

**BAZI *ORTHRIAS* (ÇÖPÇÜ BALIĞI)
TÜRLERİNİN BİYOİNFORMATİK VE DENEYSEL
KARAKTERİZYONU**

Cem ÖZİÇ
Doktora Tezi

Biyoloji Bilim Dalı
Nisan-2012

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1002F60



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Cem ÖZİÇ'in “**Bazı *Orthrias* (Çöpçü Balığı) Türlerinin Biyoinformatik ve Deneysel Karakterizyonu**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalı Doktora tezi 13/04/2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı): Doç. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI
Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
Üye : Doç. Dr. Mediha CANBEK
Üye : Yard. Doç. Dr. Sevil ŞENTÜRK
Üye : Yard. Doç. Dr. Mustafa TANATMIŞ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.....tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI *ORTHRIAS* (ÇÖPÇÜ BALIĞI) TÜRLERİNİN BİYOİNFORMATİK VE DENEYSEL KARAKTERİZASYONLARI

Cem ÖZİÇ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz ALANYALI
2012, 84 sayfa

Taksonomi, biyolojinin genişlemesinde büyük bir payı olan ve bir bütün olarak biyoloji bilimi içinde dengenin kurulmasına yardımcı olan bir bilim koludur. Bu çalışmada Türkiye’de belirli havzalarda *Orthrias* cinsi türlerinin morfolojik ve moleküler veriler kullanılarak tanımlanması amaçlanmıştır. Yeni morfolojik karakterler tanımlanarak morfotipler elde edilmiş ve bu morfotipleri temsil eden örneklerin mitokondri DNA’sı COI ve 18S rRNA gen bölgelerinin dizisi çıkarılmıştır. Yapılan deneysel karakterizasyon sonucunda elde edilen genlerin COI ve 18S rRNA genleri olduğu belirlenmiştir. Ancak gen bankasında *Orthrias* türleri COI ve 18S rRNA genlerine ait dizi bilgileri mevcut olmadığından, karşılaştırılamamıştır. Gen bankası analizinde, *Orthrias* türlerinin içinde bulunduğu aile olan Balitoridae ailesi üyelerine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada COI geninin 650 bp’lik kısmının DNA barkodu olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar morfolojik sistematik çalışmalarının genetik temelli çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Glutasyon-S-transferaz (GST) ve Katalaz enzimleri canlılarda endojen ve ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonu sağlarlar. OaGSTz ve OaCat’nın kirletici unsurlar altında mRNA miktarının zamana bağlı değişimi, yarı-kantitatif RT-PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. Histopatolojik çalışmalar ışık ve elektron mikroskopik seviyede gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Orthrias*, mRNA, biyoinformatik, DNA barkodlama

ABSTRACT

PhD Thesis

EXPERIMENTAL AND BIOINFORMATIC CHARACTERIZATION SPECIES *ORTHRIAS*

Cem ÖZİÇ

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Department of Biology

Supervisor: Associate Prof. Filiz ALANYALI

2012, 84 pages

Taxonomy is a field of science having a great role in the development of biology as well as contributing to the stabilization of the field as a whole. In this study, it was aimed to describe Certain basins in Turkey species of the genus *Orthrias* on the basis of morphological and molecular findings. Morphotypes are described from an analysis of new morphological characters and 18S rRNA and COI gene of mtDNA is sequenced representing each morphotype. Gens which were obtained as a result of experimental characterization were determined as COI and 18S rRNA. However, as no sequence information of COI and 18S rRNA of *Orthrias* species was available at the gene bank, they weren't compared. In the analysis of gene bank, it was determined that family showed similarity to Balitoridae, a family including *Orthrias* species. In this study, it was determined that 650 bp of COI gen can be used as a DNA barcode. All the results obtained proved that studies of systematic morphological should be supported with genetic based studies.

Enzymes of Glutathione-S-transferase (GST) and Catalase help to detoxificate effects of endogen and exogenous toxic compounds in living organisms. Change in expression of OaGSTz and OaCat mRNA level under the stresses with time intervals was analyzed with semi-quantitative RT-PCR method. Histopathological examinations were conducted on light and electron microscopic levels.

Keywords: *Orthrias*, mRNA, bioinformaticice, DNA barcoding

TEŞEKKÜR

Varoluşumu anlamlı kılana,
Barındıran toprağıma,
Çok sevgili aileme,
Hocam Filiz ALANYALI'ya,
İsimlerinin burada geçmesini önemsemeyecek hocalarım, unutulmaz dostlarım,
sevgili çalışma arkadaşlarım ve değerli yol arkadaşşıma,
Bana verdikleri karşılıksız sevgi, destek ve müsamaha için teşekkür ediyorum.

Cem ÖZİÇ

Nisan 2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix

1. GİRİŞ	1
1.1. Filogenetik Sistematiği.....	1
1.1.1. Filogenetik Çalışmalarda İzlenilecek Yol	2
1.2. Evrimsel Kronometreler	10
1.3. DNA Barkodlama(DNA Barcoding).....	13
1.4. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem	14
1.4.1. Serbest Radikaller	14
1.4.2. Antioksidan Sistem.....	16
1.4.2.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	18
1.5. Çalışma Organizması.....	20
1.6. Amaç	24

2. MATERYAL VE YÖNTEM	25
2.1. Materyal	25
2.1.1. Çalışma organizması: <i>Orthrias</i>	25
2.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	25
2.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	27
2.1.4. Çalışmada kullanılan kitler	27
2.1.5. Çalışmada kullanılan DNA polimeraz setleri	28
2.1.6. Çalışmada kullanılan Primer setleri	29
2.2. Yöntemler.....	29
2.2.1. Biyoinformatik analizlerde kullanılan programlar.....	29

2.2.2. <i>Orthrias</i> 'lardan genomik DNA izolasyonu.....	30
2.2.3. <i>Orthrias</i> 'lardan total RNA izolasyonu:.....	31
2.2.4. Total RNA'nın DNAz muamelesi.....	32
2.2.5. DNA ve RNA'ların spektrofotometre'de ölçümü, miktar ve kalite tayini.....	33
2.2.6. Toplam RNA'dan geri transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA'nın üretilmesi.....	33
2.2.7. PZR Reaksiyon Koşulları:	34
2.2.8. Agaroz jel analizi ve jel görüntüleme işlemi	35
2.2.9. PZR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması	35
2.2.10. PZR ürününün plazmite ligasyonu.....	35
2.2.11. <i>E.coli</i> XL-Blue kompetent hücre hazırlığı.....	37
2.2.12. Kompetent <i>E.coli</i> 'nin transformasyonu	38
2.2.13. Plazmit izolasyonu	39
2.2.14. Restriksiyon enzimleriyle kesim	40
2.2.15. DNA dizi analizi	41
2.2.15.1. Dizi analizi için PZR.....	41
2.2.15.2. Etanol çöktürmesi	43
2.2.15.3. DNA dizi bilgisinin elde edilmesi.....	44
2.2.15.4. Biyoinformatik analizi	44
2.2.16. GST ve Katalaz Enzimlerinin İmmunohistokimyasal olarak işaretlenmesi için uygulanan işlemler	44
2.2.16.1. Karaciğer Örneklerinin Tespiti	45
2.2.16.2. Doku takip işlemleri.....	45
2.2.16.3. İmmunohistokimyasal İşaretleme Teknikleri.....	46
3. BULGULAR	47
3.1. <i>Orthrias</i> Genomik DNA'larının izolasyonu	47
3.2. DNA'ların Spektrofotometrik Ölçülmesi.....	47
3.3. <i>Orthrias</i> türlerinden 18S rRNA genlerinin eldesi.....	48
3.4. <i>Orthrias</i> türlerinden COI genlerinin eldesi	50
3.5. <i>Orthrias</i> türlerinin total proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	53

3.6. <i>Orthrias angorae</i> GST ve Katalaz genlerinin mRNA analizi.....	54
3.7. Histopatolojik Bulgular	57
3.7.1. Işık Mikroskopik Bulgular	57
3.8. GST ve Katalaz Enzimlerinin İmmunohistokimyasal olarak işaretlenmesi sonucunda elde edilen bulgular	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
4.1. Sonuç.....	66
4.2. Öneriler	66
KAYNAKLAR	67
Ek-1 COIgeninin olası DNA barkod dizisi	76
Ek-2 COI geni için referans alınan türlerde COI gen dizilişi.....	77
Ek-3 Referans alınan türler ile <i>Orthrias angorae</i> COI hizalama sonuçları.....	82
Ek-4 Karaciğer dokusundaki total GST aktivitesi.....	83
Ek-5 Karaciğer dokusundaki total Katalaz aktivitesi.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	17
1.2. Çöpçü balığı (<i>Orthrias angorae</i>)	22
1.3. Çöpçü balığı (<i>Orthrias tigris</i>)	22
1.4. Çöpçü balığı(<i>Orthrias panthera</i>)	23
2.1. pGEMTEasy (Promega) vektörü	36
3.1. <i>Orthrias</i> türlerinden genomik DNA'sının agaroz jelden görüntüsü.....	47
3.2. <i>Orthrias</i> türlerinden 18S rRNA genleri PCR reaksiyonunun agaroz jelden görüntüsü.....	48
3.3. Bazı türlerde 18S rRNA geninine ait hizalama sonuçları	49
3.4. 18S rRNA geninin farklı türlere ait filogenetik ağaç analizi	50
3.5. <i>Orthrias angorae</i> COI geninin PZR görüntüsü	50
3.6. <i>Orthrias pantera</i> COI geninin PZR görüntüsü	51
3.7. <i>Orthrias tigris</i> COI geninin PZR görüntüsü	51
3.8. <i>Orthrias angorae</i> COI geninin kısmi hizalama sonuçları	52
3.9. <i>Orthrias angorae</i> COI geninin kısmi hizalama sonuçları	52
3.10. <i>Orthrias angorae</i> COI geninin kısmi hizalama sonuçları	52
3.11. <i>Orthrias</i> türlerinden protein izolasyonlarının SDS-Page görüntüsü.....	53
3.12. <i>Orthrias angorae</i> 'lerden RNA izolasyonu ve RNA'lara DNaz uygulama	55
3.13. <i>Orthrias angorae</i> 'lerden DNaz uygulanmış total RNA'da actin genine ait primerler kullanılarak, DNA kontaminasyonun olmadığının belirlenmesi için kurulan kontrol PZR sonuçları.....	56
3.14. Actin kontrol geni PZR sonuçlarının jelden görüntüsü.....	56
3.15. GST ve Katalaz genlerinin üç bağımsız cDNA kalıbı kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel analizi	57
3.16. Kars çayı üzerinde bulunan iki lokaliteden toplanan türlerin karaciğer dokusu	58
3.17. GST enziminin immünohistokimyasal lokalizasyonunun 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiş elektron mikroskobu görüntüsü	59
3.18. Katalaz enziminin immünohistokimyasal lokalizasyonunun 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiş elektron mikroskobu görüntüsü	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Bazı serbest oksijen radikalleri kaynakları	15
1.2. <i>Orthrias</i> türlerinde diagnostik özelliklerin karşılaştırılması	21
2.1. Çalışma Organizmasının Toplandığı Havzalar	25
2.2. Çalışmada Kullanılan Primer Setleri	29
2.3. Dizi analizine girecek örnekler için PZR kalıp miktar çizelgesi	41
2.4. DTCS karışımı bileşenleri	42

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

cDNA	: Komplementer DNA
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
gDNA	: Genomik DNA
GST	: Glutasyon S-transferaz
RNA	: Ribonükleikasit
SSU	: Ribozomun küçük alt birimi
rRNA	: Ribozomal RNA
RDP	: Ribozomal Veri Tabanı Projesi
DDBJ	: Japon DNA Data Bank
EMBL	: Nucleotide Sequence Database Collaboration

1. GİRİŞ

Taksonomi, dünya üzerinde var olan organik çeşitliliğin tanımını yapan tek bilim koludur ve dünyadaki biyoçeşitlilik krizine çok önemli bir yaklaşımdır. Bu açıdan düşünürsek taksonomi; canlılığın kökeninin açıklanması için gerekli bilgileri verir, evrim süreci içerisinde gerçekleşen olayları açıklar ve bu bilgilerin biyolojinin diğer kollarında kullanılmasına olanak sağlar. Canlıları sınıflandırarak evrimsel biyokimya, immünoloji, ekoloji ve etoloji gibi biyolojinin birçok kolunda yapılan çalışmaların açıklayıcı ve keşfe yarayan değerinde olmasına katkıda bulunur. Tıbbi ve ekonomik açıdan önemli olan organizmalar üzerindeki araştırmalara yön verir. Dünyadaki canlıların şu ana kadar sadece çok az bir kısmı taksonomik olarak araştırılmıştır.

1.1. Filogenetik Sistematiği

Filogenetik sistematiği, biyolojinin canlıları atasal akrabalıklarına göre sınıflandıran bir çalışma alanıdır. Filogenetik sistematiği kapsamı, kavramları ve uygulama yönleri ile oldukça yeni bir alandır.

Filogenetik sistematiği Hennig'in araştırmasının (Hennig, 1950) İngilizceye tercüme edilmesinden sonra popüler olmuştur (Dupuis, 1984). Hennig tarafından yapılan bu çalışma yeni bir keşif olmamasına rağmen, Hennig filogenetik sistematiğinin prensiplerini formalize eden ve filogeninin esasının tahmini için yöntemler öneren ilk sistematiğiçidir.

Hennig organizmaların evrimsel tarihinin, türleşme sırasındaki evrimsel gelişimin sonuçları olduğunu ve eğer sonuçlar doğru bir şekilde belirlenebilirse evrimsel gelişim tarihinin gözler önüne serilebileceğini kabul etmektedir. Bu yaklaşım filogenetik sistematiğinin iki temel prensibinin ortaya çıktığını göstermektedir. Bunlar; Yalnızca sinapomorfi olarak nitelendirilen homolog olan paylaşılan türemiş karakterler, organizmaların gruplandırılması için uygundur ve filogenetik sistematiği monofiletik grupların üzerine evrimsel tarihi yeniden oluşturmaya çalışmalıdır.

Filogenetik sistematikte başlıca amaç; evrim süreci boyunca dolaylı biçimde kanıt toplama yoluyla gruplara ait organizmaların evrimsel gelişim tarihini yeniden düzenlemek, yeniden inşa etmektir. Moleküler filogenetik metotlar moleküler evrim sürecinin DNA veya protein dizileri üzerinde etkili olan çıkarımlarına dayanmaktadır. Belli dizi verilerinin çeşitli algoritmik modeller altında simülasyonu ile belli soy hatlarının ayrılması ve evrimi ortaya konulabilir. Diğer bir deyişle, filogenetik sistematik uygulaması, filogenetik hipotez olarak saptanan ağaç üzerinde kümeleme yoluyla organizmaların soya ait akrabalık tanımı olan sinapomorfiye rehberlik eder ve filogenetik ağacın, monofiletik sınıflandırma grupları olarak hiyerarşik şemaya dönüştürülmesini sağlar. Burada kardeş grup ilişkileri korunmalıdır. Sonuçta, simülasyon deneylerinde sağlamlığı kanıtlanan metotlar biyolojik verilerden filogenetik ağaçlar oluşturmak için kullanılır. İdeal olarak sonuçta çıkan hipotetik ağaç doğal ağaç topolojisine mümkün olduğunca yakın olmalıdır. Biyolojik verilere veya metotsal hatalara özgü olan hatalar negatif bir şekilde filogenetik analizi etkileyerek sonuçta yanlış ağaç topolojisi oluşmasına neden olabilir (Huelsenbeck, 1995, Budak, 2007).

1.1.1. Filogenetik Çalışmada İzlenecek Yol

a) Verilerin Belirlenmesi ve Örneklemeye

Bir organizma grubunun filogenisi yapılacaksa, farklı genler veya gen bileşimleri veya DNA bölgeleri filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılabilir. Seçilen genler veya gen bileşimleri veya DNA bölgeleri çok korunmuş veya çok değişken ise, farklı DNA bölgesi seçerek çözünürlüğü artırabiliriz. En iyi tercih ise birden çok, farklı gen bileşimleri veya DNA bölgelerinin kombinasyonlarının birlikte kullanılmasıdır (Baptiste ve ark., 2002, Budak, 2007).

Bir organizma grubunun filogenetik analizine başlamanın en iyi yolu her morfolojik türden onları temsil edecek birkaç örneğin seçilmesidir. Bir gen familyasının filogenetik analizi için takson örneklemede iki noktaya dikkat edilmesi gerekmektedir. Bunlardan ilki organizmaların biyolojik çeşitliliğini en iyi şekilde temsil etmesidir. İkincisi ise, her bir organizma için gen familyasının ortolog ve paralog dizileri çıkartılmalıdır. Taksa sayısı filogenetik analizlerin

sonucunu etkilemektedir. Ne kadar çok taksa kullanılırsa doğru filogenetik tarihi ortaya koyma olasılığı aynı derecede artmaktadır. Yüksek evrimleşme oranına sahip olan karmaşık filogeniler üzerinde çalışıldığı zaman, çok sayıda yakın taksonla çalışmak yararlı olur. Evrimin yönünü tayin edebilmek için genellikle veri setine dışgrup eklenir. Homoplaziler (kökendaş olmayan benzer evrimsel değişimler) ağacın çözünürlüğünü düşürdüğü için çok yakın bir kardeş grup dış grup için en iyi seçimdir. Ancak köksüz ağaç analizleri yapmak iç dallanmaların çözümlenmesini daha iyi ortaya koyabilir (Emden, 2004, Budak, 2007).

b) Dizileme

Filogenetik analizler, ağaçları hizalanmış DNA dizilerinden oluşturduğu için dizileme hataları yanlış ağaç topolojilerine neden olabilir. Eğer karmaşık evrimsel modeller kullanılıyorsa, daha fazla korunmuş DNA bölgeleri için yapılan dizileme hataları ağaç topolojisi üzerinde daha fazla etkiye sahiptir (Emden, 2004).

c) Hizalama

Dizi hizalamaları Clustal X/W gibi programlar kullanılarak otomatik olarak yapılabilmektedir. Ancak diziler yüksek oranda korunmuş değilse veya delesyonlar içeriyorsa hizalama yüksek oranda hatalara açıktır. Bu yüzden ribozomal DNA ve çok değişken gen bölgelerinin hizalamaları göz ile kontrol edilmelidir. Hizalanamayan bölgelerdeki hatalardan kaçınmak için, bu bölgeler analiz öncesinde diziden çıkartılmalıdır (Budak, 2007).

d) Evrimsel Modelin Seçimi

DNA dizileri için evrimsel modeller yıllar içerisinde oldukça kuvvetlenmiştir. Bu modeller baz frekansı, yedekleme oranı matrisi, gamma dağılımı, sabit pozisyonların orantısı ve kovariyon/kovariyotid evrim gibi bazı parametreleri içermektedir. Basit evrimsel modellerde baz frekansları eşit olarak kabul edilir. Ancak baz frekansları farklı veri setlerine göre her bir nükleotid için değiştiğinden, baz frekansları ancak veri setinden tahmin edilebilir. Basit evrimsel modellerde, her bir nokta mutasyonlar için yedekleme oranı eşit olarak kabul

edilir. Bu modellerde yedekleme tipi bir tane olarak ayarlanmıştır. Transversiyon ve transisyon olmak üzere iki yedekleme tipini kullanan evrimsel modeller farklı yedekleme oranlarına sahiptirler. En karmaşık yedekleme oranını bulunduran matrisler her bir nokta mutasyon için ($A \leftrightarrow C, A \leftrightarrow G, A \leftrightarrow T, C \leftrightarrow G, C \leftrightarrow T, G \leftrightarrow T$) farklı altı yedekleme oranından oluşmaktadır (Budak, 2007).

Non-reversible modeller için yedekleme oranı matrisleri, on iki farklı yedekleme oranı içermektedirler. Ancak birçok standart moleküler filogeni programlarında kullanılmamaktadır. Gamma-dağılımı ve sabit pozisyonların orantısı ribozomal DNA dizileri gibi az veya çok korunmuş bölgeleri dikkate alır. Protein kodlayan DNA bölgelerinde kodonların üçüncü pozisyonu birinci ve ikinci pozisyonlara göre daha değişkendir. Sabit pozisyonların orantısı, ne kadarlık bir bölgenin hiç evrimleşmediğini ortaya koyar. Ancak gamma dağılımı modellerinde yavaş ve hızlı evrimleşen bölgelerin orantıları analiz edilir. Kovariyon/kovariyotid evrim filogeni programlarında çok nadir kullanılır. Bireysel dizilerin diğerlerinden daha hızlı bir şekilde evrimleştiğini ortaya koymak amacıyla kullanılmaktadır. PAUP programı yukarıda bahsedilen evrimsel modeller ile birlikte 56 farklı evrimsel modelin kullanılmasına izin verir (Posada ve Crandall, 1998, Budak, 2007).

e) Filogenetik Analiz ve Ağaç Oluşturma

1966 yılında Eck ve Dayhoff tarafından ilk ciddi filogenetik ağaç oluşturma denemesi gerçekleştirilmiştir. Eck ve Dayhoff'un veri olarak aminoasit dizilerini kullanan yöntemlerinden sonra çok sayıda araştırmacı gen frekansları, aminoasit dizileri ve nükleotid dizileri gibi moleküler verileri kullanan yöntemler geliştirmişlerdir (Tateno, 1990).

Filogenetik ağaç oluşturmak için iki temel yöntem bulunmaktadır. Birinci yöntem taksonların aminoasit veya nükleotid dizilimlerini doğrudan kullanarak ağaç oluşturmaktır. İkinci yöntem ise taksonların birbirlerine olan uzaklıklarının gösterildiği bir uzaklık matrisi (distance matrix) kullanarak ağaç oluşturmaktır.

1.Uzaklık-tabanlı filogenetik ağaç oluşturma yöntemleri

Uzaklık-tabanlı (distance-based) filogenetik ağaç oluşturma yöntemleri tüm taksonların birebir uzaklıklarını hesaplar ve uzaklık değerlerini simetrik bir matriste tutar. Uzaklık değerlerinin oluşturduğu matris *uzaklık matrisi* olarak isimlendirilir. Taksonlar arası uzaklığı ölçmek için birçok uzaklık ölçme yöntemi geliştirilmiştir. Uzaklık-tabanlı filogenetik ağaç oluşturma yöntemlerine örnek olarak Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA) (Sokal and Michener, 1958), Fitch ve Margoliash'ın yöntemi (Fitch and Margoliash,1967), Cavalli-Sforza ve Edwards'ın minimum evrim yöntemi (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967), distance Wagner yöntemi (Farris, 1972), değiştirilmiş Farris yöntemi (Tateno et al., 1982), Komşu Birleştirme (Neighbor Joining, NJ) yöntemi (Saitou and Nei, 1987), Medyan Birleştirme (Median Joining, MJ) yöntemi (Bandelt et al., 1999) verilebilir. Uzaklık-tabanlı yöntemlerin ilklerinden olan ve kendisinden sonra birçok yönteme temel oluşturan UPGMA yöntemi ile Fitch ve Margoliash yöntemi detaylı olarak açıklanmaktadır.

