

ELEKTROFOREZİN TAKSONOMİ'DE UYGULANMASI
APPLICATION OF ELECTROPHORESIS IN TAXONOMY

Prof. Dr. Neclâ ÖZETİ

GİRİŞ

Elektroforezin çok yönlü uygulama alanı vardır. İyonlaşabilen ve elektrik akımı ile yüklü olan yahut yüklenebilen her karışım elektroforeze tabi olabilir. Son zamanlarda özellikle biyokimyacılar için çok elzem bir yöntem olmuştur.

Biyolojik materyelin fraksiyonlanmasında fevkalade kullanışlıdır. Klinik teşhislerde çok işe yarar hale gelmiştir. Serum, idrar, omurilik sıvısı, mide suyu ve diğer vücut sıvılarının analizinde çok kullanılır olmuştur. Kliniklerde serum analizi daha ziyade kağıt ile yapılmaktadır. Fakat bazı özel hallerde örneğin anormal hemoglobin teşhisinde (irsi anemi teşhisinde) filtre kâğıdı ile yapılan elektroforez yeterli değildir. Daha gelişmiş olan yöntemler örneğin jel'ler veya selüloz asetat filmi kullanılır.

Çok daha ince olan elektroforetik teknik immunoelektroforez'dir. İmmunolojideki başlıca araştırmalar bu yolla yapılmaktadır. Protein ayırımı için fevkalade bir yöntemdir. Çok az miktardaki biyolojik materyeli ayırabilir ve aynı zamanda filojenetik ilişkilerin demonstrasyonunda çok yararlıdır.

Akrabalık İlişkilerinin Serolojik Yönden Araştırılması

Hayvanlar arasındaki akrabalık ilişkilerini ortaya koymak için uzun yıllardan beri serolojik çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli hayvan gruplarında serum proteinlerinin elektroforetik separasyonu, taksonomik gayeler için çok kullanışlı bir yol olmuştur. Bu çeşit araştırmalar, zor ayrılan tür ve alt-türlerinin ayrılmasında yararlıdır. Diğer gruplardan ziyade Amfibilerde alt-tür özelliklerinin ortaya çıkarılmasında işe yaradığı anlaşılmıştır. Bu yoldaki çalışmalardan varılan sonuçlar kısaca şöyle özetlenebilir:

"Yüksek hayvanların filojenetik kompleksitesi, serum protein fraksiyon bandlarının *konsantrasyonu*, bandların *teşekkül hızları*, ve bandların *sayıları* ile ilişkilidir". Bundan başka kesin bir dayanak olmamakla beraber, şimdiye kadarki çalışmalar göstermiştir ki, en azından büyük hayvan grupları için, *serum proteinlerinin total konsantrasyonu*, filojenetik sırada yükseldikçe artar.

Örneğin : Amfibilerde % 2,16 - 3,42 PROSSER (1950)'e göre
 " % 2,1 - 3,6 CHEN (1967)'e göre
 İnsan'da % 7

Taksonomik amaçlar için Serum proteinlerinin analizi kullanışlı olduğuna göre, proteinlerin tabiatından ve kabaca elektroforetik separasyondaki görünümünden bahsedelim :

Proteinler amfolit karakterdedir, yani hem asidik hem bazik özelliktedir. Normal halde nötr olan proteinler belli bir pH'dan sonra OH^- , H^+ olarak — veya + yüklenirler yani kendilerinde negatif ve pozitif uçlar meydana gelir; ve ancak ondan sonra elektroforeze tabi olabilirler. Bu bakımdan elektroforezde kullanılan çözeltilerin pH'ı çok önemlidir.

Alkali tamponda, serum proteinleri pozitiftarafa doğru göç ederler. Kabaca bir ayırımda, örneğin kağıt elektroforezi ile yapılan separasyonda 4 veya 5 fraksiyona ayrılır. Albumin, küçük moleküllu olması nedeniyle en hızlı hareket eden bir proteindir, diğer fraksiyonlardan öndedir. Bunu müteakip α_1 -, α_2 -, β - ve γ - Globulin'ler gelir. Bu sıra bütün Omurgalılarda aynıdır. Fakat yukarıda zikredilen özellikler (protein fraksiyon bandlarının konsantrasyonu, bandların teşekkül hızları ve bandların sayıları) her türe has özellik arz etmektedir. Tür ve ırk seviyesindeki farklılıklar özellikle Globulin'ler bölgesinde göze çarpar. Onun için proteinleri az sayıda fraksiyonlara ayırabilen kağıt elektroforezi taksonomik amaçlarda pek yararlı olamaz. Daha ince ayırma ihtiyacı vardır. Bu nedenle, serum proteinlerini 15 hatta daha fazla fraksiyonlara ayırabilen jel elektroforezi kullanılmaya başlanmıştır.

