus</i>	0,688±0,04	49,4	0,49	490
5. <i>C. macrostomus</i>	0,706±0,05	50,9	0,50	500
6. <i>C. macrostomus</i>	0,815±0,04	60,5	0,60	600
7. <i>C. macrostomus</i>	0,708±0,008	51,6	0,51	510
8. <i>C. macrostomus</i>	0,870±0,007	61,8	0,61	610
9. <i>C. macrostomus</i>	0,818±0,009	60,25	0,60	600
10. <i>C. macrostomus</i>	0,741±0,016	53,88	0,53	530
1. <i>C. tarichi</i>	0,559±0,018	72,02	1,44	1440
2. <i>C. tarichi</i>	0,926±0,007	69,25	1,38	1380
3. <i>C. tarichi</i>	0,984±0,004	74,08	1,48	1480
4. <i>C. tarichi</i>	0,971±0,005	73	1,46	1460
5. <i>C. tarichi</i>	0,981±0,016	73,88	1,47	1470
6. <i>C. tarichi</i>	0,985±0,009	74,22	1,48	1480
7. <i>C. tarichi</i>	0,792±0,012	58,08	1,16	1160
8. <i>C. tarichi</i>	0,804±0,005	59,1	1,19	1190
9. <i>C. tarichi</i>	0,992±0,004	74,7	1,49	1490
10. <i>C. tarichi</i>	0,950±0,004	71,3	1,42	1420
11. <i>C. tarichi</i>	0,816±0,006	60,1	1,20	1200
12. <i>C. tarichi</i>	0,990±0,004	74,5	1,49	1490
13. <i>C. tarichi</i>	0,992±0,006	74,7	1,49	1490
14. <i>C. tarichi</i>	0,889±0,011	67,02	1,34	1340
15. <i>C. tarichi</i>	0,992±0,004	74,3	1,48	1480
16. <i>C. tarichi</i>	0,996±0,016	75,1	1,50	1500
17. <i>C. tarichi</i>	0,994±0,008	74,9	1,48	1480
1. <i>Ş. C. carpio</i>	0,601±0,03	42,2	0,84	840
2. <i>Ş. C. carpio</i>	0,520±0,02	35,4	0,70	700

3. <i>Ş. C. carpio</i>	0,408±0,006	26,08	0,52	520
4. <i>Ş. C. carpio</i>	0,363±0,053	22,36	0,44	440
5. <i>Ş. C. carpio</i>	0,463±0,005	30,69	0,61	610
6. <i>Ş. C. carpio</i>	0,504±0,002	34,1	0,68	680
7. <i>Ş. C. carpio</i>	0,424±0,005	28,25	0,56	560
8. <i>Ş. C. carpio</i>	0,407±0,006	26,05	0,52	520
9. <i>Ş. C. carpio</i>	0,885±0,008	65,86	1,3	1300
10. <i>Ş. C. carpio</i>	0,767±0,003	56	1,12	1120
11. <i>Ş. C. carpio</i>	0,954±0,054	71,6	1,43	1430
12. <i>Ş. C. carpio</i>	0,985±0,007	74,1	1,48	1480
1. <i>T. C. carpio</i>	0,921±0,014	68,86	1,36	1360
2. <i>T. C. carpio</i>	0,887±0,008	66	1,32	1320
3. <i>T. C. carpio</i>	0,761±0,017	55,5	1,11	1110
4. <i>T. C. carpio</i>	0,955±0,004	71,7	1,43	1430
5. <i>T. C. carpio</i>	0,914±0,006	68,3	1,36	1360
6. <i>T. C. carpio</i>	0,940±0,038	70,4	1,40	1400
7. <i>T. C. carpio</i>	0,906±0,005	67,5	1,35	1350
8. <i>T. C. carpio</i>	0,967±0,005	72,6	1,45	1450
9. <i>T. C. carpio</i>	0,959±0,008	72	1,44	1440
10. <i>T. C. carpio</i>	0,858±0,004	63,5	1,26	1260
11. <i>T. C. carpio</i>	0,983±0,009	74	1,48	1480
12. <i>T. C. carpio</i>	0,975±0,008	73,3	1,46	1460
13. <i>T. C. carpio</i>	0,963±0,008	72,3	1,44	1440
1. <i>O. mykiss</i>	0,589±0,004	41,16	3,65	3650
2. <i>O. mykiss</i>	0,981±0,006	73,8	3,69	3690
3. <i>O. mykiss</i>	0,967±0,007	72,7	1,454	1454
4. <i>O. mykiss</i>	0,872±0,009	64,7	1,28	1280
5. <i>O. mykiss</i>	0,879±0,012	65,3	1,30	1300