UPGMA yöntemi

UPGMA yöntemi ilk filogenetik ağaç yöntemlerinden biri olmasına rağmen günümüzde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. UPGMA yöntemi filogenetik ağaç oluştururken toplayıcı hiyerarşik kümeleme yöntemini kullanır. UPGMA yöntemi sabit oranda evrim olduğunu varsayar. Algoritma başlangıçta her taksonu tek başına bir küme olarak kabul eder, her adımda simetrik uzaklık matrisindeki en yakın iki kümeyi birleştirerek daha büyük kümeler elde eder ve uzaklık matrisini günceller. Herhangi iki küme arasındaki uzaklık, küme elemanlarının arasındaki tüm uzaklıkların ortalaması olarak kabul edilir. Algoritmanın sonucunda taksonların dendrogramı elde edilir.

Fitch ve Margoliash yöntemi

UPGMA yönteminin zayıf noktası sabit oranda değişimi varsayarak ağaç oluşturmastır. 1967 yılında Fitch ve Margoliash tarafından önerilen filogenetik ağaç oluşturma yöntemi dal uzunluklarını doğru olarak hesaplamayı amaçlar

(Fitch and Margoliash, 1967). Fitch ve Margoliash yöntemiyle hesaplanan dal uzunluklarının doğruluğunu ölçmek için En Küçük Kareler Yöntemi (Least Squares Method) kullanılır. Filogenetik ağacın tüm dal uzunlukları hesaplandıktan sonra matriste verilen gerçek uzaklıklar ile hesaplanmış uzaklıklar karşılaştırılır. En iyi ağaç gerçek uzaklıklar ile hesaplanmış uzaklıklar arasındaki farkın kareler toplamı en az olan ağaçtır.

2.Dizi-tabanlı filogenetik ağaç oluşturma yöntemleri

Dizi-tabanlı (sequence-based) filogenetik ağaç oluşturma yöntemleri taksonlar arası uzaklığı kullanmak yerine aminoasit veya nükleotid dizileri doğrudan kullanırlar. Filogenetik ağaç oluşturmada, dizi verisi uzaklık verisine göre daha bilgi vericidir (Tateno, 1990). Dizi verisini tek bir uzaklık değerine indiren uzaklık-tabanlı yöntemler tüm dizi bilgisini kullanmazlar (Felsenstein,1981).

Nükleotid veya aminoasit dizilerinden filogenetik ağaç oluşturma yöntemlerinin büyük çoğunluğu parsimoni yöntemleridir (Edwards 1963, Edwards and Cavalli-Sforza 1964, Camin and Sokal 1965, Eck and Dayhoff, 1966). Parsimoni yöntemleri başlamadan önce değişimin olanaksız olduğunu varsayarlar. Göz önünde bulundurulmuş evrimsel süre boyunca değişimin az olması durumunda parsimoni yöntemleri doğru sonuç verirler (Felsenstein, 1981).

Teorik olarak parsimoni (tutumluluk kriteri) altında en iyi seçenek tüketme analizi (exhaustive search) metodudur. Bu metot bütün olası ağaçları inceleyerek seçilen optimal kriter altında en iyi ağacı bulma garantisi verir. Pratik olarak bu metot ancak taksa sayısı az olduğunda kullanılabilir. Hizalamalar genellikle birçok takson içerdiğinden tüketme analizi yapmak PC hafızası ve zaman sınırlamaları yüzünden imkânsızdır (Emden, 2004).

Verilerin çoğunluğunda büyük değişimler olduğu için parsimoni yöntemlerinden daha doğru sonuçlar veren yöntemler geliştirilmiştir. Evrimin olasılık modelini formülleştiren bilinen istatistiksel yöntemleri uygulayan ağaç oluşturma yöntemleri dizi verisinin tümünü açık ve etkili bir biçimde kullanmaya çalışırlar. Neyman (1971) ve Holmquist (1972) DNA evriminin olasılık

modellerini ifade etmişler ve Neyman istatistiksel tahminleme yöntemlerini üç türün dizi verileri üzerinde kullanmıştır (Felsenstein, 1981). Felsenstein (1973) bir filogenetik ağacın olabilirliğini değerlendirmek için bir algoritma önermiştir. Felsenstein (1981) daha sonra olasılık modellerini kullanan yöntemlerin en bilineni olan maksimum olabilirlik yöntemini önermiştir.

Genellikle dizi tabanlı filogenetik analizlerde kes-bağla ve heuristic ağaç oluşturma algoritmaları kullanılır.

Kes-bağla ağaç

Kes-bağla ağaç oluşturma algoritmasında her zaman en iyi ağaç hafızada tutulur ve en uygun kritere göre eşik değeri olarak atanır. Bu eşik değerini aşmayan bütün ağaçlar oluşturma aşamasında yanlış olarak değerlendirilir ve ağaç oluşturulmadan başka bir ağaca geçilir. Eğer yeni oluşturulan bir ağaç daha iyi ise yeni referans olarak alınır ve yeni eşik değeri tanımlanır. Bu algoritma ağaç oluşturma sürecini hızlandırır ancak geniş veri setleri için çok fazla zamana ihtiyaç vardır.

Heuristic ağaç

Heuristic arama algoritması bir başlangıç ağacı seçerek bu ağacın topolojisini yeniden düzenler ve en iyi ağacı bulmaya çalışır. Tepe tırmanma algoritması da denilebilir. Bu arama algoritması en iyi ağacı bulmayı garanti etmez. Star-decomposition metodunda ilk olarak bütün taksonlar köksüz bir ağaçta tek bir iç düğümde bağlanır. Daha sonra en yakın taksonlar birbirleriyle bağlanır. Bu süreç tekrar tekrar yapılarak tamamen çözümlenmiş bir ağaç elde edilmesi amaçlanır (Budak, 2007).

Filogeni oluşturma sürecinin sonucunda açığa çıkan ağaçlar üzerinde homoplasiden kaynaklanan uyumsuzluklar ortaya çıkabilir. Bu çatışan filogenetik hipotezlerin açığa çıkmasına sebep olan homoplasilerle uğraşan bilgisayar destekli belli başlı üç metod bulunmaktadır. Bunlar, uyumluluk, maksimum olasılık ve tutumluluk metodları olup her biri farklı bir kabulle çalışır.

Uyumluluk metodun çalışma prensibi şöyle özetlenebilir. Örneğin iki durumlu iki karakterin bütün olası dört kombinasyonu, verilen bir grup taksonda açığa çıkıyorsa, bu karakterlerden en az biri, muhtemelen her ikisi bir defaya mahsus (yani aynı atadan) türememişlerdir. Bu durumda veri matrisinde belli

derecede homoplasi vardır. Bu problemi çözmek için veri matrisindeki her bir karakter çifti bir diğeri ile homoplasi gösteren kombinasyonlar (yani uyuşmayan set) eleninceye kadar karşılaştırılır. Sonuçta, birbirleri ile uyum gösteren yani aynı filogenetik hipotezi destekleyen en büyük karakter seti bırakılır.

Maksimum tutumluluk (maksimum parsimony) yaygın biçimde kullanım alanı bulan ve şimdiye kadar ki uygulamalarda en iyi sonuç veren bir yöntemdir. Parsimoni metodu, alternatif hipotezlerin yarıştığı durumlarda, hipotez tercihinin objektif bir temel teşkil eden bir kriter olarak kullanılır. Bir grubun filogenisini en iyi tahmin eden ağacın en az evrimsel değişme (karakter değişmesi) gösteren ağaç olduğu prensibinden hareketle çalışır. Bunun anlamı tercih edilecek ağacın çok sayıda homolog paylaşılan karakter ile az sayıda homoplasi içeren ağaç olması gerektiğidir. Maksimum tutumluluk kriterinde evrimsel model kesindir. Maksimum tutumluluk bir ağacın mümkün olan en az değişime sahip olmasını savunur. Böyle bir ağacın evrimsel süreci en iyi ifade ettiğini söyler. Karakter ağırlaması tutumluluk kriterinde, her pozisyonda bütün nükleotidler eşit mutasyon oranına sahiptirler. Ağaç arama algoritması olarak genellikle heuristic search kullanılır.

Uzaklık matrisi (distance matrix) metodunda hizalanmış diziler çiftler halinde karşılaştırılır. Her bir dizi çifti için genetik uzaklık mesafesi hesaplanır. Taksalar arasındaki genetik uzaklığı hesaplamak amacıyla birkaç evrimsel model seçilebilir. Bu metot genellikle komşu bağlama (neighborjoining) algoritmasını kullanılır. Bu algoritma en hızlı metotlardan birisidir ve genellikle takson sayısı çok geniş veri setleri için kullanılır.

Maksimum olasılık (maximum likelihood) metodunun ön kabulüne göre, evrimsel değişmeler basit bir olasılık modeli altında açığa çıkar. Yani, her bir karakterin bir durumdan diğeri bir duruma değişmesinin ya da yeni bir karakterin açığa çıkmasının belli bir olasılığı vardır. Belli bir grup taksa için açığa çıkan her bir ağacın, verilen veri setine göre belli bir doğru olma olasılığı vardır. Tercih edilecek ağaç, bu analiz edilen veri setinden çıkması en muhtemel ağaç olmalıdır. Maksimum olasılık kriteri en çok zaman alan, ancak dizi verileri için en kuvvetli optimal kriterdir. Verilen bir ağaç topolojisi için, dizideki her pozisyonun iç düğümlerdeki atasal durum kombinasyonlarının olası her pozisyonları eklenerek

olasılık hesaplanır. En iyi ağacı elde etmek için genellikle heuristik search kullanılır.

Bayesian analizi uzaklık matrisi, maksimum tutumluluk veya maksimum olasılık metotlarında daha farklı bir yaklaşım kullanır. Bu metot Bayesian teoremine dayanmaktadır. Posterior olasılık formülündeki tüm parametreleri hesaplamak imkansız olduğu için Markov Chain Monte Carlo simülasyonu kullanılır. Analiz rastgele dal uzunluğuna sahip rastgele ağaç topolojisi ve rastgele olasılık parametreleri (baz frekansları, yedekleme oranı, gamma dağılımı, değişken olmayan pozisyonların orantısı, kovarion) ile başlar. Markov zinciri birkaç bin ile milyonlara kadar döngü yapar. Her bir döngüde ufak parametre değişiklikleri ile yeni ağaçlar oluşturur. Oluşturulan ağaçlar posteriori olasılığına göre kabul edilir veya ret edilir. Ağaç oluşturma süreci bittiğinde, posteriori prensibi ile ölçeklendirilmiş uyumluluk (konsensus) ağacı ortaya çıkar (Emden, 2004, Budak, 2007).

f) Seç-Bağla (Bootstrap) Analizi

Seç-bağla analizi her bir dalın ne oranda desteklendiğini test etmek amacıyla yapılır. Program test edilecek veri setindeki diziler içerisinde rasgele parçalar alarak alt örneklemeler oluşturur (bootstrap replicates). Alt örnekler filogenetik analize tabi tutulur (maksimum tutumluluk, komşu bağlama veya maksimum olasılık). Sonuç olarak her bir dalın desteklenme yüzdesini veren uyumluluk ağacı oluşturulur. Sonuçlar yüzde olarak verildiğinden sağlıklı bir sonuç alabilmek için 100 veya daha fazla örneklem döngüsü yapılmalıdır. Seçbağla analizi sonucunda yüzde doksan beş veya daha fazla alt örnek analizinde aynı dal bulunuyorsa, bu soy hattının önemli bir şekilde desteklendiği anlamına gelmektedir (Budak, 2007).

1.2. Evrimsel Kronometreler

Belirli genler ve proteinler evrimsel kronometreler olup, evrimsel değişimi ölçerler. Diğer bir değişle işlevsel olarak benzer (homolog) makro moleküllerin nükleotid ve amino asit dizisindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıkların sonucudur. Moleküler dizileme ve evrimsel uzaklıkların ölçülmesi amacıyla yapılacak dizileme çalışmalarında doğru moleküllerin seçilmesi şarttır.

Kusursuz bir moleküler kronometreyi tanımlayan bazı kriterler vardır. Moleküler kronometre, çalışmak için seçilen grup içerisinde evrensel olarak yaygın olmalıdır. Bu tüm organizmaların karşılaştırılmasına yardım eder. İkinci olarak, molekül her organizma için işlevsel olarak homolog olmalıdır zira işlevselliği farklı olan moleküllerin dizi benzerliği göstermesi beklenmez. Üçüncü olarak, analizler için dizileri sıralamak amacıyla molekülün korunmuş dizi bölgeleri içermesi çok önemlidir. Son olarak seçilen molekül dizisinin organizmadaki evrimsel değişimi bir bütün olarak yansıtması gerekir. Aslında ölçülecek filogenetik uzaklık arttıkça, dizilerdeki değişim oranının yavaşlaması gerekir ki, çok uzun bir zaman sürecinde meydana gelen değişimler bize evrimsel sinyalleri işaret eder.

Pek çok gen ve proteinin moleküler kronometreler olduğu ileri sürülmektedir. Ancak bunlar arasından ribozomal RNA'ları kodlayan genler, sitokrom oksidaz genleri, translasyonel sistemdeki temel bileşenler, ATPaz proteinleri, ATP sentezleyen veya hidrolizini yapan enzim kompleksleri, genetik rekombinasyona yardımcı olan RecA enzimi ve belirli translasyonel proteinler canlılar hakkında en çok kabul edilebilir filogenetik bilgiyi edinmemizi sağlamışlardır. Bu moleküllerin hepsi, ilkel hücrelerde bile gereklidir ve bu sebeple onların gen dizilerindeki varyasyonlar, evrimsel geçmişlerini daha derinlemesine incelememize olanak sağlar.

Ribozomal RNA'lar, oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküller olup, tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. rRNA'ları kodlayan çekirdek rDNA genleri genellikle filogenetik yaklaşımlarda kullanılmaktadır. Bu rRNA kodlayan bölgeler birbirlerinden ayıraçlar ile ayrılır. Ayıraç bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar ölümcül

etkiye sahip olmadığından, rRNA şifreleyen bölgelere göre daha hızlı evrimleşirler. rRNA şifreleyen bölgelerde meydana gelen mutasyonlar rRNA'larda da görüleceğinden, bu mutasyonlar başarılı bir ribozom oluşumunu engelleyebilir. Farklı evrim oranlarından dolayı rDNA'lar geniş spektrumlu bir filogenetik ilişkiyi çözümlenmede kullanılabilir. Çekirdek SSU rDNA en çok korunan DNA bölgelerinden birisi olduğundan dolayı alem (kingdom), şube (filum), sınıf (classis) veya takımları (ordo) içeren derin filogenetik dallar oluşturmada kullanılabilir. Prokaryotlarda büyüklükleri 5S, 16S ve 23S olan üç çeşit ribozomal RNA molekülü vardır. Ökaryotik çekirdek rDNA'lar yaklaşık 5000 kopya ile genomda ardışık sıralı bir şekilde bulunurlar. Her tekrar eden birim küçük altbirim 30S veya 40S'ten oluşan (SSU), büyük altbirim (LSU) ve 5.8S rDNA'lardan oluşur (Friedrich ve Tautz, 1995, Madigan ve ark., 1997, Budak, 2007).

En küçük çekirdek rDNA olan 5.8 S rDNA'nın nükleotid dizisindeki korunma SSU rDNA ile aynı olmasına karşın uzunluğu (yaklaşık 150 bp) çok kısa olduğundan, yeteri kadar filogenetik bilgi içermemektedir. Bu nedenle 5.8S rDNA bölgesi filogenetik çalışmalar için önerilmemektedir (Hwang ve ark., 1999, Budak, 2007). LSU rDNA, SSU rDNA ile karşılaştırıldığında çok daha büyük ve daha fazla değişkenlik göstermektedir. Bu bölge birçok farklılaşmış domain veya genişletilmiş parçalara sahiptir. Bundan dolayı, genin büyüklüğü şubeler arasında değişkenlik göstermektedir. Çekirdek LSU rDNA takım veya aile seviyesindeki filogenetik ilişkiler için kullanışlıdır (Friedrich ve Tautz, 1997; Hwang ve ark., 1998). Çekirdek SSU ve LSU rDNA'ları birkaç domainden oluşmaktadır. Bu domainlerden bazıları çok korunmuş olmasına rağmen diğerleri değişkendir. Hızlı evrimleşen segmentler yüksek miktarda değişkenlik gösterirler ve bunlar “genişleyen segmentler (expansion segments)” veya “değişken bölge (variable regions)” olarak adlandırılırlar. Çekirdek SSU ve LSU rDNA'larında görülen uzunluklarındaki değişkenlik, değişken bölgelerin genişlemesinden kaynaklanmaktadır (Hwang ve ark., 1998; Choe ve ark., 1999, Budak, 2007). SSU ve LSU rDNA'larının değişken bölgelerindeki nükleotid dizileri aile veya nadiren cins gibi alt kategorik seviyelerde kullanılır (Hwang ve ark., 1998,1999, Budak, 2007).

Eukaryotlarda dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük 18S molekülü üzerinde odaklanmıştır (Friedrich ve Tautz, 1995, Madigan ve ark., 1997, Budak, 2007).

rRNA dizilerine ait çok geniş bir veri tabanı mevcuttur. Örneğin Ribozomal Veri Tabanı Projesi (RDP) şu an sayısı 100.000'i aşan bu tür dizilere ait büyük bir koleksiyonuna sahiptir. RDP'ye internet üzerinden erişilebilmekte (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) ve dizilerin yanı sıra filogenetik eğitimler, referans kaynaklar, yeni oluşturulan dizilerin gösterimi ve diğer bir takım özellikler ev sahipliği yapmaktadır.

SSU rRNA'ların filogenetik bir araç olarak kullanıma, 1970'lerde Illinois Üniversitesi'nden Carl Woese öncülük etmiştir ve bu yöntem günümüzde tüm biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu başarısından dolayı 2003 yılında İsveç Kraliyet Bilim Akademisi tarafından, biyolojide bilimsel başarının en yüksek ölçütü olarak görülen Crafoord ödülüne layık görülmüştür.

Ribozomal RNA dizilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması, moleküler biyoloji ve bilgisayar analizlerinin beraber yürütülmesi sonucu şu an oldukça rutin hale gelmiştir. Yeni bulunan diziler, Gen Bank, DDBS ve EMBL gibi genetik veri tabanlarındaki mevcut diziler ile karşılaştırılabilir. Daha sonra ağaç oluşturan bir algoritma kullanılarak dizilerin tabiatında olan evrimsel bilgiyi en iyi şekilde ifade eden filogenetik bir ağaç çizilebilir. (Madigan ve ark., 1997).

Çekirdek rDNA'lar ile birlikte mtDNA'larda filogenetik analizlerde kullanılmaktadır. Bazı haşlamlılar (cnidaria) dışındaki çok hücreli canlılarda mtDNA kapalı halkasal DNA molekülünden oluşur. Bu molekülün ortalama büyüklüğü 14 ile 17 kb kadardır. Mitokondri DNA'sındaki bu büyüklük değişimine rağmen gen içeriği çok az değişmiştir. Büyüklük değişiminin temel nedeni şifreleme yapmayan bölgelerin uzunluğundaki değişim veya mtDNA'nın bazı bölgelerinin tekrarlamasıdır (Hwang ve ark., 1999, Budak, 2007). Genellikle mtDNA'ları genellikle 36 veya 37 gen içerir; iki tanesi ribozomal RNA'lar için (16S rRNA ve 12S rRNA), 22 tanesi tRNA'lar için ve 12 veya 13 tanesi multimerik proteinlerin alt üniteleri içindir (sitokrom oksidaz, ATP sentetaz VI ve VIII [A6 ve A8], NADH dehidrojenaz 1-6 ve 4L [ND1-6, ND4L], ve sitokrom

b apoenzim [Cytb]). Bunlara ek olarak genellikle en az bir tane değişken uzunlukta şifreleme yapmayan diziler vardır (kontrol bölgesi veya A+T'ce zengin bölgeler, vb.). Omurgalılarda ve böceklerde bu şifrelenmeyen bölgeler mtDNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu düzenleyen ve başlatan elementler içerir (Hwang ve ark., 1999, Budak, 2007).

Mitokondri DNA'sı çekirdek genomundan daha hızlı evrimleşir. Bundan dolayı birçok mitokondri proteini şifreleyen genler familya, cins, tür ve populasyon gibi alt kategorik seviyelerin filogenetik ilişkilerini incelemek amacıyla kullanılır. Protein şifreleyen genlerin üçüncü kodonlarındaki yüksek yer değiştirme mutasyonları frekanslarından dolayı bu tür genler tür veya populasyon seviyesindeki filogenilerde kullanılır (Navajas ve ark., 1996, Budak, 2007). Diğer yandan, amino asit dizileri daha fazla korunduğu için, amino asit dizileri familya gibi daha üst kategorilerde kullanılır (Fрати ve ark., 1997, Budak, 2007).

1.3. DNA Barkodlama (DNA Barcoding)

DNA dizi analizi evrimsel geçmişi araştıran çalışmalar için çok yararlı bir araçtır. DNA dizi analizi, yaşamın çeşitliliğini ortaya çıkarmasına ve grup içi evrimsel ilişkilerin araştırılmasına yardımcı olmaktadır. Sistematikçiler için diğer bir faydası ise birbirlerine çok benzer olan organizmaların tür sınırlarını çözümlemede yardımcı olmaktadır. DNA'ya dayalı filogenetik analiz yöntemleri ve gen çeşitliliği şaşırtıcı derecede çok olmasına rağmen, çalışılan bazı gruplar dışında uygulamalar sınırlıdır. Tek bir genin bütün türler için dizilemesinin yapılması taksonomi için büyük ölçüde potansiyel kullanıma sahiptir olacaktır. Birçok araştırmacının merak ettiği soru, DNA analizi ile tür tanımlamasının mümkün olup olmadığıdır. Teorik olarak kısa bir DNA dizisi, 10 milyon ile 100 milyon türü teşhis etmek için yeterlidir. Örneğin protein kodlayan 600 nükleotid uzunluğundaki bir gen için kodonların üçüncü pozisyonunda 200 nükleotid vardır. Bu konumlarda, yedekleme oranı seçici olarak nötrdür ve rastgele sürüklenme ile mutasyonlar biriktirilir. Bir organizma grubunun üçüncü nükleotid pozisyonunda sadece adenin veya timin (alternatif olarak guanin veya sitozin) – en kötümser

ihtimalle- bulundursa dahi üçüncü nükleotid pozisyonu için 2200 veya 1060 farklı dizi ihtimali vardır (Stoeckle, 2003, Budak, 2007).