Bir de şu hususu belirtmek yerinde olur. Plasma proteinlerinin teşkilinde *genetik ve fizyolojik faktörlerin* rol oynadığı bilinmektedir. Cinsiyet, yaş, açlık mevsim ve coğrafik bölge gibi faktörler protein fraksiyonlarının görünümünde farklılıklar yapar. Onun için bu gibi çalışmalarda, bu faktörlerin dikkate alınarak değerlendirilmelerin yapılması gereklidir.

Taksonomik amaçlar için serum proteinlerinin analizi yapıldığında (biraz önce zikredilen faktörler üzerinde önemle durularak) elde edilen ferogramların değerlendirilmesinde dikkate alınacak başlıca hususlar şunlardır:

- Protein fraksiyon bandlarının sayıları
- " " " teşekkül hızları
- " " " konsantrasyonu

BİR SEROLOJİK ÇALIŞMA ÖRNEĞİ

Triturus cristatus'un alt-tür durumunu aydınlatmak için, poliakrilamidjel -disk elektroforezi ile FACHBACH'ın 1974' de yapmış olduğu bir çalışmayı ince-lersek, Serolojik araştırmaların Taksonomi'deki karanlık kalmış sorunları çözmekte ne kadar yardımcı olduğunu açıkça görebiliriz.

Taksonomik sorun :

Avrupa ve Önasyada yaşayan *Triturus cristatus*'ların taksonomik durumu çeşitli araştırmacılar tarafından morfolojik ve biyometrik yünden ele alınmış ve çeşitli görüşler ortaya atılmıştır.

WOLTERSTORFF (1923), bu bölgedeki hayvanları bir tür (*Triturus cris-tatus*) olarak alır ve biyometrik yoldan inceleyerek 4 alt-türe ayırır. (*T. c. dobro-gicus*, *T. c. cristatus*, *T. c. carnifex* ve *T. c. karalinii*). Fakat alt-tür sınırlarını ancak bir özelliğe (ön ekstremite uzunluğu/vücut uzunluğu'na) göre yapar. Ayrıca karın desenini de kullanmak ister, fakat varyasyon olduğundan karışıklığa sebep olduğunu ifade eder.

BOLKAY (1928) ise kafataslarının farklılığına deyinerek bu hayvanların iki türe ayrılabilirliğini ve her birinin de iki alt-türü olabileceğini ileri sürer.

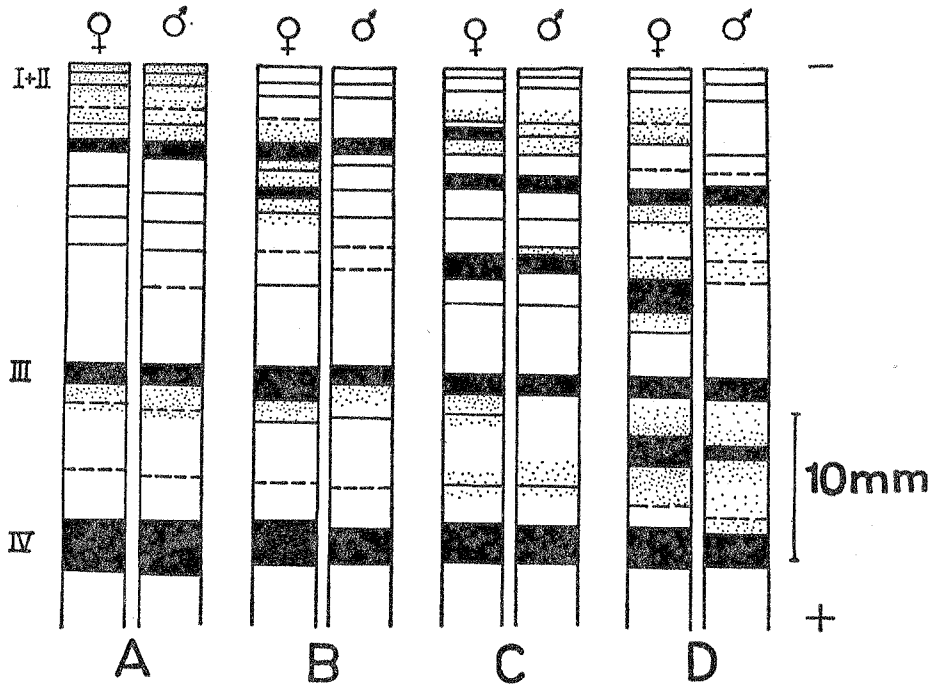
1. tür *Triturus carnifex carnifex*
" " *karelinii*
2. tür *Triturus cristatus cristatus*
" " *danubialis*

Daha sonra HERRE (1933) konuya daha derin eğilir. Kafataslarının ben-zerliğini belirterek bu hayvanların ancak bir tür olabileceklerini ve WOLTERSTORFF gibi 4 alt-türe ayrılacaklarını saptar (biyometrik ölçülerle). Fakat yine de alt -tür sınırlandırılması çok kesin değildir.