Tek bir hedef gen ile DNA sekans analizi yapılarak teşhis yapılması *DNA çubukkod* (DNA barcoding) olarak adlandırılır. Hayvanlar aleminde en azından farklı şubelerden bazı yakın türler için COI analizi ayırarak DNA çubukkodlamaya destek vermiştir (Hebert ve ark., 2003).

DNA çubukkodun faydaları nelerdir? Evrensel olduğundan tür teşhisleri için pratik bir metottur ve geniş bilimsel uygulama alanına sahiptir. Koruma biyolojisi ve biyolojik çeşitlilik araştırmaları için çok kullanışlı bir araçtır. Yumurta ve larva formlarının teşhisi, mide içeriği ve dışkı analizlerinde potansiyel bir kullanıma sahiptir. Taksonomi uzmanları tür teşhisleri için yeterli sayıda olmadığından DNA ya dayalı tür teşhisi biyolojik bilgi hazinesinin kapılarını açacaktır (Budak, 2007).

Yeryüzünde yaşayan tür sayısı bilinmemektedir. Yaklaşık olarak 1.7 milyon canlı türü isimlendirilmiş ve muhtemelen 10 milyon tür (Bacteria ve Archaea hariç) tanımlanmayı beklemektedir. Belki de büyük hayvanlar arasında dahi sanıldığından daha yaygın olan gizli (cryptic) türlerin tanımlanmasına ayrıntılı popülasyon analizleri yardımcı olacaktır. Aynı genin (veya gen setinin) farklı organizmalarda DNA dizilemesi, şu an için mümkün olmayan hayatın çeşitliliğinin kavranmasına ve türleşmenin altında yatan süreçlerin aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır (Budak, 2007).

1.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

1.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük, son derece reaktif olan ve hem organik hem de inorganik yapıda bulunabilen moleküllerdir, aynı zamanda intrasellüler serbest radikal (SOR) olarak da bilinirler (Nordberg ve Arner, 2001; Yıldızdaş, 2003; Tülüce, 2005; Kara, 2009). Organizmadaki serbest radikaller ile antioksidan

savunma sistemi arasındaki dengenin, fizyolojik veya patolojik süreçlerin sonunda oluşan serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir (Kara, 2009).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Başlıca, oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır. Ayrıca, organik maddelerin çürümesi, boyaların kuruması ve plastik maddelerin işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde oksijenin kısmi redüksiyonu ile oluşabilmektedir. Öte yandan hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, kimyasallara maruz kalma, sigara dumanı solventler gibi çevresel faktörler, iyonize ve ultraviyole edici radyasyon, bazı antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler gibi çevresel kimyasal etkilerle karşı karşıya kalma sonucunda hücrelerde radikallerin çoğaldığı ve hipoksi, inflamasyon, ısı, yoğun egzersiz, iskemi, travma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, gibi durumların radikal oluşumunu tetikleyen faktörler olduğu ileri sürülmektedir (Tülüce, 2005; Tekcan, 2009). Çizelge 1.1’de bazı serbest oksijen radikalleri kaynakları gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Bazı serbest oksijen radikalleri kaynakları (Kara, 2009).

Endojen kaynaklar	Eksojen kaynaklar
Mitokondriler (solunum zinciri)	Radyasyon
Hücre zarı (prostoglandin sentezi)	İlaçlar
Sitokrom P-450	Sigara,Alkol,Uyuşturucu
Aktive lökositler (fagositöz)	
Metal iyonları	
Mikrozomal elektron taşıma zinciri	
Oksidan enzimler	

Artmış serbest oksijen radikallerinin belli başlı zararları şu şekilde sıralanabilir;

- * Hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- * Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- * DNA'yı tahrip ederler,
- * Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- * Elastaz, proteaz, fosfolipaz, ksantinoksidaz, indolamin, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,

- * Hücrenin potasyum kaybını arttırlar,
- * Trombosit agregasyonunu arttırlar,
- * Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- * Hücre dışındaki kollagen doku bileşenlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (Özkaya, 2007)
- * Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sisteminin etkisini azaltırlar (Ardağ, 2008)

1.4.2. Antioksidan Sistem

Organizma değişen koşullara karşı hücrenel homeostazisi korumak durumundadır. Serbest radikaller ve lipit peroksidasyonuna karşı bu yolla antioksidan bir savunma sistemi oluşturularak hücrenel denge korunmaya çalışılmaktadır (Tülüce, 2005).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu önleyen veya mevcut radikalleri yok ederek hücrenin zarar görmesini engelleyen, yapısında genellikle fenolik fonksiyonel grup içeren, dokularda doğal olarak bulunan ve farklı oksidasyon reaksiyonlarını düzenleyen moleküllerdir. (Cutler ve ark., 2005; Ardağ, 2008). Antioksidanlar hücreleri, hem direkt, hem de indirek olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı koruyan maddelerdir (Özkaya, 2007). Vücut için bir nevi kalkan olan bu kimyasal moleküllerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri etkisiz hale getirmeleri ve bu süreçte kendilerinin serbest radikal haline gelmemeleridir (Kähkönen ve ark., 1999). Antioksidanların serbest radikalleri nötralize etmelerinin önemi ise daha öncede belirtilmiş olan, intrasellüler serbest radikallerin sebep olduğu hastalıkları önlemeleridir (Ardağ, 2008).

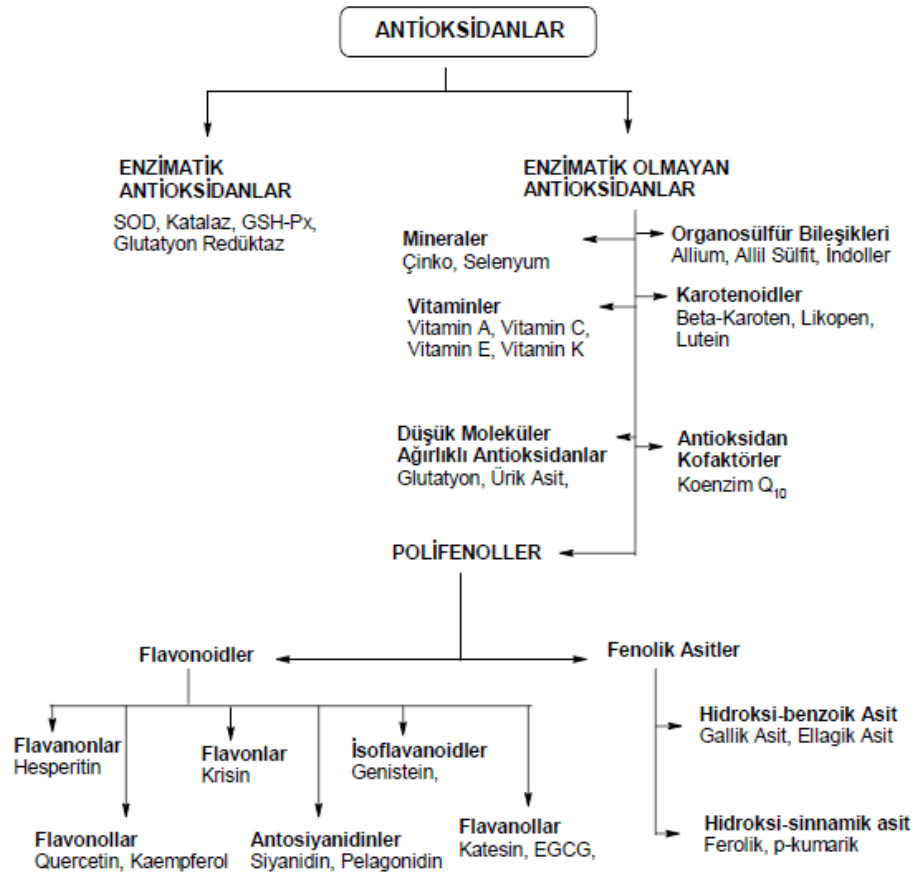
Antioksidanlar farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır; endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar ve ya serbest radikalın meydana gelişini engelleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler (süpürücü) şeklinde ikiye ayrılabilirler.

Ayrıca enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler.

A. Enzimatik Antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST).

B. Non-enzimatik Antioksidanlar: C vitamini, A vitamini, E vitamini, flavinoidler, melatonin, ürik asit, haptoglobulin, albumin, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubikinon (koenzim Q10), bilirubin, mannitol, lipoik asit ve hemopeksin (Özkaya, 2007; Kara, 2009; Eren, 2008).

Şekil 1.1'de Antioksidanların sınıflandırılması gösterilmiştir (Özkaya, 2007).



Şekil 1.1 Antioksidanların sınıflandırılması (Özkaya, 2007).

1.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlardan GST ve Katalaz

Katalaz (CAT)

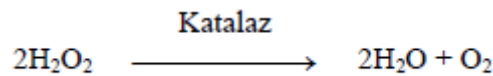
Katalaz (EC 1.11.1.6) hidrojen peroksit radikalinin aşırı miktarda arttığı ortamlarda aktivite gösterir ve reaktifin moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlayarak hidrojen peroksitin detoksifikasyonunu sağlar (Kara, 2009; Tekcan, 2009). Katalaz enzimi doğada da çok geniş yayılım gösteren bir enzimdir, öyle ki bu enzimi taşımayan canlı türü hatta dokusu yok denilecek kadar azdır. İnsan da en yüksek aktiviteye; karaciğer, böbrek dokuları ve eritrositlerde sahiptir. Hücre içerisinde daha çok peroksizom ve mitokondrilerde konumlanmış halde bulunur (Yıldız, 1999) .

Esas olarak peroksizomlarda bulunur ve yapısında 4 adet *hem* molekülü içeren glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Leew ve arkadaşları tarafından ilk kez 1901 yılında doğada saptanmasının ardından, 1937 yılında Sumner ve Dounce tarafından karaciğerde bulunduğu gösterilmiştir (Kara, 2009; Tekcan, 2009).

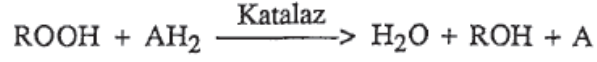
Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından hidrojen peroksit radikali ortamdan uzaklaştırılır. Katalaz, hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarda parçalanmasında görev alırken, glutatyon peroksidaz düşük hidrojen peroksit konsantrasyonlarda detoksifikasyon reaksiyonunu katalizler ve bu durumda katalazdan daha etkindir. Dahası katalaz enzimi H₂O₂'in olduğu tüm hücresel bileşenlerde bulunmaz, bu da katalazın oksijen radikallerinin oluşumundan korunmada ikincil öneme sahip olduğunu akla getirmektedir (Tülüce, 2005).

Katalaz enziminin temel olarak 2 fonksiyonu vardır;

1. H₂O₂'nin H₂O ve O₂'ye parçalanmasını sağlayan detoksifikasyon reaksiyonunu katalizler;

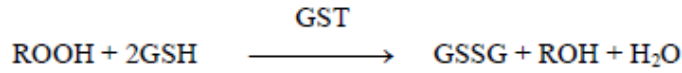


2. H vericilerini (örneğin: metanol, etanol, formik asit ve fenol) 1 mol peroksit harcayarak katalizler;



Glutasyon S-Transferaz

Kısaca GST şeklinde gösterilen glutasyon S-transferaz (E.C.2.5.1.18) enzimleri, endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik toksik maddelerin detoksifikasyonunun metabolik yolunda, bu maddeleri Glutasyon (GSH) ile birleştirerek daha az toksik olan ve suda çözünebilen ürünlere dönüştürülmesini katalizleyen ve birçok gen bölgesi tarafından ifade edilen homodimerik ya da heterodimerik yapıda olan Faz II detoksifikasyon enzim ailesinin bir üyesidir (Dagget ve ark., 1998; Casalino ve ark., 2004; Baş, 2006).



GST tarafından katalizlenen bu ilk basamakta, Glutasyon (GSH) ile endojen ve eksojen hidrofobik elektrofillerin bağlanması gerçekleşir. GSH, GST enziminin çalışabilmesi için tepkime ortamında mutlaka bulunmalıdır. GST enzimi, GSH bağımlı çalıştığı için, GSH'a kosubstrat da denilmektedir. GSH dışındaki diğer substratlar, oldukça geniş bir yayılım gösterdiklerinden dolayı, GST enzimi, kısmi substrat özgülüğü gösteren bir enzimdir. Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'ler Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluştururlar. GST'ler antioksidan aktivitelerine ek olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptir. GST hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; ksenobiyotikleri redükte glutatyondaki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik

bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan idrar ter gibi yollarla atılabilir veya daha ileri metabolitik yollar için substrat haline gelirler (Habig ve ark., 1974; Baş, 2006; Tülüce, 2005). Ayrıca besinlerle alınan toksik maddelerin, metabolik işlemleri sırasında, alınan besinlerin, besinsel değerlerini kaybettirmeksizin eliminasyonunu sağlar (Baş, 2006).

1.5. Çalışma Organizması

Orthrias türleri ilk olarak Cobitidae familyası içerisinde kabul ediliyor ve bu aileye üyelerine büyük benzerlik gösteriyordu. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada Balitoridae familyası içerisinde kabul edilmiştir.

Orthrias; Animalia, Chordata, Pisces, Osteichthyes, Actinopterygii, Cypriniformes, Balitoridae, Orthrias, *Orthrias angorae*, *Orthrias pantera*, *Orthrias tigris* (Steindachner, 1897) şeklinde sınıflandırılır.

Familya : Balitoridae

Bu küçük vücutlu balıklar hızlı akan sularda kayalara tutunarak yaşarlar. Ventral yüzgeçleri kayalara tutunabilmek için modifiye olmuş bu ailenin üyelerini büyük emici ağızlarına sahiptirler. Cobitidae familyasına büyük benzerlik gösteren bu familya ait üyelerin ağızlarının etrafında 3 çift bıyık bulunur. Bu özelliklerinden dolayı Cobitidae familyasına benzerlik gösteren Balitoridae familyasının 52 genusu ve 500'den fazla türü vardır (Geldiay ve Balık, 1988).

Cins : Orthrias (HASSELT, 1823)

Vücut iğ şeklinde, rengi koyu kahverengi veya kahverengi-sarı üzerinde benekler bulunur. Bir çifti ağız kenarlarında, iki çift de üst dudakta olmak üzere Üç çift bıyıkları mevcuttur. Gözlerin altında diken bulunmaz. Dorsal yüzgeçleri 6-18 dallanmış ışın içermektedir. Kaudal yüzgeç dış bükey, düz ve derin çatallı olabilmektedir. Yüzme keseleri kemik bir kapsülle tamamen örtülüdür. Çizelge 1.2 'de Orthrias türlerinin diagnostik özelliklerin karşılaştırılmıştır (Geldiay ve Balık, 1988).

Çizelge 1.2. *Orthrias* türlerinde diagnostik özelliklerin karşılaştırılması (Geldiay ve Balık, 1988).

Türler	D	A	P	V
<i>O.angorae</i>	II-III 7-8	II 5	I 9-10	I 6-7
<i>O.panthera</i>	II-III 7-8	II 5	I 10-11	I 6
<i>O.tigris</i>	II-III 7-8	II 5	I 10-11	I 7
<i>O.tschaiyssuensis</i>	III 9	II 5	I 9-11	II 6-7
<i>O.lendli</i>	II 7-8	III 5	I 9-10	I 5-6
<i>O.insignis</i>	III 8-9	II 5	I 9-10	II 6-7
<i>O.malapterurus</i>	III 7	II 5	I 10	I 7
<i>O.argyrogramma</i>	III 8-9	II 5	I 9-10	I 5-7

Tür: *Orthrias angorae* (Steindachner, 1897)

Vücut silindirik olup, çok küçük pullarla örtülmüştür. Standart boy maksimum vücut yüksekliğinin 5,3 – 5,5, baş uzunluğunun 3,9 – 4,3, baş genişliğinin 6,8 – 7,1, baş yüksekliğinin 7,1 – 7,5 katı kadardır. Gözler küçük ve baş uzunluğu göz çapının 6,0 – 6,3 katıdır. Göz çapı burun uzunluğunun 1,5-1,8 katıdır ve aşağı yukarı gözler arası mesafeye eşittir. Pektoral yüzgeçler çok uzundur ve Ventral' lerin iyice yakınına kadar uzanabilir. Dorsal yüzgeç, burun ucuna ve kuyruk yüzgeci başlangıcına eşit mesafede bulunmaktadır. Kuyruk yüzgecinin serbest kenarı büyük bir varyasyon göstermekte olup, bazı bireylerde düz, bazılarında ise derinliği az çok değişen bir girinti meydana getirir. Renk çok değişken olmakla beraber, genellikle gri-sarı görünüştedir. Vücudun sırt bölgesinde ve yan taraflarında, çeşitli büyüklükte ve gelişi güzel dağılmış olan kahverengi – esmer benekler bulunmaktadır. Bu tür, genellikle temiz ve serin olan nehir ve çayların bilhassa yavaş akan çakıllı-kumlu zeminlerinde yaşarsa da, bazen göllerin fazla derin olmayan kıyı zonlarında da bulunur. Gececi özellikte olup gündüzleri daima taşlar altında gizlenen ve sedenter olarak yaşayan bir zemin balığıdır. Temiz suları tercih etmekle beraber, pollusyona karşı da çok dayanıklı olduğundan, oksijenin eser halde bulunduğu ortamlarda bile uzun süre yaşayabilir. Yumurtlama periyodu Mayıs-Temmuz ayları arasına rastlar. Genellikle 5 cm. boyda iken cinsel olgunluğa erişirler. Yumurtalar çakıllar, taşlar ve bitki gövdeleri

üzerine yapıştırılır. Başlıca gıdasını bentik omurgasızlardan kurtlar ve böcek larvaları oluşturur. Bu tür ilk olarak Ankara civarında bulunmuş ve aynı zamanda Çoruh, Kura ve Aras nehirleri, Bulgaristan, Orta Anadolu göl ve Akarsuları, Van gölü, Hazar gölü, Çıldır gölü, Fırat ve Dicle nehirlerinin üst kollarında yayılış gösterdiği bildirilmiştir (Geldiay ve Balık, 1988).



Şekil 1.2. Çöpçü balığı (*Orthrias angorae*, Steindachner, 1897)

Tür : *Orthrias tigris* (Heckel, 1843)

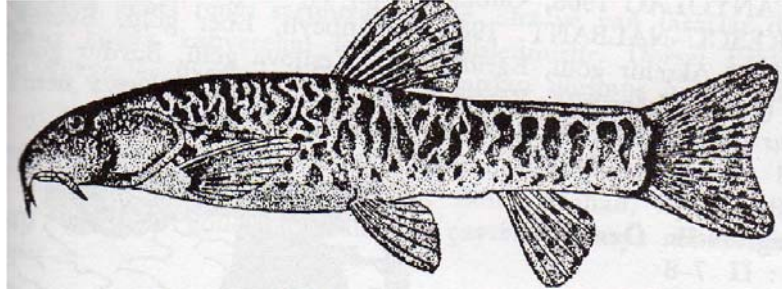
Standart boy maksimum vücut yüksekliğinin 5,3 – 5,7, baş uzunluğunun 4,9 – 5,5, baş genişliğinin 6,5 – 7,3, baş yüksekliğinin 7,0 – 7,4 katı kadardır. Gözler küçük ve baş uzunluğu göz çapının 4,1 – 4,6 katıdır. Uzunluğu en fazla 11cm. civarındadır. Vücudun ön kısmı çıplak, orta ve arka kısmı ise küçük pullarla örtülüdür. L.lat. tam olup kuyruk yüzgecine kadar uzanır. Vücut genel rengi sarı veya gri – kahverengi olup, yan taraflarında sayıları 12-15 arasında değişen transversal olarak uzanan siyah renkli iri benekler vardır. Dorsal ve kaudal yüzgeçler üzerinde ise enine 2 – 3 sıra halinde seyreden koyu renkli bantlar görülmektedir. Anadolu'nun özellikle Doğu ve Güneydoğu bölgelerine özgü olan bu tür ilk olarak Halep'te bulunmuştur. Bu türün Fırat, Dicle, Ceyhan, Asi nehirleri, Güney Suriye, Kura ve Aras nehirlerinde yayılış gösterdiği bildirilmiştir (Geldiay ve Balık, 1988).



Şekil 1.3. Çöpçü balığı *Orthrias tigris* (Heckel 1843) .

Tür : *Orthrias panthera* (Heckel, 1843)

Vücut yanlardan basık, standart boy maksimum vücut yüksekliğinin 5,4 – 5,7, baş uzunluğunun 4,1 – 4,4, baş genişliğinin 6,6 – 6,9, baş yüksekliğinin 7,5 – 8,1 katı kadardır. Gözler küçük ve baş uzunluğu göz çapının 4,5 – 4,8 katı kadardır. Kuyruk sapı kısa, dorsal ve ventral taraflarında körelmiş ışıklardan oluşan sertleşmiş birer karina vardır. L.lat. tam olmayıp ancak dorsal yüzgecin başlangıcına kadar uzanmaktadır. Vücudun genel rengi sarımtırak beyazımsı olup, baş bölgesi ile yan tarafları ve sırt kısmı düzensiz şekilli, adeta panter derisini andıran kahverengi beneklerle süslenmiştir. Coğrafik olarak Lübnan, Suriye, Ürdün, Fırat ve Asi nehirleri, Çoruh ve Aras'ta yayılış gösterdiği bildirilmiştir (Geldiay ve Balık, 1988).



Şekil 1.4. *Orthrias panthera* (Heckel, 1843)

1.6. Amaç

Çalışmamızdaki birincil amaç, daha önce morfolojik ve fenotipik yöntemler ile *Orthrias* cinsine dahil edilmiş ve yine bu yöntemlere göre tür düzeyinde teşhis edilmiş üç ayrı *Orthrias* cinsinin 18S rDNA ve COI dizileri kullanılarak, bu *Orthrias* cinslerinin moleküler karakterizasyonunu sağlamak, bu dizilerden elde edilen verilerin, fenotipik yöntemler ile belirlenmiş tür düzeyini destekleyip desteklemediğini saptamak ve yine bu veriler ışığında, bu *Orthrias* cinslerine ait türlerin diğer türler ile arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymaktır. Aynı zamanda COI geninin *Orthrias* cinsleri için DNA barkodu olarak kullanılabilmesinin araştırılması bu tez konusunun amacını oluşturmaktadır.

İkincil amaç olarak; aynı yaşta olmasına dikkat edilerek Kars çayı boyunca toplanan *Orthrias angorae* örneklerinde bulunan antioksidan enzim ailesi üyelerinden GST ve Katalaz enzimlerinin immunohistokimyasal işaretleme ile lokalizasyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma organizması: *Orthrias*

Bu çalışmada kullanılan balıklar Çizelge 2.1’de belirtilen havzalarda serpme ağlarla yakalanmıştır. Laboratuarda çayın kendi suyu kullanılarak hazırlanmış olan akvaryumlara konularak, araştırmalarda kullanılmak üzere bakımı gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışma organizmasının toplandığı havzalar

	Meriç	Marmara	Susurluk	Kuzey Ege	Gediz	Küçük Menderes	Büyük menderes	Sakarya	Yeşil ırmak	Kızılırmak	Konya Kapalı	Seyhan	Asi	Ceyhan	Fırat	Çoruh	Aras	Van Gölü	Dicle
<i>Orthrias angorae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Orthrias pantera</i>													+	+	+		+	+	+
<i>Orthrias tigris</i>														+	+	+	+		+

2.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar (Öziç (2008)’ den modifiye edilmiştir)

- **Ampisilin:** 1000x ampisilin stok solüsyonu (Harmful Katalog no:A 0104) kullanılmıştır.
- **Etidyum bromür:** 10 mg/ml stok solüsyonu hazırlandı.(SİGMA Katalog no: E 8751)
- **Tris :** MERCK Katalog no: 1.08387
- **Tris HCL:** SİGMA Katalog no:05432
- **EDTA:** FLUKA Katalog no: 03620
- **İzopropanol:** Riedel de haen Katalog no: 24137

- **NaOAc (Sodyum orta asetat):**
- **TE:** Tris ve EDTA
- **Etanol** (Riedel de haen Katalog no:071029): Farklı konsantrasyonlarda etanoller kullanıldı (% 70, % 75, % 90 ve % 100).
- **DNaz:** PROMEGA Katalog no:M610A RQI 1U/ μ L
- **Fenol-Kloroform-İzoamilalkol:** SİGMA
- **Kloroform:** Sigma, Katalog no:C2432
- **Gliserol:** % 80'lik gliserol kullanıldı.
- **RNaz:** SİGMA Katalog no: 103K7660
- **10X TBE:** 108 gr trizma base (Sigma katalog no: 114K5415) ve borik asit (Fluka) 600 ml H₂O da iyice çözülür. Daha sonra üzerine 40 ml 0.5M EDTA (FLUKA Katalog no: 03620) eklenir. Toplam hacim 1 lt' ye tamamlanır.
- **Primer antibody** (GST antibody)
- **Primer antibody** (Catalase antibody)
- **Sekonder antibody** (GST antibody)
- **Protein A gold** (20 nm Colloidal Gold)
- **Gelatin Capsule Holder, For size '00'**
- **Glass Knife Boats**
- **Glass Knife Strip** (6.4 mm X 25 mm X 400mm)
- **FF200-Ni Formwar Film Only 200mesh**
- **Numbered Grid Storage Box**
- **LR White MediumGrade** (Chemical Comp: %80 polyhydroxy, %19,6 C12 methacrylade, %0,9 Benzoly peroxide)
- **%16 Parafor Formaldehy.Sol.10ml.**
- **Uranyl Acetate 25 gr.**
- **Silver Acetate 100gr**

2.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

- **Etüv:** GENHART firmasına ait THERMO SHAKER THO 220 etüvü kullanıldı.
- **Santrifüj:** THERMO IC santrifüj, BECKMAN COULTER firmasına ait microfuge 22R türü soğutmalı santrifüj ve BECKMAN COULTER Avanti J 30I kullanıldı.
- **Otoklav:** Eastern Medical firmasına ait Vertical Autoclave tip otoklav kullanıldı.
- **PZR Aleti:** BIORAD firmasına ait iCycler thermal model PZR aleti kullanıldı.
- **Agaroz Jel Elektroforezi:** Thermo EC25090
- **UV Jel Görüntüleme:** Uvitec M02 4611
- **pH Metre:** Orion
- **Vortex:** IKA MS2
- **Su banyosu:** Memmert D-91126
- **Isı bloğu:** Thermoblock Clifton B11
- **Nanodrop spektrofotometre:** Metek ND-100
- **Spektrofotometre:** UV-2101 PC Shimadzu
- **Terazi:** Ohaus pro AV812
- **TEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)**
- **Beckman Coulter marka CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi için DNA SEP. CAPILLARY ARRAY (33 cm x 75 µm) .**
- **Beckman Coulter marka CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi için SAMPLE MICROTITER PLATES 200 µl/well.**

2.1.4. Çalışmada kullanılan kitler (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

- **QIAquick PZR purification kiti** (QIAGEN cat no: 268106)
- **QIAGEN plazmid mini kit** (QIAGEN cat no: 12123)
- **pGEMTeasy vektorsistemi** (PROMEGA cat no: 212440)

- **Beckman Coulter marka CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi için CEQ DTSC KIT** (CEQ™ DTCS Quick Start Kit (Sample Loading Solution (SLS), Genomelab-Beckman Coulter, 6.0 mL ile birlikte verilmeli)
- **Beckman Coulter marka CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi için SEPERATION GEL KIT** (Separation Gel LPA, (for CEQ 8000, CEQ 2000XL and CEQ GeXP) Single Plate Format,1,10 ml, Average Molecular Weight: 7.4 x 10⁶ Da Gel Viscosity: 53,400 cp
- Beckman Coulter marka CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi için SEQUENCING SEPARATION BUFFER
- **RevertAid first strand cDNA sentez kiti** (Fermentas cat no: K1622).
Kit için kullanılan kimyasallar aşağıda belirtildiği gibidir:
 - **Kullanılan reaksiyon tamponu:** 5x M-MLV RTase Buffer; 250 mM Tris-HCl (Promega Cat. No: M531)
 - **RNazin ribonükleaz inhibitörü:** 2500 U, Konsantrasyon: 40 u/μl (Promega Cat. No: N2511)
 - **M-MLV RTaze büyüklüğü:** 50 000 U, Konsantrasyon: 200 U/μl (Promega Cat. No: M1705)
 - **Oligo dT18primer:** 5'CTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTT3', Melting Temp: 36 °C

2.1.5. Çalışmada kullanılan DNA polimeraz setleri (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

Fermentas ve SigmaTaq polimeraz seti (5u/μl)

2.1.6. Çalışmada kullanılan primer setleri

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler ve Tm değerleri.

18s Uni F	5' CTGCCAGTAGTCATATGC 3'	54 °C
18s Uni R	5' ACCTTGTTACGACTTTAC 3'	50 °C
UnivCoxI-F	5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3'	68 °C
UnivCoxI-R	5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3'	70°C

2.2.Yöntemler

2.2.1. Biyoinformatik analizlerde kullanılan programlar (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

GeneTool (Versiyon 1.0): Gene ait restriksiyon analizi, primer tasarımı gerçekleştirilmesi gereken nokta mutasyonlarının belirlenmesi, yatay ve dikey hizalamalarda bu program kullanılmıştır.

PepTool: Sınıflar arasındaki benzerlikler aa dizi bilgileri kullanılarak belirlenmiştir.

ClustalW(1.83), dikey hizalama ve ağaç analizlerinin oluşturulacağı programlara veri hazırlanmasında kullanılmıştır.

MEGA programı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

SWISS-MODEL programı ile üç boyutlu tahmini yapı analizi yapılmıştır.

2.2.2. Orthrias genomik DNA izolasyonu (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

Genomik DNA izolasyonu protokolü:

1) Örneklere ait dokular, bir petri kabı içinde bisturi yardımıyla parçalandıktan sonra bir ependorf tüpüne alınmıştır.

Üzerine;

200µl dH₂O

50µl 0,5M EDTA

10µl %20 sarkosyl

10µl proteinaz K (10mg/ml)

10µl 1M Tris- HCl (pH:8)

5µl 5M NaCl

Karışım 5 dakika boyunca vortekslenmiştir.

2) 30 dk. boyunca 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilmiştir. Bu süreçte her 10 dakikada bir vortekslenmiştir.

3) Hücre süspansiyonuna kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve yavaşça ters-düz edilmiştir.

4) 5 dk. 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

5) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle (veya ağzı jilette kesilen 1000 µl'lik mikropipetle) alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.

6) Fenol:kloroform:izoamil alkol işlemi 3 defa yukarıda belirtildiği şekilde yapılmıştır. Her adımda santrifüj sonunda elde edilen ürünlerden üst sıvı alınmış ve temiz bir ependorf tüpüne alınmıştır.

7) Yeni ependorfa alınmış üst sıvıya hacminin 1/10'u kadan 3M NaAc ve hacminin 2 katı kadar absolü etanol eklenip -20°C'de 1 gece bekletilmiştir.

8) Süre sonunda örnek 10 dakika 13000rpm'de santrifüj edilmiştir.

9) Süpernatant uzaklaştırılmış, pelet kurutulmuştur.

10) Peletin üzerine 200µl dH₂O eklenip pelet çözülmüştür.

- 11) Çözülen peletin üzerine 1/10 hacminde 0,3M NaOAc ve 440µl etanol eklenip -20°C'de 1 gece bekletilmiştir.
- 12) Süre sonunda örnek 10 dakika 13000rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 13) Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır.
- 14) Kurutulduktan sonra pelet 100 µl dH₂O ile çözülmüştür.
- 15) Elde edilen genomik DNA; sırasıyla spektrofotometrik ölçüm ve % 0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsüne göre; kalitesi, RNA kontaminasyonu ve bütünlüğü açısından kontrol edilmiştir (Gaertig et al., 1994).

2.2.3. Orthrias'lardan total RNA izolasyonu (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

Dokular parçalanmış ve daha sonra 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre çökeltisinde TRI reagent kullanılarak (Sigma) total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

TRI solüsyonu ile total RNA izolasyonu (Tri Reagent)

- 1) Dokular 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek pelet haline getirilmiştir.
- 2) Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 3) Peletin üzerine 1ml TRI eklenmiş ve karışım sürekli pipetlenerek homojenat haline getirilmiştir.
- 4) Homojenat 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 5) Daha sonra, TRI'nin her 1 ml'si için homojenata 200 µl kloroform eklenmiştir.
- 6) Örneklerin ağzı sıkıca kapatılmış ve 15 sn. güçlü bir şekilde çalkalanmıştır.
- 7) Çalkalanan karışım 10 dk. oda sıcaklığında bırakılmıştır.
- 8) 13000 rpm'de 15 dk. 4°C santrifüj edilmiştir.
- 9) Renksiz olan üst sıvı faz dikkatlice orta faza dokunmadan alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.

- 10) Ayrılan üst faza 0,5 ml izopropanol ilave edilmiştir.
- 11) Elde edilen numuneler oda sıcaklığında 5-10 dk. bekletilmiştir.
- 12) Örnek 4°C’de, 8dk. ve 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. RNA çökeltisinin tüpün dip kısmında jelimsi ya da beyaz bir pelet halinde olduğu gözlenmiştir.
- 13) Süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA peleti 1 ml, %75’lik etanol ilave edilip vortekslenerek yıkanmıştır.
- 14) Yıkanan örnek, 4°C’de, 5 dk., 8000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- 15) Etanol uzaklaştırılmış ve pelet çeker ocakta 15-20 dk. kurutulmuştur.
- 16) RNA, 80 µl ddH₂O ile çözülmüştür (Sigma TRI-REAGENT (T9424) Teknik Bülteni).
- 17) Elde edilen total RNA sırasıyla spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve % 0.8’lik agaroz jelde analiz edilmiştir (TRI-SİGMA teknik bülten).

2.2.4. Total RNA’nın DNaz muamelesi (Öziç (2008)’ den modifiye edilmiştir)

İzole edilen total RNA kalitesi bakımından incelemek üzere spektrofotometrik ve % 0.8 agaroz jelde görüntülenmiştir. Bu işlemlerden sonra, DNA ile kontaminasyonunu çözmek için DNaz ile muamelesi edilmiştir.

Total RNA’ya DNaz muamelesi

- 1) Hazırlanan RNA süspansiyonu RNase’dan arındırılmış dH₂O kullanarak 250 µl ’ye tamamlanmıştır.
- 2) 80 µl, 50 mM Tris (pH 8.8) ve 5.5 µl DNase RQ1 (1u/µl, Promega), enzimi eklenmiştir.
- 3) Karışım 38°C’ye ayarlı su banyosunda 20 dk inkübe edilmiştir.
- 4) İnkübasyon sonunda reaksiyon ortamına 335 µl Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1) eklenerek karışım vortekslenmiş ve 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 5) Oluşan süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 6) Üzerine 35 µl 3 M Na-O-Ac ve 700 µl saf ethanol eklenmiştir.

- 7) 1-24 saat süreyle -20 °C’de inkübe edilmiştir.
- 8) İnkübasyon sonunda karışım 12000 rpm’de 5 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 9) Pellet çeker ocakta kurutulmuş ve 80 µl dH₂O ile çözülmüştür.

2.2.5. DNA ve RNA’ların spektrofotometre’de ölçümü, miktar ve kalite Tayini (Öziç (2008)’ den modifiye edilmiştir)

DNA ve RNA örneklerinin nanodrop’ta 260 ve 280 nm (nanometre) dalga boylarında ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlerde kör olarak, DNA ve RNA örneklerine ait peletlerinin çözüldüğü tampon kullanılmıştır.

2.2.6. Toplam RNA’dan geri transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA’nın üretilmesi (Öziç (2008)’ den modifiye edilmiştir)

mRNA’dan cDNA’nın elde edilmesi işlemi Geri transkripsiyon olarak ifade edilmektedir. Bu işlem *Moloney Murine Leukima Virüsü* tarafından kodlanan M-MLV ve *Avian myeloblastosis virus* tarafından kodlanan AMV enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler RNA bağımlı DNA polimerazlardır. Bunlar bir primerin hibridize olduğu tek iplikli kalıp RNA’ya karşılık gelen cDNA’nın ilk ipliğini sentezlerler. Bu iki enzimde aynı reaksiyonları katalizlemelerine karşı MMLV enzimi AMV enzimine göre daha fazla kullanılmaktadır. Bunun iki nedeni vardır;

İlki enzimlerin RNaz H aktivitesi arasındaki farklılıktır. Çünkü AMV enzimi daha yüksek RNaz H aktivitesi gösterir. Bu da normalde sentezlenecek olan toplam ürün DNA’nın boyunu kısalmaktadır.

İkinci ise; M-MLV enziminin daha yüksek sıcaklıklarda çalışmasıdır (Roth 1985; Sambrook 1989).

RT reaksiyonu için Fermentas Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (# 1622) kullanılmıştır. Tüm basamaklar kit prosedürüne göre yapılmıştır. İlk olarak RNA izolasyonundan elde edilen RNA örneğinden reaksiyona 5µg girecek şekilde 0.5’lik PZR tüplerine buz içine alınmış ve 1µl oligo dT18 eklenerek son

2.2.7. PZR Reaksiyon Koşulları (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

Genomik DNA kopyasının üretimi:

PZR reaksiyonunda kaynak DNA olarak genomik DNA kullanılmıştır. PZR reaksiyonu yarı bozuk (F ve R) primerlerle kurulmuştur; 2.5 µl 10X tampon, 2.5 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 2.5 µM dNTP karışımı, 2.5 µl F, 2.5 µl R, 0.5 µl genomik DNA , 0.2 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) üzerine son hacmi 25 µl olacak biçimde 12.3µl ddH₂O eklenmiştir.

cDNA kopyasının üretimi:

PZR reaksiyonunda kaynak DNA olarak daha önceden RT reaksiyonu sonucu elde edilen cDNA kullanılmıştır. PZR reaksiyonu yarı bozuk (F ve R) primerlerle kurulmuştur; 2.5 µl 10X tampon, 2.5 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 2.5 µM dNTP karışımı, 2.5 µl F, 2.5 µl R, 0.5 µl cDNA kalıbı (1:10 dilüe), 0.2 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) üzerine son hacmi 25 µl olacak biçimde 12.3 µl ddH₂O eklenmiştir.

Her iki ürün için kullanılan PZR programı: 94°C'de 2 dk., 94°C'de 1 dk., 55°C'de 1 dk., 72°C'de 1 dk., 72°C'de 4 dk. ve 4°C'de ∞ olacak şekilde kullanılmıştır

2.2.8. Agaroz jel analizi ve jel görüntüleme işlemi (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

Agaroz jelde yürütülen DNA parçaları UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dökümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir.

2.2.9. PZR Ürünlerinin Jelden Saflaştırılması (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

RT-PZR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jelde oluşturduğu bantlaşmalara ait büyüklükler uygun markerlar kullanılarak tespit edilmiştir. Beklenen büyüklüğe uygun olan bant jelden kesilerek alınmıştır. Daha sonra QIAquick Gel Extraction Kit ve protokolü kullanılarak saflaştırılması kit kullanım kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir.

2.2.10. PZR ürününün plazmite ligasyonu (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

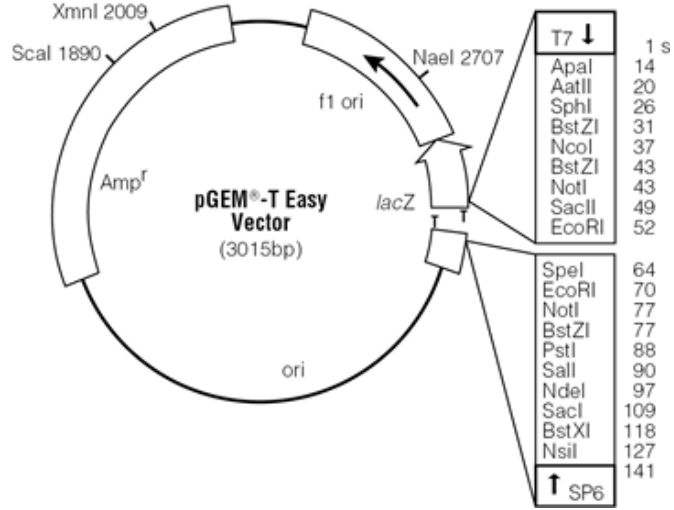
PZR ürününü taşıyıcı plazmite eklemesi T-A klonlanması (plazmitdeki T nükleotid ile Taq polimeraz tarafından PZR ürününün uçlarına eklenen A nükleotidin birleştirilmesi) temeline dayandırılmıştır.

PZR ürünlerine A ekleme reaksiyonu:

1 µl 10X tampon, 1 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 2.5 µM dATP, 6.5 µl PZR ürünü, 1 µl Taq DNA Polimeraz ile hazırlanan karışım 70°C 'de 30 dk. bekletilmiş ve sonra PZR ürünü ligasyona alınmıştır.

Ligasyon:

pGEMTEasy (Promega) vektörü klonlama reaksiyonlarında kullanılmıştır. Vektörler ilgili firmadan elde edilmiştir.



Şekil 2.1. pGEMTEasy (Promega) vektörü.

Ayrıca bu firmanın tavsiye ettiği ligasyon protokolü uygulanmıştır ve öncelikli olarak reaksiyona girecek insert oranı ng cinsinde hesaplanmıştır. Bunun için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\frac{\text{Vektör}(50\text{ng}) \times \text{Insert}(kb)}{0.3(kb)\text{vektör}} \times \frac{\text{Insert}(mol)}{\text{Plazmid}(mol)} = \text{kullanılması gereken insert miktarı}(ng)$$

Kullanılması gereken insert miktarı yukarıda formülle hesaplandıktan sonra ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon aşağıda belirtildiği gibidir:

2X Rapid Ligation Bufer	5 µl
pGEM-T Easy Vektör (50ng/µl)	1 µl
İnsert	X µl
T4 DNA Ligase (5u/µl)	1 µl
Deiyonize su	10µl'ye
	tamamlanmıştır.

Reaksiyon, 16 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

2.2.11. *E.coli* XL-Blue kompetent hücre hazırlığı (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

Aşağıda belirtilen deney protokolü uygulanmıştır;

- 1) LB agarda gelişim gösteren kolonilerden, tek bir koloni seçilerek 10 ml LB Broth içeren erlene ekilmiş ve 37°C'de 120 rpm'de 16 saat inkübe edilmiştir.
- 2) İnkübasyon sonunda kültürden 0,2 ml (200µl) alınarak 100 ml'lik taze LB Broth'a eklenmiş ve 120 rpm'de 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) İnkübasyon erken logaritmik faza kadar devam ettirilmiştir. Erken logaritmik faza erişen kültürün 550 nm'deki OD alınarak takip edilmiştir. Bu işlem için, inkübasyon başlamasından 70-80 dk. sonra spektrofotometrik ölçümler belirli aralıklarla yapılmaya başlanmıştır. Spektrofotometri ölçümleri için dH₂O kör olarak kullanılmıştır.
- 4) Kültürün 550 nm'deki OD değeri 0.56'ya ulaştığında, kültürün 50 ml'si falkon tüpüne aktarılmış ve 4°C'de 5000 g'de 5dk. santrifüj edilmiştir. Geriye kalan 50 ml'lik kültür kullanılmak üzere muhafaz edilmiştir.
- 5) Santrifüj sonunda oluşan süpernatant uzaklaştırılmış ve tüpün üzerine bekletilen diğer 50 ml' lik kültür boşaltılmıştır. Aynı koşullarda bir kez daha santrifüj edilmiştir.
- 6) Santrifüj sonunda süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır.
- 7) Pelete, orijinal kültür hacminin yarısı kadar (50 ml) soğuk 50mM CaCl₂ ile resüspanse edilmiştir.
- 8) Karışım 15 dk. buzda bekletilmiştir.
- 9) Sürenin sonunda karışım 4°C'de 5000 g'de 10 dk. tekrar santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- 10) Pelet, orijinal kültür hacminin %2.5 kadar soğuk 50mM CaCl₂ ile ikinci kez resüspanse edilmiş ve 0,6 ml (600 µl) gliserol (%80'lik) eklenmiştir.

- 11) Karıştırma bittikten sonra, önceden buzlukta tutularak soğutulmuş olan boş ve steril karyojenik tüplerinin her birine 0,2 ml (200 µl) aktarılmıştır.
- 12) Sürenin sonunda tüpler -80°C’de muhafazaya alınmıştır. Böylece kompetent olmayan XL1-Blue *E.coli* suşu kompetent hale getirilmiştir.