Bundan sonra daha uzun süre *cristatus*'ların taksonomik durumlarındaki karışıklık devam etmiş ve bu arada serolojik çalışmalar da yapılarak yeni bulgularla konuya yaklaşımlar olmuştur. Bu yönde yapılmış serolojik çalışmaları şöyle sıra-

İyibiliriz: Dessauer, Fox 1956; Frieden et al. 1957; Kiortis, Kiortis 1960; Gallien et al. 1966; Chen 1967; Coates, Twitty 1967; Flindt et al. 1968; Shontz 1968; Fachbach, Albert 1971; Tunner 1970, 1972; Obst, Ambrosius 1971.

Hemen şunu söyleyelim ki bu kadar çok araştırmacı çalışmış olmasına rağmen çalışmalarında *Triturus cristatus*'ların alt-türlerine hiç değinmemişler, sadece diğer *Triturus* türleri yanında ele almışlardır. Ve bunların çoğu da kâğıt elektroforezi ile çalıştıklarından 4-5 fraksiyondan başka bir şey edemedikleri için sonuçları da iyi değildi. Halbuki tür ve alt-tür seviyesindeki farklılıklar, önce de işaret edildiği gibi, daha ziyade globulin'ler bölgesinde belirgindir. Onun için alt-fraksiyonların sayısı, konsantrasyonları ve hızları önemlidir. İşte bütün bunları dikkate alan FACHBACH (1974), jel elektroforezi ile, Avrupa ve Önyasyada yaşayan *T. cristatus*'ların alt-tür durumunu ortaya çıkarmak için bu hayvanların serum proteinlerinin analizini yapmış ve 4 alt-türün her birine özgü ferogramlar elde etmiştir.



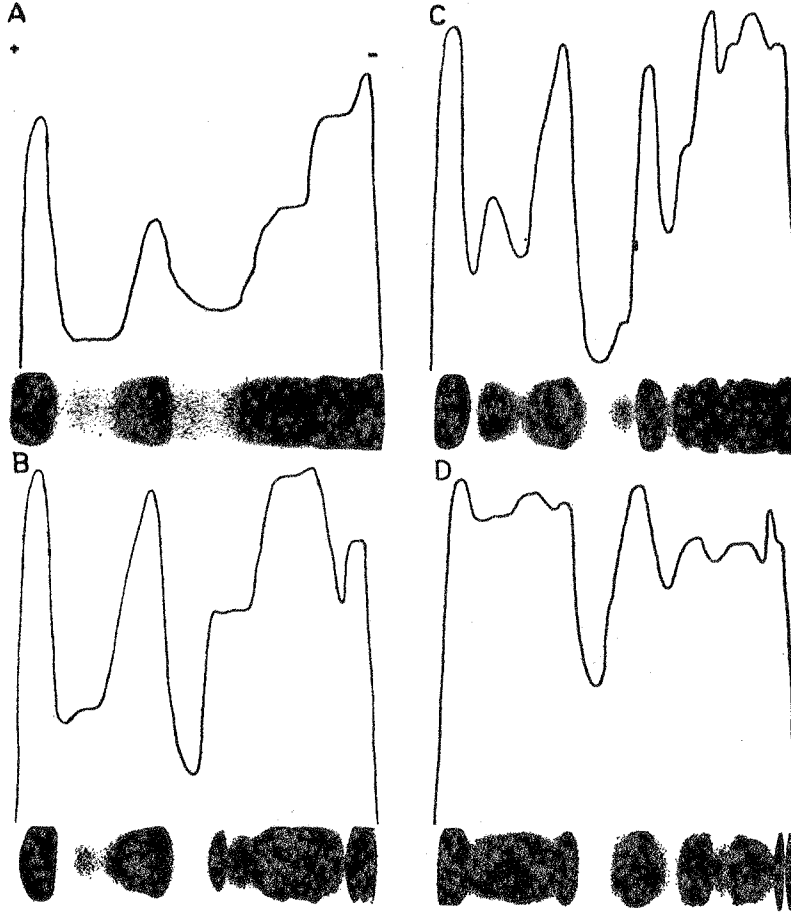
Şekil 1 - *Triturus cristatus*'un alt türlerine ait ferogramlarda serum-protein fraksiyonlarının görünümü. A=*T.c.dobrogius*, B=*T.cristatus*, C=*T.c.carnifex*, D=*T.c.karelinii*. I-IV=Karakteristik esas fonksiyonlar. (Fachbach'dan)