2.2.12. Kompetent *E.coli*'nin transformasyonu (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

Klasik transformasyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre:

- 1) Kompetent hücreler -80°C’den alınmış ve buzda 5 dk. bekletilmiştir.
- 2) Ligasyon sonunda elde edilen ürün hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklenmiş ve kuru buzda 30 dk. bekletilmiştir.
- 3) Süre sonunda örnekler buzdan alınmış ve 42°C’ ye ayarlanan ısı bloğuna bırakılmıştır.
- 4) Isı bloğundan alınan örnekler buzda 3 dk. bekletilmiştir.
- 5) Sürenin bitiminde örneklerin üzerine 500 µl LB eklenmiş ve 37 °C’de 35 dk. inkübe edilmiştir.
- 6) Bekleme süresinde ekim yapılacak petrilere 40 µl X-Gal eklenmiştir.
- 7) Süre bittikten sonra 10000 rpm de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- 8) Tüp içerisinde süpernatantan 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 9) Pelet 50 µl içerisinde çözülmüş, sonra LB-agar-ampisilin-XGal tabağının yüzeyine dağıtılmış ve bir gece 37 °C’de inkübe edilmiştir.

Klasik transformasyon yöntemiyle gerçekleştirilen transformasyon sonrasında oluşan mavi beyaz kolonilerden beyaz renkli olan kolonilerden 10-20 adet koloni seçilerek numaralandırılmıştır. Aseptik koşullar altında öze yardımıyla alınarak, önceden hazırlanmış olan 40 µl X-Gal içeren LB Agar Amfisilin (100 µg/µl) petrilere çizgi ekimleri yapılarak master plate oluşturulmuştur. Bu işlemi takiben, özede kalan artık ile 10 ml’lik 100 µg/µl amfisilinli LB medium

besiyerine ekim yapılmıştır. X-Gal içeren LB Agar amfisilin tabakları ve LB Medium 37 °C’de bir gece inkübe edilmiştir.

2.2.13. Plazmit izolasyonu (Öziç (2008)’ den modifiye edilmiştir)

Uygulama Adımları:

A: Bakterinin büyütülmesi

- 1) Beyaz kolonilerden plasmit izolasyonu yapılabilmesi için bir gece koloniler 120 rpm’de 37°C’de LB agar ampisilin (100 µg/µl)’de büyütülmüştür. Besiyerleri falkon tüplere aktarılmış ve 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 2) Üzerlerine 1000 µl 50 mM Tris-HCl (pH:8.0) eklenmiştir.
- 3) Vorteks ve pipetleme ile pelet çözülmüş ve eppendorflara aktarılmıştır.
- 4) 1 dakika süreyle 8000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- 5) Sıvı tamamen uzaklaştırılmıştır.

B: Bakteri peletinin parçalanması

- 1) 150 µl Lizozim-Tris ve 20 µl 0.5 M EDTA (pH 8) karıştırılarak pelet üzerine aktarılmış ve pelet bu solüsyon içinde kürdan ile çözülmüştür.
- 2) 30 dakika buzda inkübe edilmiştir.

C: Plazmit DNA’sının çöktürülmesi

- 1) Her bir tüpe 400 µl 0.2 M NaOH- %1 SDS (1:1) koyulmuş ve tüpler birkaç kez ters düz edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilmiştir
- 2) Sürenin sonunda 300 µl 7.5 M amonyum asetat eklenmiştir. Tüpler yavaş bir şekilde ters düz edilmiştir ve 10 dakika buzda inkübe edilmiştir.

D: Çöken plazmitin saflaştırılması

- 1) Süre sonunda tüpler buzdan alınarak 15 dakika boyunca 8000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

- 2) Süpernatant yeni ependorflara aktarılmıştır.

E: Fenol-kloroform uygulaması

- 1) Süpernatantın üzerine 800 µl fenol+ kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenmiştir.
- 2) Tüpler çalkalanmış ve çalkalamalı tabla üzerinde 5 dakika karışması sağlanmıştır.
- 3) Süre sonunda tüpler 2 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 4) Meydana gelen 3 fazdan plazmit içeren en üst faz yeni tüpe aktarılmış ve üzerine her bir süpernatantın hacminin 0.6 katı kadar 2-Propanol eklenmiştir. Tüpler ters düz edilerek karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 5) Süre sonunda 10 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 6) Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelette kalan sıvısında kuruması çeker ocak altında sağlanmıştır.
- 7) Pelet üzerine 200 µl 0.3 M NaOAc eklenmiş ve pelet bu sıvı içinde dikkatlice çözülmüştür. Hazırlanan bu karışımın üzerine 400 µl saf etanol eklenmiş ve -20°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.
- 8) Tüpler 10 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet çeker ocak altında iyice kurutulmuştur.
- 9) Pelet 30 µl TE ile çözülmüş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.14. Restriksiyon enzimleriyle kesim (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

İzole edilen plazmitlerin klonlanması hedeflenen DNA parçasını içerip içermediği saptanması için; plazmit EcoRI (sigma), restriksiyon enzimiyle rutin olarak kesilmiştir. Kullanılan kesim reaksiyonu;

- 1 µl EcoRI (10,000 u/ml) enzimi (Fermentas)
- 1 µl 10X EcoRI enzim tamponu
- 1 µl Plazmit (1.380 ng/µl)
- 7 µl H₂O şeklindedir.

Hazırlanan reaksiyon tüpü 37°C’de 1-16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kesime uğrayan ve içinde klonlanmış DNA parçası içerenler “pozitif koloni” olarak tanımlanmıştır.

2.2.15. DNA dizi analizi (Öziç (2008)’ den modifiye edilmiştir)

2.2.15.1. Dizi analizi için PZR

Plazmite eklenmiş olan genlerin DNA dizi bilgisini belirlemek için; plazmit üzerinde bulunan T7 ileri primeri, (dizi bilgisi 5’ CGACGTCGCATGCTCCCGGCC 3’) adı verilen ticari primerin tanıdığı bölgeden yararlanılarak PZR reaksiyonu kurulmuştur.

Öncelikle PZR için kullanılacak kalıp plazmit iyi kalitede saflaştırılmış olmasına ve RNA kontaminasyonun olmamasına dikkat edilmiştir. Plazmitin konsantrasyonu ve saflık derecesi (OD 260/280 en az 1,8) spektrofotometre yardımıyla belirlenmiştir.

Plazmit ve eklenmiş olan gen parçasının toplam büyüklüğü hesaplanarak PZR reaksiyonuna eklenecek kalıp miktarı optimal değerleri gösteren çizelge 2.2’den saptanmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünleri ve plazmitler için 50 fmol kalıp DNA kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Dizi analizine girecek örnekler için PZR kalıp miktar çizelgesi (Beckman Coulter CEQ8000 dizi analizi kiti teknik bülteni)

Büyüklik (kb)	25 fmol’e denk gelen değer (ng)	50 fmol’e denk gelen değer (ng)	100 fmol’e denk gelen değer (ng)
0.2	3.3	6.5	13
0.3	4.9	9.8	20
0.4	6.5	13	26
0.5	8.1	16	33
1.0	16	33	65
2.0	33	65	130
3.0	50	100	195
4.0	65	130	260
5.0	80	165	325
6.0	100	195	390

8.0	130	260	520
10.0	165	325	650
12.0	195	390	780
14.0	230	455	910
16.0	260	520	1040
18.0	295	585	1170
20.0	325	650	1300
48.0	790	1500	1500

Dizi analizi için PZR'ye girecek plazmit DNA'sı 86 ng/µl konsantrasyona sahip olduğu belirlenmiştir.

1 µl stokta 86 ng DNA varsa

X µl stokta 100 ng DNA olmalıdır.

X= 1.05 µl miktarda kalıp DNA PZR için kullanılmıştır.

DNA dizi analizi PZR için (20 µl):

Kalıp DNA (100 ng) 1.05 µl

Deiyonize su 5.95 µl

Primer (T7 primeri) 2 µl

DTCS karışım (Çizelge 2.3) 11 µl

Toplam: 20 µl

DTCS karışımı: Beckman Coulter CEQ8000 cihazı için kullanılan hazırlık kitinde bulunan bileşenler reaksiyondan önce DTCS mix hazırlığında kullanılmaktadır. Bu karışım A/T zengini veya G/C zengini diziler için farklı şekilde hazırlanır. Dizi analizi için dITP bileşenli karışım kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. DTCS karışımı bileşenleri.

Bileşen	dITP	dGTP
10x Reaksiyon Tamoponu	200 µl	200 µl
dNTP mix	100 µl	100 µl
ddUTP Dye terminator	200 µl	200 µl
ddGTP Dye terminator	100 µl	400 µl
ddCTP Dye terminator	200 µl	200 µl
ddATP Dye terminator	200 µl	200 µl
Polimeraz Enzimi	100 µl	100 µl
Toplam hacim	1100 µl	1400 µl

DNA dizi analizi PCR ısı döngüsü, 0,2 ml'lik PCR tüpüne önce kalıp ve su eklenir. 86°C'de 3 dakika bekletilir ve buza alınarak 1 dakika tutulur. Bu adıma **zorunlu plazmit denatürasyon adımı** denir. Buzda sırasıyla primer ve DTCS karışımı yukarıdaki hacimlerde eklenerek aşağıdaki ısı döngüsü uygulanır.

96°C	20 sn.	} 35 siklus
50°C	20 sn.	
60°C	4 dk.	

2.2.15.2. Etanol çöktürmesi

Çalışmamızda kullanılan (Beckman Coulter DNA Dizi Analizi) cihazına ait dizi analizi kitinin teknik bültenine göre dizi analizine girecek PZR ürünlerinin etanolla çöktürülüp saflaştırılması yapılmıştır.

1,5 ml'lik steril ependorf tüpleri isimleriyle etiketlenmiştir. Tüplere 4 µl **stop solüsyonu** ve 1 µl 20 µg/µl glikojen (Kit'ten) eklenmiştir.

Stop Solüsyonu: 3M NaOAc (pH:5.2) ile 100mM Na₂EDTA (pH:8.0) eşit hacimde karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu karışım oda ısısında yapılmış ve kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanır.

Yukarıda hazırlanmış solüsyon PCR ürünlerine eklenmiş ve pipetleyerek çok iyi karıştırılır. Taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilmiş %95'lik etanolden 60 µl pelete zarar vermeden yavaşça eklenir. Tüpler 4°C'de 14,000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenir ve dipte oluşan pelet rahatsız edilmeden süpernatant dikkatli şekilde uzaklaştırılır.

Pelete 200 µl taze olarak hazırlanmış ve -20°C'de bekletilen %70'lik etanolden pelete zarar vermeden tüplerin kenarından çok yavaş biçimde bırakılır. Tüpler 4200 µl 14,000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenir ve dipte oluşan pelet rahatsız edilmeden süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılır. Bu işlem iki kez tekrarlanır.

Süpernatant dökülür, tüp içindeki pelet şeffaf hale gelinceye kadar 40°C'de 10 dk. konsantre edilir. Pelete 40 µl SLS (Sample Loading Solution-Kit'ten)

eklenir ve 10 dakika buzda bekletilir. İyice pipetleyerek pelet çok iyi çözülür ve santrifüjde kısa bir spin attırılıp 4°C'ye kaldırılır.

2.2.15.3. DNA dizi bilgisinin elde edilmesi

Cihazın içinde örnek tablası ve tampon tablası adında iki aparat bulunmaktadır. Örnek tabağına 40 µl SLS içeren örnekler sırasıyla eklenir ve üzerlerine kit içinden birer damla mineral yağ damlatılır. Tampon tablasına da yine kit içinden ayırma tamponu, kuyucukların %70'ini dolduracak kadar eklenir ve kapiller aparatı ile jel tüpü cihaza takıldıktan sonra dizi analizi işlemine başlanır. Dizi analiz sonucunda cihaz tarafından okunan veriler bir metin belgesine kaydedilir.

2.2.15.4. Biyoinformatik analizi

Dizi analizi sonucunda elde edilen dizi değişik biyoinformatik programlarla (GeneTool, PepTool ve İnterproscan) ile GenBankasında BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:BLAST>) (Altschul, 1990) analiz edilmiştir.

2.2.16. GST ve Katalaz Enzimlerinin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi için Uygulanan İşlemler (Aydoğan (2010)'dan modifiye edilmiştir)

İmmünohistokimya; işaretlenmiş antikorlar kullanılarak belli bir dokuya ait antijenlerin belirlenmesi işlemidir. Belirli antijenler içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikorlar içeren bir solüsyonda inkübe edildiği zaman, antikorlar spesifik olarak antijenlere bağlanır. Oluşan bu antijen-antikor komplekslerini ya immünohistokimya (ışık) ya da ultrastrüktürel immunositokimya (elektron mikroskopla) yöntemler ile gözlemleyebiliriz.

İmmunohistokimyasal metodlar uygulama biçimlerine göre ikiye ayrılır.

- 1) Direkt metod
- 2) İndirekt metod

1) Direkt metod: Antijene karşı oluşturulan antikor işaretlenerek antijen-antikor biraraya gelerek oluşturdukları kompleks esasına dayanır.

2) İndirekt metod: Çeşitli hayvanlar kullanılarak antijene karşı antikor üretimi gerçekleştirilir. İndirekt yöntem direkt yöntemden daha duyarlıdır. Çünkü her bir anti-antijen antikoru, işaretlenmiş anti-antikorun bazı moleküllerini bağlar bu nedenle duyarlılığı daha fazladır.

2.2.16.1. Karaciğer Örneklerinin Tespiti

Diseksiyonla alınan karaciğer örnekleri hayvandan çıkarılırken ve çıkarıldıktan hemen sonra 0.1 M soğuk fosfat tampon (PB Tampon) (pH 7.3) ile yıkanmış, aynı tampon içerisinde 1 mm³'lük parçalara ayrılmış, otolize uğramamaları ve antijenik özelliklerini katbetmemeleri için hızlıca % 4'lük paraformaldehit ve % 1'lik glutaraldehit (pH 7.3) içeren tespit solüsyonuna alınmıştır.

2.2.16.2. Doku Takip İşlemleri

- 1) Dokular 2 saat süre ile oda ısısında fiske edilmiştir.
- 2) Dokulara;
% 50'lik etanolde 20 dk., % 70'lik etanolde 20 dk., % 90'lık etanolde 5 dk. olmak üzere dehidrasyon işlemleri uygulanmıştır.
- 3) Dokular 2:1 oranında LR Beyazı/ % 70'lik etanol karışımında 1 saat süre ile 40 rpm'de rotatorda döndürülmüştür.
- 4) Dokular saf LR beyazı reçinesi içerisinde 1 gece süre ile 40 rpm'de rotatorda döndürülmüştür.
- 5) Dokular saf LR Beyazı reçinesi içerisinde jelatin kapsüllere gömülmüştür.
- 6) 50 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- 7) İnkübasyonun ardından ultramikrotomda 800 nm kalınlığında yarı ince kesitler alınmıştır.
- 8) Alınan yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanmıştır ve Leica DMLS2 ışık mikroskopunda incelenmiştir.

- 9) Yarı ince kesitler hazırlanan bloklardan 90 nm kalınlığında ince kesitler hazırlanarak gridler üzerine alınmıştır.

2.2.16.3. İmmunohistokimyasal İşaretleme İşlemleri

İmmunogold işaretleme LR beyazı kesitleri için uygun olan Skepper ve Powell (2006) metoduna göre yapılmıştır.

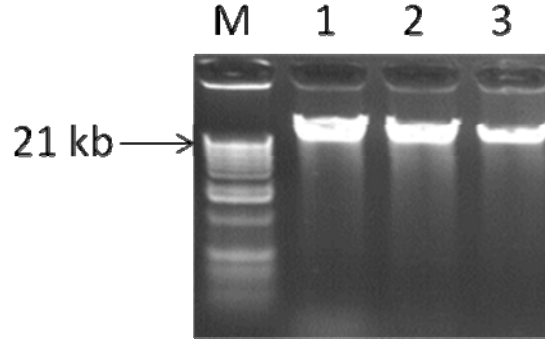
- 1) Gridler üzerine ince kesitler glisin içeren fosfat sali tamponu (PBSG) içerisinde 10 dk. süre ile inkübe edilmiştir.
- 2) Kesitler, PBSG tampon (pH 7.3) içerisinde dilüsyonu yapılmış olan GST ve Katalaz antibadi solüsyonu ile 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.
- 3) Kesitler 1X fosfat salin (PBS) tampon (pH 7.3) ile 2'şer kez 10 dk. yıkama yapılmıştır.
- 4) Kesitler PBSG tampon içerisinde dilüe edilmiş protein A-20 nm gold ile oda sıcaklığında 2 saat süre ile inkübe edilmiştir.
- 5) Kesitler distile su ile 30-40 saniye yıkanmıştır.
- 6) Kesitler % 2'lik uranilasetat ve % 4'lük kurşun sitrat boyası ile boyanmıştır.
- 7) Kesitler A.Ü. BİBAM'da bulunan Philips Biotwin Elektron mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

3. BULGULAR

Orthrias cinsi üyelerinde türler arasında morfolojik farklar çok çarpıcı ve ayırt edici bir biçimde görülmediğinden, Orthrias türlerinin taksonomisi için yalnızca morfolojik karakterlerin kullanımı yeterli olmayabilir. Orthrias türleri ile ilgili analizler deneysel veya biyoinformatik olarak henüz detaylıca çalışılmamıştır. Aşağıda bu tez çalışması esnasında kullanılan moleküler teknikler sonucu elde edilen bulguların tanımlaması yapılmıştır.

3.1. Orthrias türlerinden genomik DNA izolasyonu

Orthrias türlerinden genomik DNA izolasyonu deneyleri bölüm 2.2.2’de belirtilen protokollerde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. Buna göre elde edilen deney sonuçları Şekil 3.1’de belirtilmiştir.



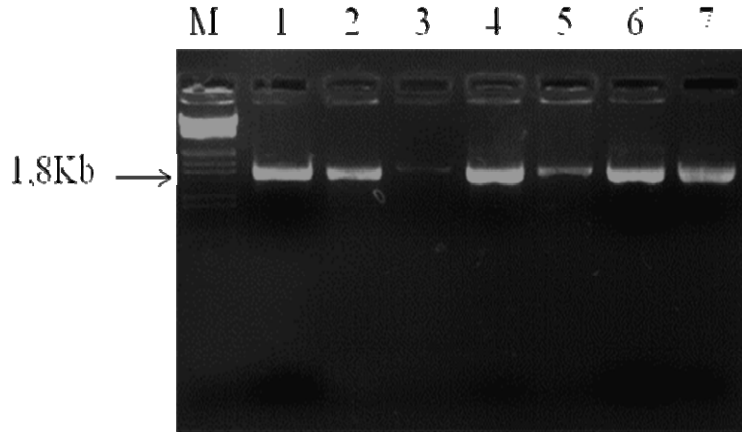
Şekil 3.1. Orthrias türlerinden genomik DNA’sının agaroz jelden görüntüsü. **M)** λ DNA EcoRI/Hind III Marker, **1)** Orthrias türleri genomik DNA’sının agaroz jelden görüntüsü (% 0.8’ lik agaroz jel’e 1 μ l λ DNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V 50dk. yürütülmüştür).

3.2. DNA’ların spektrofotometrede ölçümü

İzolasyonu yapılan DNA’ların kalite ve saflığını belirlemek için spektrofotometrik analizi yapılmıştır. Bu sonuçlar içinde elde edilen genomik DNA izolasyon ürününün spektrofotometrik ölçümleri yapıldığında örneğin 213 ng/ μ l yoğunlukta DNA içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.1).

3.3. Orthrias türlerinden 18S rRNA genini eldesi

Orthrias türlerinden genomik DNA'lar kullanılarak 18S rRNA genine spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve reaksiyon ürünü agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.2). Beklenen büyüklük olan 1800 bç'lik ürün elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Orthrias türlerinden 18S rRNA genleri PCR reaksiyonunun agaroz jelden görüntüsü. **M)** 50bp Marker, **1-2)** *Orthrias* genomik DNA'sından 18S rRNA genleri agaroz jelden görüntüsü (% 0.8' lik agaroz jel'e 1µl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V 50dk. yürütülmüştür).

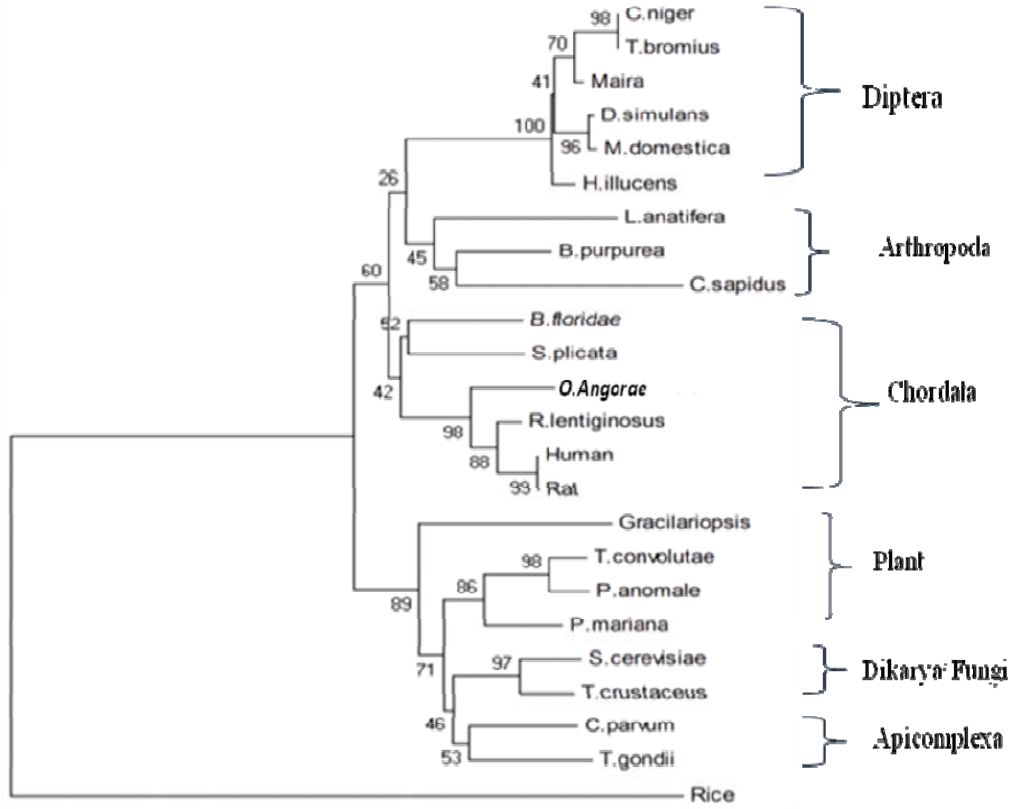
Şekil 3.2 'de elde edilen ürünler jelden kesilmiş ve beklenen tahmini ürün büyüklüğü olan 1800 bç parça jelden saflaştırılmış. Saflaştırılan ürünler Beckman Coulter CEQ8000 DNA dizi analiz aletinde dizi analizine tabii tutulmuş ve kullanılan primer bilgileri temizlenmiştir. Nükleotid dizisi belirlenen PZR ürünleri NCBI veritabanında analiz edilmiştir.

T. convolutae	GCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACA-ATACCGGGCT
P. anomale	GCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACA-ATACCGGGCA
P. mariana	GCGCAAATTACCCAATCCTGACATGGGGAGGTAGTGACAATAAATAN-A-ATACTGGGCT
S. cerevisiae	GCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACG-ATACAGGGCC
T. crustaceus	GCGCAAATTACCCAATCCCGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTG-ATACAGGGCT
C. parvum	GCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA-ATACAGGACT
T. gondii	GCGCAAATTACCCAATCCTGATTGAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA-ACACTGGAAA
Gracilariopsis	GCGCAACTTACCCAATCCCGACACCGGGAGGTAGTGACAAGAAATAAGCA-ATAGAGGGCC
C. niger	GGGTAAATTACACACTCCCGACACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
Maira	GCGTAAATTACCCACTCCCGACACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
H. illucens	GCGTAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
D. simulans	GCGTAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
M. domestica	GCGTAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
B. purpurea	ACGCAAATTACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-AGACGGGACT
L. anatifera	GCGTAACTTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTTACAGAGGTCT
Human	GCGCAAATTACCCACTCCCGACCCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
Rat	GCGCAAATTACCCACTCCCGACCCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
R. lentiginosus	GCGCAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
O. angorae	GCGCAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
O. pantera	GCGCAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
O. tigris	GCGCAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
B. floridae	GCGCAAATTACCCACTCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACGGGACT
S. plicata	GCGCAAATTACCCATTCGACACACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACA-ATACAGGACT
G. carolinensis	GCNCNNATTACCCACTCC-GACTNNGGNANNNGTNANNAAAAATAACA-ATACAGGACT
C. sapidus	ACGCNNATTACCCACTCC-GGCNCGGGGAGGTAGTGACNAAAAATAACG-ATGCGGAGACT
Rice	TGGAATGCTTCGGATCCCTTAAAC--GCATACCGCACCTAAATGATGCCGTATAGCCGG

Şekil 3.3. Belirli türlerde 18S rRNA geninine ait hizalama sonuçları.

18S rRNA geninin evrimsel analizi yapılmıştır. Bunun için ilk olarak diğer türlere ait dizi bilgilerine NCBI veri tabanından ulaşılmıştır. Filogenetik ilişkilerini belirlemek için nükleotid dizileri EBI veritabanındaki dbcluster ile dikey hizalanmıştır (Şekil 3.3).

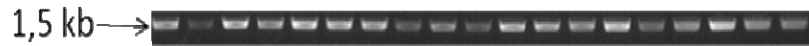
Evrimsel yakınlıklarını belirlemek için seç-bağla (bootstrap) yöntemi 1000 tekrarlı kullanılarak Şekil 3.4'te görülen filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dış grub olarak da Rice türüne ait dizi bilgisi kullanılmıştır. Ağaç analizinde de görüldüğü gibi; belirli türler kendi aralarında benzerlik gösterirken, Orthrias türleri ise dahil oldukları Kordalılar (Chordata) şubesinde yer almıştır. Bazı türlere ait 18S rRNA geni dizi bilgileri ile elde edilen dizi analizi sonucu karşılaştırılınca, 18S rRNA geninin türler arasında ne kadar iyi korunduğu görülmüştür.



Şekil 3.4. 18S rRNA geninin farklı türlere ait filogenetik ağaç analizi (1000 tekrarlı bootstrap ile oluşturulmuş ve Neighbor-joining yöntemi ile çalışan ClustalW ve MEGA4 programları kullanılmıştır).

3.4. Orthrias türlerinden COI genini eldesi

Orthrias angorae genomik DNA'ları kullanılarak COI genine spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve reaksiyon ürünü agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.5). Beklenen büyüklük olan 1550 bp'lik ürün elde edilmiştir.



Şekil 3.5. *Orthrias angorae* COI geninin PCR görüntüsü.

Orthrias pantera türlerinden genomik DNA'ları kullanılarak COI genine spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve reaksiyon ürünü

agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.6). Beklenen büyüklük olan 1550 bp'lik ürün elde edilmiştir.



Şekil 3.6. *Orthrias pantera* COI geninin PZR görüntüsü.

Orthrias tigris genomik DNA'ları kullanılarak COI genine spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve reaksiyon ürünü agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.7). Beklenen büyüklük olan 1550 bp'lik ürün elde edilmiştir.



Şekil 3.7. *Orthrias tigris* COI geninin PZR görüntüsü.

Şekil 3.5, 3.6 ve 3.7 'de elde edilen ürünler jelden kesilmiş ve beklenen tahmini ürün büyüklüğü olan 1550 bp parça jelden saflaştırılmış. Saflaştırılan ürünler Beckman Coulter CEQ8000 DNA dizi analiz aletinde dizi analizine tabii tutulmuştur. Nükleotid dizisi belirlenen PZR ürünleri NCBI veritabanında analiz edilmiştir.

COI geninin evrimsel analizi yapılmıştır. Bunun için Türkiyede belirli havzalarda lokalize olan *Orthrias* türlerinden elde edilen dizi analizi sonuçları kullanılarak, NCBI veri tabanından hangi türlere benzerlik gösterdiği incelenmiştir. Dahil olduğu Balitoridae familyasına ait türlerle benzerlikler gösterdiği belirlenmiş (Ek-2) fakat %90-100 arası benzerlikler gösterdiği türlere ulaşamamıştır. Bu türün kendi içinde farklı lokalitelerden alınma kriteri göz önüne alınarak, bunlar arasındaki benzerliği belirlemek için nükleotid dizileri EBI veritabanındaki dbcluster ile dikey hizalanmıştır (Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10).

Elde edilen 1550 bp'lik COI geninin 650 bp'lik kısmının birçok *Orthrias* türünde ortak olduğu belirlenmiştir (Ek1). Bu dizinin COI'de barkod olabileceği düşünülmektedir.

Maric	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
Marmara	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
Susuzluk	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L
Kuzey Ege	--MKKP----	ILYGCIVCPYTNKVRFALEMLKI DYKYQEIDIL	-TGMNNSYLOINP-Q
Gediz	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
K.Menderes	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
B.Menderes	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L
Sakarya	--MKKP----	ILYGCIVCPYTNKVRFALEMLKI DYKYQEIDIL	-TGMNNSYLOINP-Q
Yeşilirmak	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
Kızılırmak	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
Konya Kapalı	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L
Beyhan	--MKKP----	ILYGCIVCPYTNKVRFALEMLKI DYKYQEIDIL	-TGMNNSYLOINP-Q
Asi	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
Ceyhan	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
Fırat	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L
Çoruh	--MKKP----	ILYGCIVCPYTNKVRFALEMLKI DYKYQEIDIL	-TGMNNSYLOINP-Q
Araz	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
Van gölü	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
Dicle	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L
Cobitidae	-----	MSQLLFGSWIQRCNAMPTRFILLEVTQTNVNEKIYVSENESEMFQRDQKQFKQ-F	

Şekil 3.8. *Orthrias angorae* COI geninin kısmi hizalama sonuçları.

Asi	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
Ceyhan	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
Fırat	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L
Araz	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
Van gölü	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
Dicle	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L

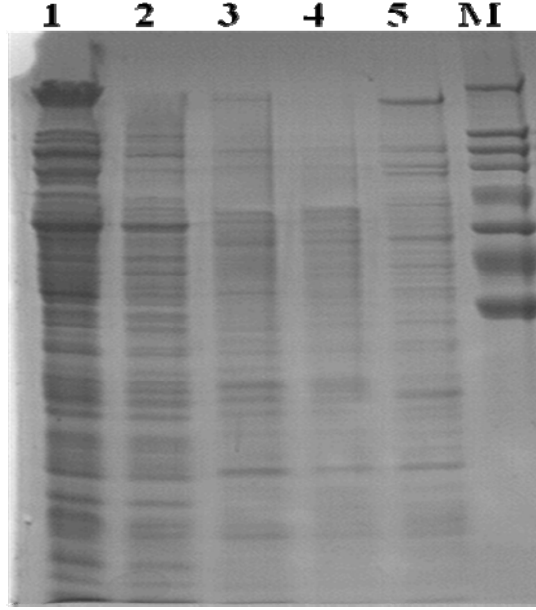
Şekil 3.9. *Orthrias pantera* COI geninin kısmi hizalama sonuçları.

Ceyhan	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALENIQVKYDYKEVDLY	-KFKHKEQAYLDINP-F
Fırat	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L
Çoruh	--MKKP----	ILYGCIVCPYTNKVRFALEMLKI DYKYQEIDIL	-TGMNNSYLOINP-Q
Araz	--MSQ----	LTLYGFLLCPPYVQRVRFPALEKIGVKYDYKEIDLF	-KIKQKEQAYLDINP-F
Dicle	--MSQPH--	LKLYGNILCPYVQRVRFPALEALKLQDYVEIDLL	-AKKHLQEEYLAINP-L

Şekil 3.10. *Orthrias tigris* COI geninin kısmi hizalama sonuçları.

3.5. Orthrias türlerine ait proteinlerin izolasyonu ve SDS-Page ile analizi

Orthrias türlerine ait protein izolasyonu deneyleri bölüm belirtilen protokollerde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. Buna göre elde edilen deney sonuçları Şekil 3.11’de belirtilmiştir.



Şekil 3.11. Orthrias türlerinden protein izolasyonlarının SDS-Page görüntüsü. **M)** Broad Range Marker, **1-5)** *Orthrias angorae* proteinlerin SDS-Page görüntüsü (% 10 SDS-Page 10µl Broad Range Marker ile birlikte yüklenmiş ve 80 V 90dk. yürütülmüştür).

Protein izolasyonu sonucu, 5 farklı *Orthrias angorae* türünün hepsinde 200 kDa büyüklüğünde bantlar görülmüş ve bu bantların Miyosin proteinine denk geldiği görülmüştür. Aynı şekilde sırasıyla; 120, 46, 38 ve 19 kDa büyüklük , bu büyüklüklerin denk geldiği proteinler β -Galaktosidase, Ovalbumin, Karbonik anhidraz ve Lizozim olarak belirlenmiştir.

3.6. *Orthrias angorae* GST ve Katalaz genlerinin mRNA ekspresyonu (Öziç (2008)' den modifiye edilmiştir)

İlk aşamada GST (Ek 4) ve Katalaz (Ek 5) enzimlerinin total aktivitesine bakılmıştır. Aktivitesi belirlendikten sonra RT-PZR yöntemi ile ekspresyonuna bakılmıştır. RT-PZR temelli mRNA ekspresyonu çalışmalarında belirli kritik adımlar bulunmaktadır (Marone ve ark. 2001; Meadus W.J., 2003). Bu adımlardan birincisi; mRNA seviyesini etkilemediği bilinen yani mRNA'nın sürekli belirli bir seviyede üretildiği bir genin belirlenmesi gerekmektedir. İkincisi ise total RNA izolasyonlarının, kontrol geni primerleri kullanılarak DNA kontaminasyonu içermediğinin belirlenmesidir. Üçüncüsü; kontrol geninin, kontrol olarak kullanılabilmesi için yüksek döngülerde elde edilen sonuçları (27 döngü) ile düşük döngüden başlayarak artan döngülerde (sırasıyla 18, 21, 24) elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması gerekmektedir. Burada amaç kullanılacak döngü sayısının kontrol genine ait bant oluşumunu etkilemediğini ve mRNA seviyelerinin gerçekten değişmediğini göstermektir. Dördüncü ise; yüksek veya düşük MgCl₂ miktarının PZR şartlarını etkileyeceği düşünülerek farklı konsantrasyonlar denenerek PZR kurulması, böylece en uygun PZR şartlarının sağlanması gerekmektedir.

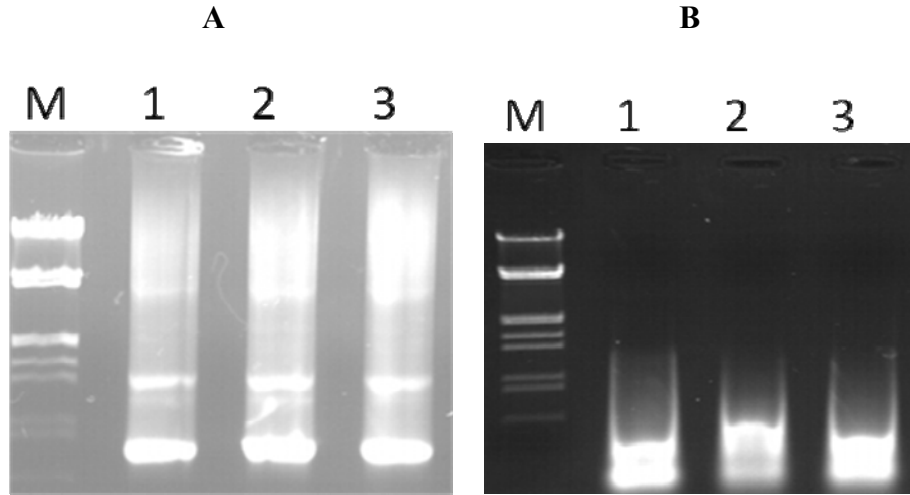
mRNA ekspresyonu deneylerinin uygulanması sırasında dikkat edilmesi gereken önemli adımlar göz önüne alınmıştır. *Orthrias angorae*'lardan alınan karaciğer dokularından, ilk önce total RNA izole edilmiştir. Şekil 3.12-A'da görüldüğü üzere izole edilen RNA örneklerinin RNA bantları ile birlikte DNA bantlarının da içerdiği görülmüştür. Bu bilgi RNA izolatlarının Nanodrop ile spektrofotometik olarak ölçümleri sonucunda da desteklenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. RNA izolatı	2,5 µg/µl	A _{260/280} : 1.9
2. RNA izolatı	1.6 µg/µl	A _{260/280} : 1.8
3. RNA izolatı	1.2 µg/µl	A _{260/280} : 1.9

Sonuçlardan görüldüğü gibi, RNA örneklerinin saflık değerinin düşük olması ve jel görüntüleri DNA kontaminasyonu olduğunu göstermiştir. RNA izolatlarının Nanodrop ile spektrofotometrik olarak ölçümleride bu izolatlarla DNaz uygulanmasının gerektirmiştir. Şekil 3.12-B’de görüldüğü üzere RNA’ların DNA kontaminasyonu içermediği bulunmuştur. Total RNA’ların yoğunlukları DNaz uygulanması sonucu tekrar Nanodrop ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. RNA izolatu 1.8 µg/µl A_{260/280}: 2.1
2. RNA izolatu 1.3 µg/µl A_{260/280}: 2.2
3. RNA izolatu 1.0 µg/µl A_{260/280}: 2.1

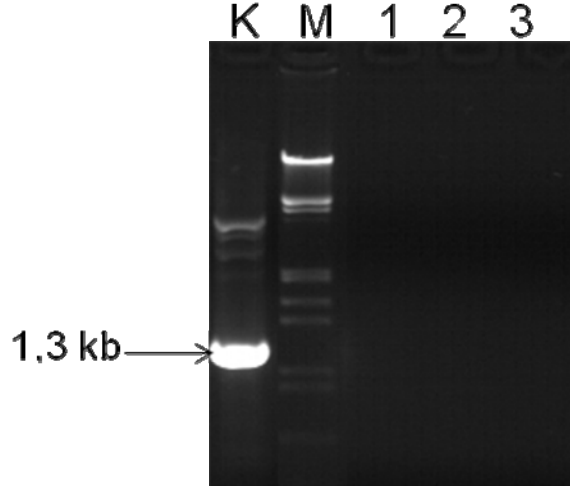
Bu sonuçlara göre RNA izolatlarının saflığının ve yoğunluğunun iyi olması RT reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 3.12. *Orthrias angorae*’lardan alınan karaciğer dokularından RNA izolasyonu ve RNA’lara DNaz uygulaması. **A)** 1,2,3, nolu örneklerden elde edilmiş RNA agaroz jel görüntüsü **B)** 1,2,3, nolu örneklerden elde edilmiş DNaz uygulanmış RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü **M:** EcoRI HindIII Lambda Marker (%0.8’lik agaroz jel’e 2µl yüklenmiş ve 90 V’de 50dk. yürütülmüştür).

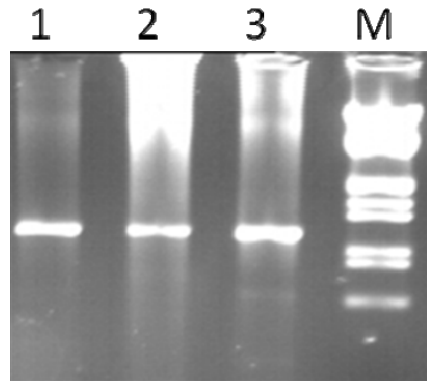
İzolasyonlar başarılı biçimde gerçekleştirildikten sonra, olası hata payları göz önüne alınarak kontrol olarak kullanılması düşünülen actin genine ait primerler kullanılarak, DNaz uygulanmış total RNA’da DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için kontrol PZR’ı yapılmıştır (actin geni gDNA uzunluğu 1300 bp’dir). Şekil 3.13’un 1.kuyusunda gDNA kalıbı ile kurulan PZR beklenen 1300

bç ürünü verirken; RNA'lar herhangi bir ürün vermemiştir. Bu da RNA'ların DNA kontaminasyonu içermediğini tamamen gösterilmiştir.



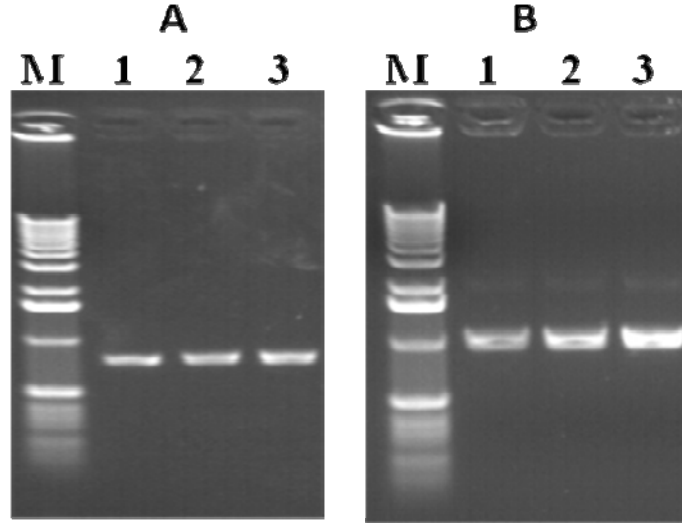
Şekil 3.13. *Orthrias angorae*'lardan DNaz uygulanmış total RNA'da actin genine ait primerler kullanılarak, DNA kontaminasyonunun olmadığı belirlenmesi için kurulan kontrol PZR sonuçları. **K:** Genomik DNA kalıbından actin geni primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunun agaroz jel görüntüsü. **1, 2, 3** nolu örneklerden elde edilmiş DNaz uygulanmış RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü **M:** EcoRI HindIII Lambda Marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).

RNA'ların saflığı ve kalitesi RT reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermiştir. Üç farklı primer seti, kullanılarak PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki actin primerleri ile kurulan ve RT-PZR reaksiyonlarıdır. Şekil 3.14'de görüldüğü üzere actin geninin soğuk stres altında mRNA seviyesinin zamana bağlı bir değişiminin olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.14. Actin kontrol geni PZR sonuçlarının jelden görüntüsü. Actin geninin **1, 2, 3 nolu** örneklerde mRNA seviyesinin değişmediğinin gösterilmesi. **M:** λDNA EcoRI/Hind III marker (%0.8'lik agaroz jel'e 2µl yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür)

Diğer iki primer seti GSTz ve Katalaz genleri için ve üç farklı cDNA kalıbı kullanılarak kurulan PZR reaksiyonlarıdır. Şekil 3.15’de görüldüğü gibi GST ve Katalaz genlerinin üç farklı istasyonda mRNA seviyesinin değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonucun biyolojik olarak ne anlama geldiği bilinmemektedir.



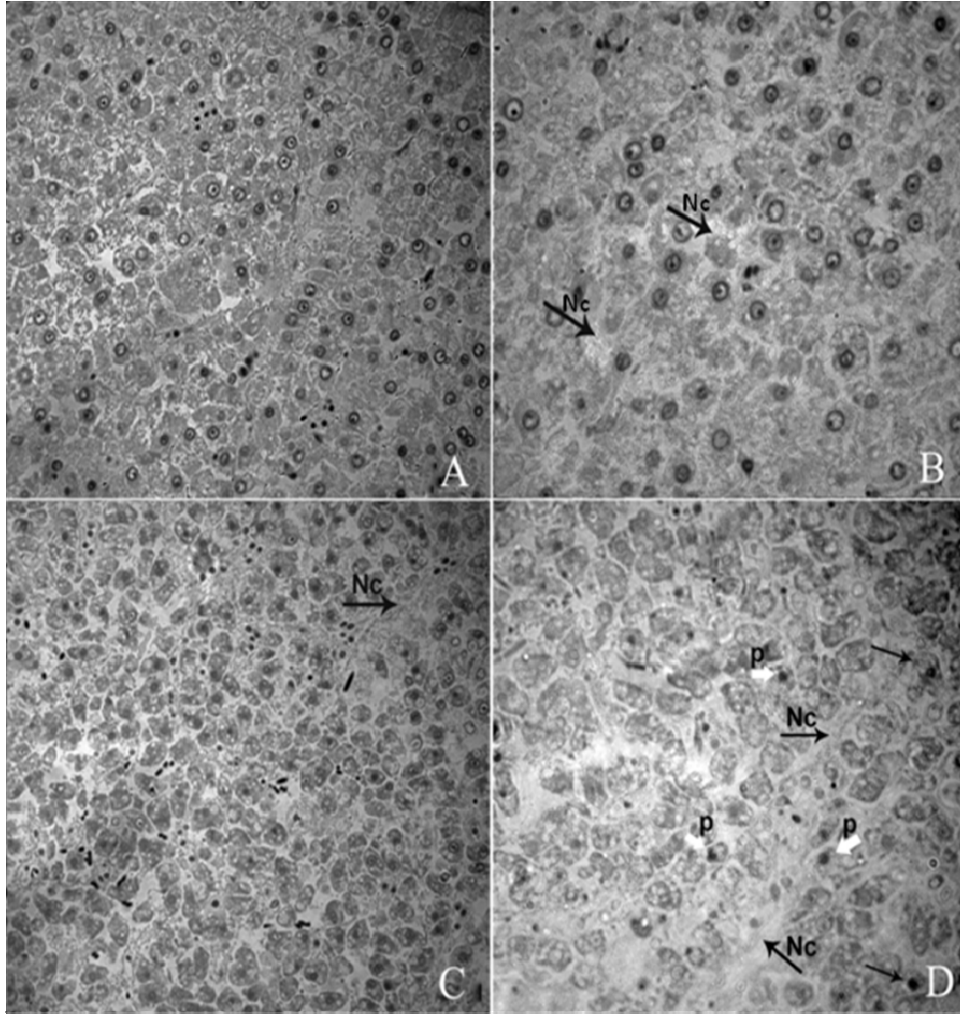
Şekil 3.15. GSTz ve Katalaz genlerinin üç bağımsız cDNA kalıbı kullanılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel analizi. **A)** GSTz geninin **1: kontrol, 2: temiz alan ve 3: Kirli alanda** toplanan örneklerde mRNA seviyesinin değişikliklerinin belirlenmesi. **B)** Katalaz geninin **1: kontrol, 2: temiz alan ve 3: Kirli alanda** toplanan örneklerde mRNA seviyesinin değişikliklerinin belirlenmesi. **M:** λDNA EcoRI/Hind III Marker (%0.8’lik agaroz jel’e 2µl yüklenmiş ve 90 V’de 50dk. yürütülmüştür).

3.7. Histopatolojik Bulgular

3.7.1 Işık Mikroskopik Bulgular

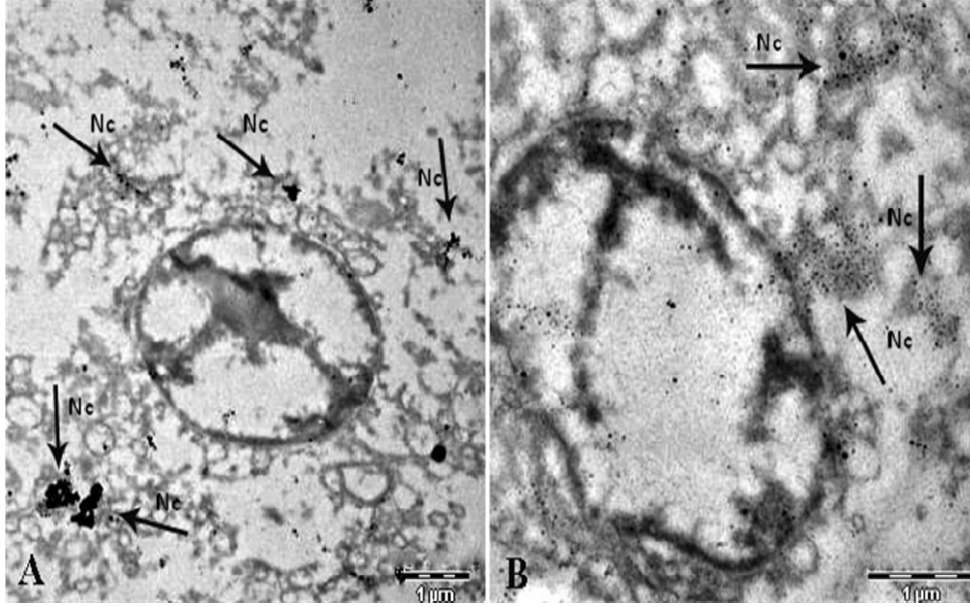
Birinci lokaliteden toplanan *Orthrias angorae*’nın karaciğer dokusunun iyi organize olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16A). Çekirdek yuvarlak şekilli ve sınırları belirgin olarak görülebilmektedir. Heterokromatin değişken miktarda çekirdeğin içinde dağılmıştır. Hepatositlerde orta ölçekli sitoplazmik vakuollerin küçük miktarda bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16B).

İkinci lokalitede ise birinci lokaliteye göre bazı patolojik farklılıklar göstermiştir. Hepatositler şişmiş ve bazılarının sınırları kaybolmuştur. Hücreler arası boşluk hepaotsitlerden dolayı artmıştır (Şekil 3.16C). Hücre zarı yapısındaki bozulma nedeniyle, hücreler arası bağlantı bölgeleri kaybolmuş, çekirdek zarının hasar görmesi ile birlikte hücre çekirdeği şekil değişikliğine uğramıştır. Birçok küçük ve piknotik çekirdek gözlemlendi. Hücrenin nekrozu ve sitolizi gözlenmiştir (Şekil 3.16D).

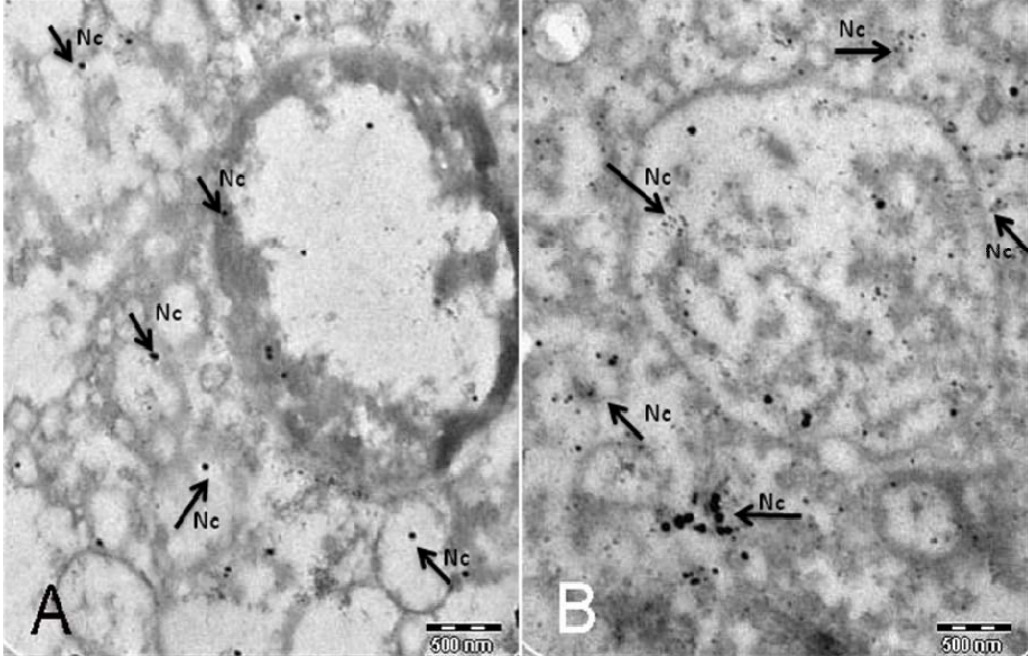


Şekil 3.16. Kars çayı üzerinde bulunan iki lokaliteden toplanan türlerin karaciğer dokusu. **A ve B)** Birinci lokaliteden toplanan karaciğer dokusu. **C ve D)** İkinci lokaliteden toplanan karaciğer dokusu.

3.8. GST ve Katalaz Enzimlerinin İmmunohistokimyasal Olarak İşaretlenmesi Sonucunda Elde Edilen Bulgular



Şekil.3.17. GST enziminin immünohistokimyasal lokalizasyonunun 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiş elektron mikroskobu görüntüsü. **A)** Birinci lokaliteden elde edilen karaciğer dokusunda GST enzim lokalizasyonunun görüntüsü. **B)** İkinci lokaliteden elde edilen karaciğer dokusunda GST enzim lokalizasyonunun görüntüsü.



Şekil.3.18. Katalaz enziminin immünohistokimyasal lokalizasyonunun 20 nm'lik altın partikülleri ile işaretlenmiş elektron mikroskobu görüntüsü. **A)** Birinci lokaliteden elde edilen karaciğer dokusunda Katalaz enzim lokalizasyonunun görüntüsü. **B)** İkinci lokaliteden elde edilen karaciğer dokusunda Katalaz enzim lokalizasyonunun görüntüsü.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Balıklar tüm omurgalı türlerin yarısını oluşturur; grup yaklaşık 15 700 deniz ve 13 700 tatlı su türü içerir (www.fishbase.org). Çalışma organizmamız olan Balitoridae ailesi içerisinde yer alan Orthrias'lar tatlı sularda yaşayan canlılardır. Orthrias gibi bazı canlıların taksonomik yerlerinin kesin olarak belirlenebilmesi için türler arasındaki morfolojik ve anatomik farklılık her zaman yeterli değildir. Farklı habitatlarda bulunan organizmalar birbirlerinden farklı değişimler gösterebilir ve aynı türe ait bireyler bile farklı morfolojik ve anatomik özelliklere sahip olabilir. Bu morfolojik değişiklikler genetik çeşitliliğin ancak bir kısmını oluşturur ve genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı morfolojide görülmez. Morfolojik karakterler sadece birkaç gen tarafından kontrol edilir. Bu durumlar göz önüne alınca balıklarda moleküler tekniklerin kullanılması ile belirgin ya da güvenilir morfolojik farklılıkları olmayan türler ayırt edilebilir ve teşhisi zor olan tür ve gruplar için gerekli işaretleyiciler tanımlanabilir.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile Orthrias türlerinden COI ve 18S rRNA'sının dizi bilgisi elde edilerek, biyoinformatik karakterizasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu ve ardından PCR işlemleri ile elde edilen sonuçlara göre beklenen büyüklükler olan 1550 bp ve 1800 bp'lik COI ve 18S rRNA genleri olduğu düşünülen genler jelde görülmüştür. PCR sonucunun gerçekten COI ve 18S rRNA genine ait olup olmadığını belirlemek için dizi analizi yapılmıştır. Yapılan sekanslama sonucunda elde edilen genlerin COI ve 18S rRNA genleri olduğu belirlenmiştir. Ancak gen bankasında Orthrias türleri COI ve 18S rRNA genlerine ait dizi bilgileri mevcut olmadığından, karşılaştırılamamıştır. Gen bankası analizinde, Orthrias türlerinin içinde bulunduğu aile olan Balitoridae ailesi üyelerine benzerlik göstermiştir. Bazı türlere ait COI ve 18S rRNA genleri dizi bilgileri ile elde edilen dizi analizi sonucu karşılaştırılınca, COI ve 18S rRNA genlerinin türler arasında ne kadar iyi korunduğu görülmüştür.

Eukaryotlarda dizileme çalışmaları, işlevsel olarak benzer fakat biraz daha büyük 18S molekülü üzerinde odaklanmıştır (Friedrich ve Tautz, 1995, Madigan ve ark., 1997, Budak, 2007). Ribozam RNA genleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar türün evrimsel süreci hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Bu

çalışmada 18S rRNA geni kullanılarak elde edilen filogenetik ağaçta (Şekil 3.4) Orhtrias türlerinin içinde buldukları Kordalılar şubesine ait bireyler ile aynı ağaçta kök almıştır. Bu sonuçla dizilerin tabiatında olan evrimsel bilgi uygun filogenetik ağaç ile belirlenmiştir.

Moleküler sistematik, çekirdek, mitokondri ve kloroplast gibi organellerden elde edilen genetik materyal ile çalışmaktadır. Ökaryotlarda mitokondriyal genlerin türler arasında farklılıkları ortaya koymak için nükleer genomdan daha uygun olduğu belirlenmiştir. Türlerin tanımlanması genellikle mitokondriyal DNA (mtDNA) bölgesi karşılaştırarak yapılmaktadır (Nomiya et al. 1985; Zullo et al.1991; Smith et al.1992; Lopez et al.1994; Arctander, 1995; Collura and Stewart 1995; Blanchard and Schmidt 1996; Moreiro and Seuanez 1999). Nükleer genomda dizilerin çoğunun işlevsiz ve pseudogenes olduğuna inanılmaktadır. İşlevsiz genlerin çok olması evrimsel süreçte daha fazla değişikliğe uğrayacağını ve atasal kuşaktan uzaklaşacağını düşündürmektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) üzerinde daha az işlevsiz gen içermektedir. Bu nedenle mtDNA dayalı moleküler filogenetik çalışmalar, genetik ve evrimsel süreçlerin çıkarım için çok yararlı olmuştur (Zhang and Hewitt 1996; Bensasson et al. 2000; Mirol et al.2000).

Tek bir hedef gen ile DNA sekans analizi yapılarak teşhis yapılması DNA barkodlama (DNA barcoding) olarak adlandırılır. 2003 yılında, Kanadalı araştırmacı Paul D.N. Hebert tarafından DNA barkodlama sistemi önerilmiştir. Bu sistem, mitokondri DNA'sında her tür için "türe özgü" olan belirli bölgeleri tespit ederek tanımlar. Hayvanlar aleminde en azından farklı şubelerden bazı yakın türler için COI analizi ayrımı yaparak DNA barkodlamaya destek vermiştir (Hebert ve ark., 2003). DNA barkodlama sistemi, bir çeşit "türler kütüphanesi" kurulmasının ilk adımı olmuştur. Bu konu üzerinde çalışmalar artarak sürmektedir (Hebert, 2003).

DNA barkodlamasının zorlukları da vardır. DNA'ya dayalı tür teşhisi tür içi ve türler arası genetik varyasyonlara dayanmaktadır. Bu varyasyonların sınırları bilinmemekle birlikte gruplar arasında da değişiklik göstermektedir. Bu yüzden yeni ayrılmış türlerin veya hibridizasyon ile oluşmuş türlerin çözümlenmesi zor olabilir. Evrensel bir DNA barkod geni bulunmamaktadır. Çok

yakın türleri ayırt etmek için başlıca sınırlayıcı faktör, biriktirdikleri yeni mutasyon oranlarının hemen hemen aynı olmasıdır. Tür ayrımı için yeterince değişken ve her domain için korunmuş tek bir gen yoktur. DNA barkod için ideal hedef gen geniş ölçüde korunmuş primerlerle çoğaltılabilmelidir. Diğer yandan bu gen çok yakın türleri ayıracak ölçüde farklılaşmış olmalıdır. Taksonlar arası paylaşılması ve PZR’da zorluk çıkaracak intronların olmaması açısından mitokondriyal genler hayvanlar için ilgi çekicidir. Folmer ve ark. (1994) bazı metazoalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada COI geninin 710 bp parçasının evrensel olduğunu belirlemişlerdir. COI’ın hayvanlar alemi içerisinde en korunmuş protein kodlayan genleri içerdiğini belirtmiştir. Farklı balıklarda için geniş ölçüde kullanılan COI primerleri sayesinde bu gen tür teşhisi için ümit verdiği belirtilmiştir (Folmer ve ark., 1994, Budak, 2007).

Ward ve ark. (2005) bir çalışmada ticari açıdan önemli Avustralya deniz balıklarının 200 türü için barkod belirlemişler. Ward ve ark. (2005) bu çalışmalarında 200 türe ait DNA barkod belirlemek için ikili kombinasyonlarda dört primer kullanmışlar. Bunların ikisi ileri, ikisi de geri primer olarak kullanılmıştır.

Başka bir çalışmada Ivanova ve ark.(2007) balıklarda DNA barkodu belirlemek için farklı primerler kullanmışlardır. Bu çalışmada çeşitli balık taksonlarını ve omurgalı gruplarının belirlenmesinde, belirteçlerin kullanılmasının önemli etkisi olduğunu görmüşlerdir.

Dawnay ve ark. (2007) COI geninin DNA barkodu olarak kullanılabileceğini belirlemek için yaptıkları çalışmada, COI genine ait 509 bp’lik kısmın DNA barkodu olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir. Ayrıca COI geninin bu kısmının türler arasında büyük benzerlik gösterdiğinin belilemişlerdir. Bu çalışma COI geninin hayvan türlerinin belirlenmesini yeterli bir referans dizi olduğu belirlenmiştir. Türlerin teşhisi için COI uygun olduğu deneylerle teyit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen COI geninin 650 bp’lik kısmının Orthrias türleri için DNA barkodlama sisteminde kullanılabileceği belirlenmiştir. Çünkü elde edilen COI diziler karşılaştırıldığında Orthrias türleri için spesifik bir dizinin

olduğu belirlenmiş(Ek 1) ve bu dizinin *Orthrias* türleri için DNA barkodu olabileceği düşünülmüştür.

Elde edilen tüm sonuçlar morfolojik sistematik çalışmalarının genetik temelli çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu çalışmada uygulanan yöntemlerin diğer *Balitoridae* ailesi üyelerinde, akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve elde edilen profiller sayesinde türlerinin teşhisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Belli bir sistem içinde yerleşmiş toplumlar, üretim teknolojisi sonucu ekolojik dengeyi tahrip etmekte, kısa dönemde geçimlerini sağlama endişesi içinde, uzun dönemin birçok imkânlarını yok etmektedir. Kirliliğin en yoğun olduğu sucul kaynaklar, gelecekteki gıda deposu olma özelliğini hızla yitirmektedir. Bu kirlilik, besin zinciri boyunca giderek artmakta ve sonuçta tüm canlı sistemler bu kirlenmeden payına düşeni almaktadır. İster sucul kaynaklı olsun, isterse karasal kaynaklı olsun, kirlenmelerin araştırılmasında tek amaç vardır; o da kirliliğin canlılar veya canlı kaynaklar üzerinde doğrudan ya da dolaylı etkilerinin incelenmesi ve elde edilen sonuçlara göre gerekli önlemleri almaktır. Organizma değişen koşullara karşı hücresel homeostazisi korumak durumundadır. Serbest radikaller ve lipit peroksidasyonuna karşı bu yolla antioksidan bir savunma sistemi oluşturularak hücresel denge korunmaya çalışılmaktadır (Tülüce, 2005). Bu anlamda antioksidanlar sistem canlılar için oldukça önem arz etmektedir.

Bu çalışmada da *Orthrias angorae*'da GST ve Katalaz varlığı araştırılmıştır. GST ve Katalaz enzimleri yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır (Board ve ark., 1997). Ama canlı grupları arasında farklı dağılım göstermektedir. Bu enzim ailesinin bu kadar geniş dağılım göstermesi *Orthrias angorae*'da da bu enzimin bulunabileceğini düşündürmüştür. Fakat bu konu ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Rekombinant olarak üretilen OaGSTz ve OaCat'ın ekspresyon seviyelerinin çevresel koşullar tarafından değiştirilebilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla *Orthrias*'da doğal stres altında Katalaz ve GST'nin mRNA seviyelerine PZR temelli metod ile bakılmıştır. Gül ve ark., (2009)'da Kars çayından elde ettikleri *Orthrias angorae*'da mikronuklei frekansı(MN), kontrol grubuna göre sedimente maruz

kalan tüm gruplarda daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışma Kars çayından elde edilen sedimentin mutajenik yükü ve balıklarda genotoksik hasar ile sediment içerisindeki genotoksik ajanların varlığını belirlemiştir. Bu bilgilerden yola çıkılarak *Orthrias angorae*'da doğal stresin etkili olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre; OaGSTz ve OaCat'ın mRNA seviyesinin arttığı bulunmuştur. Bu OaGSTz ve OaCat'ın doğal stresten etkilendiğini göstermiştir. Çünkü artan serbest radikal miktarına karşı OaGSTz ve OaCat'ın aktivite göstermiş olabileceği ve bu nedenle mRNA seviyesinin artmış olabileceği düşünülmektedir.

4.1. Sonuç

Orthrias türlerinin 18S ve COI genleri üretilmiş ve filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Ayrıca COI geninin Orthrias türleri için DNA barkodlama sisteminde kullanılabileceği belirlenmiştir.

OaGSTz ve OaCat doğal kirletici stresleri altında mRNA seviyesinde kirleticilik düzeyine göre artış olduğu belirlenmiştir. Karaciğer dokusundaki mRNA ekspresyonu sonuçlarını desteklemek amacıyla da immunohistokimyasal analiz yapılmıştır. Histopatolojik çalışmalar ışık ve elektron mikroskopik seviyede gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlar bize OaGST ve OaCat enzimlerinin ekspresyonlarının arttığı, RT-PCR ve immunohistokimyasal lokalizasyon ile gösterilmiştir.

Yapılan literatür taramasında Balitoridae ailesi üyelerinden Orthrias ile ilgili bu çalışma dışında gen bankasına veri aktarılan moleküler biyolojik çalışmaya rastlanmamıştır.

4.2. Öneriler

Çalışmamızda elde edilen verilerde, COI geninin DNA barkodu olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. ve Lipman, D. J. (1990), "Basic Local Alignment Search Tool," *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410
- Arctander, P., (1995). Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudogene. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 262:13–19.
- Ardağ, A., *Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın (2008).
- Aydoğan, G., *Rat Karaciğer Hücrelerinde Talyum Toksisitesinin Neden Olduğu Oksidatif Strese Karşı Metalloproteinlerin Etkilerinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak Araştırılması*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (2010).
- Baptiste, E., Baptiste, E., Brinkmann, H., Lee, J.A., Moore, D.V., Sensen, C.W., Gordon, P., Durufle, L., Gaasterland, T., Lopez, P., Muller, M., Philippe, H., (2002), The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. *Proc Natl Acad Sci* 5; **99(3)**:1414–9.
- Baş, O., *Dinitrocresol'ün (Rat Rattus Norvegicus) Sıçan Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa (2006)

Beckman Coulter CEQ™ 8000Series Genetic Analysis System Sequence Analysis Troubleshooting Guide lab. Manual

Bensasson, C., Zhang D.X., and Hewitt G.M., (2000). Frequent assimilation of mitochondrial DNA by Grasshopper nuclear genomes. *Mol. Biol. Evol.* 17(3):406–415.

Blanchard, J.L., and Schmidt G.W., (1996). Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution patterns. *Mol. Biol. Evol.* 13(3):537–548.

Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam G., ve Jermın L.S., (1997), “Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans,” *Biochem. J.*, **328**, 929-935.

Budak, M., *Türkiye calameuta (Cephidae:Hymenoptera) Türlerinin Morfolojik ve Moleküler Yönden incelenmesi*, Yüksek lisans tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas (2007)

Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C., (2004), ‘Rat Liver Glutathione S-Transferase Activity Stimulation Following Acute Cadmium Or Manganese İntoxication’ *Toxicology* **200**, 29–38.

Choe, C.P., U.W. Hwang, and W. Kim, (1999), Putative secondary structures of unusually long strepsipteran SSU rRNAs and its phylogenetic implications. *Mol. Cells* **9(2)**:191–199.

Collura, R., and Stewart, V.C., (1995). Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of old world monkeys and hominoids. *Nature* 378:485–489.

Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C., (2005), ‘Oxidative Stress Profiling: Part II. Theory, Technolog, and Practice.’ *Ann N Y Acad Sci.* 1055: 136-58.

Daggett, D. A., Oberley, D. T., Nelson, S. A., Wright S. L., Kornguth, S. E., Siegel, F. L. (1998), ‘Effects Of Lead On Rat Kidney And Liver: Gst Expression And Oxidative Stress.’ *Toxicology* , **128**, 191–206.

Dawnay, N., Ogden, R., McEving, R., Carvalho, G.R., Thorpe, R.S., (2007) Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173:1–6

Dupuis, S., (1984). Alberta Climatological Association. Pub. ID. 102-733-636

Emden, H.K., (2004) *An Introduction to Molecular Phylogeny*, Universitat zu Koln,80.

Eren, S. H., *Sıçanlarda Melatonin Desteęinin Akut (Hafif ve Ağır) Egzersizle eřitli Dokularda Oluşan Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Durum zerine Etkileri* , Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Selçuk Üniversitesi, Konya (2008).

Folmer, O, Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., (1994), DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294–299.

Frati F, Simon C, Sullivan J, Swofford DL., (1997), Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *J. Mol. Evol.* **44**:145–58

Friedrich M, Tautz D. (1995) Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* **376(6536)**:165–67.

Gaertig, J., Gu, L., Hal, B. ve Gorovsky, M. A. (1994), “High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in Tetrahymena,” *Nucl Acid Res*, **22**, 5391-5398.

Geldiay, R., Balık, S., (1988), “Türkiye Tatlısu Balıkları” Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:46 Ders Kitabı Dizini:16.

Habig, W. B., Pabst, M. J., ve Jakoby, W.B., (1974) ‘Glutathione S-transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation.’ *J. Biol Chem.* **249**, 7130-7139.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., Waard, J.R., (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **270**: 313–322.

Hennig, W., (1950). *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, 263 pages.

Huelsenbeck, J.P., (1995), Performance of phylogenetic methods in simulation. *Syst. Biol.* **44**: 17–48

Hwang U.W., KimW, Tautz D, Friedrich M. (1998), Molecular phylogenetics at the Felsenstein zone: approaching the Strepsiptera problem using 5. 8S and 28S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**:470–80

Hwang, U.W., H.I. Ree, ve W. Kim, (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear rDNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. Parasitol.* **37(4)**: 215–228.

Ivanova N.V., Zemplak, T.S., Hanner R.H., and Hebert P.D.N., (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.

Kahkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M., ‘Antioxidant activity of plant extracts containing

phenolic compounds'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 3954-3962 (1999).

Kara, A., *Yeni Doğan Ratlarda Amikasine Bağlı Deneysel Böbrek Hasarı ve Antioksidanların Rolü*, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Isparta (2009).

Lopez, J.V., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W., and O'Brien, S.J.,(1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J. Mol. Biol.* 39:174–190.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms. Eighth Edition*. International Edition. Prentice Hall, International Inc.

Marone, M., Mozzetti, S., Ritis, D., Pierelli, L., Scambia, G. (2001), “Semi-quantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample,” *Biol. Proced. Online.*, **3**(1), 19-25

Meadus1, W.J. (2003) “A semi-quantitative RT-PCR method to measure the *in vivo* effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression,” *Biol. Proced. Online* **5**(1), 20-28.

Mirol, P.M., Mascheretti, S., and Searle, J.B., (2000). Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial cytochrome b in *Ctenomys* (Caviomorphs,

Rodentia) with either great similarity to or high divergence from the true mitochondrial sequence. *Heredity* 84:538–547.

Moreiro, M.A.M., and Seuanez, H.N., (1999). Mitochondrial pseudogenes and phyletic relationships of *Cebuella* and *callithrix* (Platyrrhini, Primates). *Primates* 40(2):353–364.

Navajas M, Guterrez J, Lagnel J (1996) Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bull Entomol Res* **86**: 407–417.

Nomiyama, H., Fukuda, M., Wakasugi, S., Tsuzuki, T., and Shimada, K., (1985). Molecular structures of mitochondrial- DNA-like sequences in human nuclear DNA. *Nucleic Acids Res.* 13:1649–1658.

Nordberg J, Arner ES., ‘Reactive Oxygen Species Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System’. *Free Radic Biol Med*; **31**: 1287-1312 (2001).

Öziç, C., *Tetrahymena thermophila* Glutasyon-s-transferaz zeta geninin klonlanması, biyoinformatik ve deneysel karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (2008).

Özkan, O., Gül, S., Keleş, O., Aksu, P., Kaya, T. Ö., Nur., G., (2009). The Investigation of the Mutagenic Activity of Kars River Sediments on *Orthrias angorae*. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* **15 (1)**: 35-40.

Özkaya, A., *Oksidatif Strese Maruz Kalan Ratların Bazı Biyokimyasal Parametrelerine Hesperetin ve Ellagik Asidin Etkisi*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ (2007).

Posada, D., Crandall, K.A. (1998), Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817–818

Roth, J. R., ve Hughes, K.T. (1985), “Directed formation of deletions and duplications using Mud(Ap, lac) ,” *Genetics.*, **109**, 263-282

Sambrook, J., Fritsch, E.F.ve Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Smith, M.F., Thomas, W.K., and Patton, J.L., (1992). Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an Akodontine rodent. *Mol. Biol. Evol.* **9(2)**:204–215.

Tekcan, M., ‘Oksidatif Stres-Antioksidan Sistemler ve Testis’, Derleme, Infertilite, Androloji Bülteni, **37**: 131-136 (2009).

Tülüce, Y., *Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Subakut ve Subkronik Uygulamalarının Ratların Eritrosit ve Çeşitli Dokularındaki Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Glutasyon Ve Lipid Peroksidasyon Seviyeleri Üzerine*

Etkileri, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van (2005).

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **360**, 1847–1857.

Yıldız, H., *Selüloz Asetat Kürecikler Yüzeyinde Katalaz İmmobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı (1999).

Yıldızdaş, H. Y., *Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulan ve Growth Hormon Uygulanan Yenidoğan Ratlarda Beyin Dokusunda Piruvat Kinaz Aktivitesi, Antioksidan Sistem ve Lipit Peroksidasyonu*, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Neonatoloji Bilim Dalı, Adana (2003).

Zhang, D.X., and Hewitt, G.M., (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* **11**:247–251.

Zullo, S., S ieu, L.C., Slightom, J.L., Hadler, H.I., and Eisenstadt, J.M., (1991). Mitochondrial D-loop sequences are integrated in the rat nuclear genome. *J. Mol. Biol.* **221**: 1223–1235.

Ek-1 COIgeninin olası DNA barkod dizisi

CCTTTATCTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGAATAGTCGGTACCGCTCTTAGCCTTCTAATTCGAGCTGAA
CTGAGCCAACCAGGATCCCTCCTGGGTGACGACCAAATTTACAACGTTATGTGTACCGCACACGCTTTTG
TTATAATTTTCTTTATAGTAATGCCATCCTCATTTGGAGGATTCGGAACTGACTCGTGCCGCTAATGAT
CGGGCCCCCGACATGGCATTCCACGGATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTACCACCCTCATTTCTT
TTATTATTAGCTTCATCCGGTGTAGAAGCCGGAGCCGGAACAGGATGAACAGTTTATCCGCCTTTAGCAG
GAAATCTAGCCCACGCAGGTGCATCCGTAGATTTAACTATTTTCTCGCTGCATCTAGCAGGTGTTTCATC
TATCTAGGGCAATTAATTTTATTACAACAAC TATTAATATAAAACCCAGCCATCTCCAGTACCAA
ACCCCTTATTTGTATGAGCAGTTCTTGTAAGTCCGTTCTTTTACTTCTGTCTCTGCCAGTTCTGGCCG
CCGGAATTACTATGCTTTTAAACAGATCGGAATTTAAACACCACATTCCTTGATCCCGCCGGAGGTGGAGA
TCCTATCCTTTATCAACACCTGTT

Ek-2 COI geni için referans alınan türlerde COI gen dizilişi

>gi|194716650|gb|EU670789.1| Barbatula nuda cytochrome oxidase subunit I (coxI) gene, complete cds; mitochondrial

```
ATGGCAATCACACGCTGATTCTTCTCTACCAACCACAAAGACATTGGCACCCCTCTACTTAGTATTTGGTG
CCTGAGCGGGCATAAGTCGGAACCTGCCCTAAGCCTACTAATCCGGGCCGAACTTAGTCAGCCAGGATCCCT
CCTTGGCGACGACCAATCTACAACGTTATTGTTACCGCACATGCCTTTGTAATAATCTCTTTTATAGTG
ATACCCATCCTCATCGGAGGGTTCGGCAATTGACTTGTACCACATAATGATCGGTGCCCGGATATGGCAT
TCCCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTGCCACCCTCTTTCCTTTACTGCTGGCCTCCTCCGG
TGTGTAGGCTGGCGCCGAACAGGGTGAACAGTGTACCTCCCTTGCAGGCAACCTTGTCTACGCCGGG
GCATCCGTCGACCTAACTATTTTTTCTCTCCATCTGGCTGGGGCCTCGTCTATTCTTGGGGCTATTAAC
TTATTACAACCACAATTAACATAAAAACCCAGCCATCTCCAATATCAAACCCCTCTTCGTATGATC
CGTCCTAGTAACGCTGTCTCTACTCTGTCCCTGCCCGTATTAGCCGCTGGCATCACTATGCTCCTT
ACAGACCCTAATCTAAATACTACATCTTTGACCCCTCAGGCGAGGAGACCTATTCTTTATCAACATC
TGTCTGATCTCTCGGCCACCCAGAGGTATATATCCTAATCTTCCCGGTTTGGTATCATTTACATGAT
CGTAGCCTACTATGCAGGCAAAAAGAACCCTTTGGCTATATGGGAATGGTCTGGGCTATAATAGCCATC
GGCTTACTGGGGTTTATTGTCTGAGCCCAACACATGTTTACGGTTGGCATGGATGTAGACACCCGTCAT
ACTTCACATCCGCAACAATAATTATTGCCATCCCAACGGGCGTTAAAGTCTTTAGCTGACTGGCTACCCT
ACACGGAGGGTCAATTAATGAGAGACACCATTACTCTGGGCCCTTGGGTTTATTTTCTCTTACCCTG
GGGGTTTAAACAGGAATTGACTAGCCAACCTCGTCACTAGATATTGTGTTACACGACACATACTACGTAG
TCGCTCATTTCCACTACGTCCTATCTATAGGGGCGGATTCGCTATTATAGCAGCCTTCGTTCACTGATT
CCCCCTATTACAGGGTATACACTTCACAGTACATGAACAAAAATCCACTTTGCAGTAATTTTATTGGC
GTA AACCTCACATCTTCCCCCAACATTTCTTTGGCTTAGCAGGAATACCCGACGATATTCAGACTACC
CTGACGCCTACACCCTATGAAATACAGTATCATCAATCGGATCCCTAATCTCCCTAGTAGCCGTAATCAT
GTTCTCTTTATTCTGTGGGAAGCCTTCGCTGTAAACGAGAGGTCTCATCCGTAGAATTAACCACAACA
AATGTAGAGTGGCTACACGGATGCCCCCTCCCTACCATACATTTGAAGAACCAGCATTGTTCAGTAC
GATCTAGTTAA
```

CDS

```
MAITRWFSTNHKDIGTLYLVFGAWAGMVGTALESLLIRAELSQPGSLLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMV
MPILIGFGNWLVLMI GAPDMAFPRMNNMSFWLLPSPFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAG
ASVDLTI FSLHLGASSILGAINFITTTINMKPPAISQYQTPLFVWSVLVTAVLLLLSLPVLAAITMLL
TDRNLNTFFDPSGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGIISHVVAYYAGKEPFGYMGVMWAMMAI
GLLGFIVWAHMFVTVGMDVDTRAYFTSATMIIAIP TGVKVFSWLATLHGGSIKWETPLLWALGFI FLFTV
GGLTGIVLANSSLDIVLHDTYYVVAHFHYVLSMGAVFAIMAAFVHWFP LFTGYTLHSTWTKIHFAVMFIG
VNLTFPPQHFLGLAGMPRRYS DYPDAYTLWNTVSSIGSLISLVAVIMFLFILWEAFAAKREVSSVELTTT
NVEWLHGCPPPYHTFEPPAFVQVRSS
```


>gi|314909704|gb|HQ536289.1| Barbatula toni voucher 3F90 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

```
CACCCCTCTACCTAGTATTTGGTGCCTGAGCGGGCATGGTCGGAACCGCCCTAAGCCTATTAATCCGAGCC
GAACTTAGTCAGCCAGGGTCCCTCCTTGGCGACGATCAAATCTACAATGTTATTGTTACCGCACATGCCT
TTGTTATAATCTTCTTTATAGTGATACCCATCCTTATTGGGGGATTTGGCAACTGACTTGTGCCGCTAAT
AATTGGGGCCCCCTGACATAGCATTCCCCCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTGCCACCCTCCTTT
CTTTTACTACTAGCCTCATCCGGCGTTGAAGCTGGGGCCGGAACAGGGTGGACAGTATATCCCCCCTTG
CAGGTAATCTTGCCCATGCCGGGCATCCGTAGACCTAACTATTTTTCTTTTCTTTCACCTCGCTGGGGCCTC
ATCTATTCTTGGGGCCATCAATTTTATCACAACCACAATTAATATGAAACCCCCAGCCATCTCCCAATAC
CAAACCTCCCTCTTTGTGTGGTCCGTCTAGTAACTGCTGTTCTCCTGCTCTTATCCCTGCCTGTATTGG
CCGCCGGAATCACAATACTCCTTACAGACCGAAATCTAAATACAACATTCTTTGATCCATCGGGTGGAGG
AGACCCCATCCTTTATCAACACCTATTCTG
```

CDS

```
TLYLVFGAWAGMVGTALESLLIRAELSQPGSLLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPILIGGFGNLVLPLM
IGAPDMAFPRMNMNSFWLLPSPFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTIFSLHLAGAS
SILGAINFITTTINMKPPAISQYQTPLFVWSVLVAVLLLLSLPVLAAGITMLLTDRNLNTTFFDPSGGG
DPILYQHLE
```

>gi|307141189|gb|HQ219198.1| *Nemacheilus montana* voucher NBFGR:NM08
cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
CCTTTATCTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGAATAGTCGGTACCGCTCTTAGCCTTCTAATTCGAGCTGAA
CTGAGCCAACCAGGATCCCTCCTGGGTGACGACCAAATTTACAACGTTATTGTTACCGCACACGCTTTTG
TTATAATTTCTTTATAGTAATGCCATCCTCATTTGGAGGATTCGGAAACTGACTCGTGCCGCTAATGAT
CGGGCCCCCGACATGGCATTCCACGGATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTACCACCTCATTTCTT
TTATTATTAGCTTCATCCGGTGTAGAAGCCGGAGCCGGAACAGGATGAACAGTTTATCCGCCTTTAGCAG
GAAATCTAGCCCACGCAGGTGCATCCGTAGATTTAACTATTTTCTCGCTGCATCTAGCAGGTGTTTCATC
TATTCTAGGGGCAATTAATTTTATTACAACAATAAATAAAAACCCCGCCATCTCCAGTACCAA
ACCCCTTATTTGTATGAGCAGTTCTTGTAACTGCCGTTCTTTTACTTCTGTCTCTGCCAGTTCTGGCCG
CCGGAATTACTATGCTTTTAAACAGATCGGAATTTAAACACCACATTCTTTGATCCCGCCGGAGGTGGAGA
TCCTATCCTTTATCAACACCTGTT

CDS

LYLVFGAWAGMVGTA LSL LIRAELS QPGSLLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPILIGGFGNWLVPLMI
GAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI FSLHLAGVSS
ILGAINF I TTTINMKPPAI SQYQTPLFVWAVLVTAVLLLLSLPVLAAGITMLLTDRNLNTFFDPAGGGD
PILYQHLE

>gi|307141185|gb|HQ219196.1| Nemacheilus montana voucher NBFGR:NM03
cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
CCTTTATCTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGAATAGTCGGTACCCTCTTAGCCTTCTAATTCGAGCTGAA
CTGAGCCAACCAGGATCCCTCCTGGGTGACGACCAAATTTATAACGTTATTGTTACCGCACACGCTTTTG
TTATAATTTCTTTTATAGTAATGCCATCCTCATTTGGAGGATTCGGAAACTGACTCGTGCCGCTAATGAT
CGGGCCCCCGACATGGCATTCCACGGATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTACCACCTCATTTCTT
TTATTATTAGCTTCATCCGGTGTAGAAGCCGGAGCCGGAACAGGATGAACAGTTTATCCGCCTTTAGCAG
GAAATCTAGCCCACGCAGGTGCATCCGTAGATTTAACTATTTTCTCGCTGCATCTAGCAGGTGTTTCATC
TATTCTAGGGCAATTAATTTTATTACAACAATAAATAAAAACCCAGCCATCTCCAGTACCAA
ACCCCTTATTCTGATGAGCAGTTCTTGTAACTGCCGTTCTTTTACTTCTGTCTCTGCCAGTTCTGGCCG
CCGGAATTACTATGCTTTTAAACAGATCGGAATTTAAACACCACATTCTTTGATCCCGCCGGAGGTGGAGA
TCCTATCCTTTATCAACACCTGTTC

CDS

LYLVFGAWAGMVTALSLLRARELSQPGSLLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPILIGGFNWLVP
LMI
GAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI
FSLHLAGVSS
ILGAINFITTTINMKPPAISQYQTPLFVWAVLVTAVLLLLSLPVLAAGITMLLTDRNLNTT
FFDPAGGGD
PILYQHLE

>gi|321119159|gb|HQ960936.1| Barbatula barbatula voucher IFCZE0815
cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
CCTCTACCTAGTATTTGGTGCCTGAGCGGGCATAAGTTCGGAAGTGCCTAAGCCTATTAATCCGAGCCGAA
CTTAGTCAGCCAGGCTCCCTCCTTGGCGACGACCAAATCTACAACGTTATTGTACCCGCACATGCCTTTG
TCATAATCTTCTTTATAGTAATGCCATCCTCATCGGAGGTTTTGGTAACTGACTTGTACCACCTAATGAT
TGGGGCCCCAGACATGGCGTTCCCCGGATAAATAACATGAGCTTCTGACTCCTGCCACCCTCTTTTCTC
TTACTACTGGCCTCATCCGGTGTGAGGCAGGAGCGGGAACGGGGTGGACAGTATATCCTCCCCTTGCAG
GCAACCTTGCCACGCTGGAGCATCCGTTGACTTAACTATTTTTTCTCTACACCTAGCCGGGGCTTCATC
TATTCTTGGAGCCATTAATTTTATTACGACTACAATTAATATGAAACCCCGCCATCTCCAGTACCAA
ACCCCCCTTTTGTGTGATCTGTCTAGTAACTGCTGTCTCCTGCTTCTATCCTGCCCGTATTAGCCG
CTGGGATCACAATGCTCCTCACAGACCGGAACCTAAACACTACGTTCTTCGACCCTCGGGGGAGGAGA
TCCCATCCTTTATCAACACCTA

CDS

LYLVFGAWAGMVGTALESLIRAELESQPGSLLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPILIGGFNWLVP
LMI
GAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI
FSLHLGASS
ILGAINFITTTINMKPPAISQYQTPLFVWSVLVTAVLLLLSLPVLAAGITMLLTDRNLNTTFFD
PSGGGD
PILYQHL

Ek-3 Referans alınan türler ile *Orthrias angorae* COI hizalama sonuçları

```

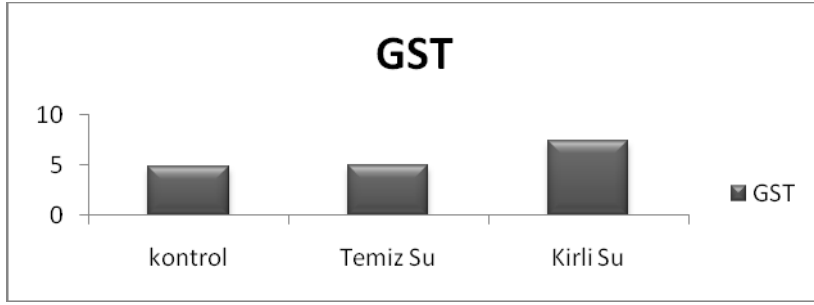
B.toni          -----I GAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEA
B.nudus        HAFVMIFFMVMPILIGGFGNWLVPLMIGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEA
B.barbatula    HAFVMIFFMVMPILIGGFGNWLVPLMIGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEA
O.angoare     HAFVMIFFMVMPILIGGFGNWLVPLMIGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEA
N.montana     HAFVMIFFMVMPILIGGFGNWLVPLMIGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEA
N.montana1    HAFVMIFFMVMPILIGGFGNWLVPLMIGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSFLLLLASSGVEA
                *****

B.toni          GAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI FSLHLAGASSILGAINFITTTINMKPPAISQYQ
B.nudus        GAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI FSLHLAGASSILGAINFITTTINMKPPAISQYQ
B.barbatula    GAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI FSLHLAGASSILGAINFITTTINMKPPAISQYQ
O.angoare     GAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI FSLHLAGASSILGAINFITTTINMKPPAISQYQ
N.montana     GAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI FSLHLAGVSSILGAINFITTTINMKPPAISQYQ
N.montana1    GAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLTI FSLHLAGVSSILGAINFITTTINMKPPAISQYQ
                *****

B.toni          TPLFVWSVLVTAVLLLLSLPVLAAAGITMLLTDRLNLTFFDP SGGGDPILYQH L F-----
B.nudus        TPLFVWSVLVTAVLLLLSLPVLAAAGITMLLTDRLNLTFFDP SGGGDPILYQH L F W F F G H
B.barbatula    TPLFVWSVLVTAVLLLLSLPVLAAAGITMLLTDRLNLTFFDP SGGGDPILYQH L F-----
O.angoare     TPLFVWSVLVTAVLLLLSLPVLAAAGITMLLTDRLNLTFFDP SGGGDPILYQH L F-----
N.montana     TPLFVWAVLVTAVLLLLSLPVLAAAGITMLLTDRLNLTFFDP A G G G D P I L Y Q H L F-----
N.montana1    TPLFVWAVLVTAVLLLLSLPVLAAAGITMLLTDRLNLTFFDP A G G G D P I L Y Q H L F-----
                *****

```

Ek-4 Karaciğer dokusundaki total GST aktivitesi



Ek-5 Karaciğer dokusundaki total Katalaz aktivitesi