Serolojik Bulgular :

(Şekil : 1) incelenecek olursa 4 alt-türe ait ferogramlarda aynı hızla hareket eden 4 fraksiyonun (ana band'ın) olduğu görülür (I. II. III. IV. band'lar). I. ve II. orijinden itibaren 0,15-1,5 mm. ötede (en yavaş hareket eden büyük moleküllü proteinler), III. (transferrin) orijinden itibaren 20 mm. ilerde ve IV. (albumin) ise 31 mm. uzaklıktadır (yani küçük moleküllü olduğu için en hızlı hareket eden en öndeki proteindir).

III. ve IV. fraksiyonlar arasında normal olarak iki band bulunur. Buradaki iki bandın yoğunluğu ve pozisyonu alt-türlere göre değişir. Buna rağmen bu bölge bütün *cristatus* alt-türleri için tipik olduğu kabul edilir; bu da yakın akrabalığı işaret eder.

II. ve III. bandlar arasında alt-türlere göre oldukça farklılıklar gösteren bir serum-protein düzeni görünür. Bunun yanı sıra erkek ve dişi arasında da ufak farklılıklar göze çarpar. (Aynı alt-türdeki erkek-dişi arasındaki bu farklılıklar önemsiz olduğundan, kantitatif mukayese için yalnız erkeklere ait densitometrik eğriler dikkate alınmıştır. (Şekil : 2).



Şekil 2 - *Triturus cristatus*'un alt - türlerine ait serum-proteinlerinin densitometrik eğrileri. A=*T.c.dobrogicus*, B=*T.c.cristatus*, C=*T.c.carnifex*, D=*T.c.karelinii*. (F.'dan)

Her bir alt-türün ferogramını ayrı ayrı inceliyelim:

Triturus cristatus dobrogicus'da

Erkek 13, dişide 12 band var. Erkekteki orijinden 14 mm. uzaklıkta bulunan zayıf band dişide yoktur. II ve III. esas bandlar arasındaki bölgede dişide 6, erkekte 7 bandın mevcudiyeti karakteristiktir. Bu proteinlerin yoğunluğu, koyu olan bir band hariç diğerleri oldukça düşüktür ve aşağı yukarı eşit değerdendirler.

Triturus cristatus cristatus'ta

Erkek 12, dişide 13 band var. Erkekteki kesiklik, küçük zayıf bir banddan ileri geliyor ki bu orijinden 3,5 mm. uzaktır. Esas karakteristik bandlar her iki cinste de aynı güçte ortaya çıkar. II. ilâ III. arasındaki alt bandlarda kantitatif farklar vardır. Bu bölge dişilerde özellikle orijinden itibaren 5-10 mm. arası ve 15 mm. ye kadar uzaklıklarda belirgindirler.

Triturus cristatus carnifex'de

Erkek ve dişide aynı sayıda, 13'er band var. Yalnız hem erkek hem de dişide birer farklı band mevcuttur. Erkekteki orijinden 12 mm. uzaklıkta bulunan orta kuvvetteki fraksiyon dişide yoktur. Buna karşın, dişideki III. banddan 2 mm. ilerdeki fraksiyon erkekte bulunmaz. Her iki cinste de II. ve III. bandlar arasındaki bölge oldukça karakteristiktir. Tüm olarak dişilerdeki serum proteini erkektekinden biraz daha fazladır.

Triturus cristatus karelinii'de

Erkek 12, dişide 14 band var. Dişideki bu iki fazlalık, zayıf ile orta arası değişen iki banddan ileri gelir. Bunlar, II. ve III. ana bandların arasında bulunan biri orijinden 4 mm. diğeri 17,5 mm. uzaklıktaki bandlardır. Ayrıca özellikle orijinden 15 mm. uzaklıkta kısmen belirgin kantitatif bir farklılık da mevcuttur. II. ve III. ana bandlar arasındaki fraksiyonların düzeni kısmen *carnifex*'deki durumu andırırlar. Fakat fraksiyonların hareket hızlarının farkı ile *carnifex*'den tefrik edilir. III. ve IV. esas bandların arası da *karelinii*'ye özgü belirginlik gösterir. Zaten daha önce, III. ve IV. ana fraksiyonlar arasında normal olarak iki bandın bütün bu 4 alt-türde de bulunduğunu, fakat bunların yoğunluk ve pozisyonlarının (yani hızlarının) alt-türlere göre değiştiğini söylemiştik. İşte *karelinii* alt -türünde de bu bölgede diğerlerinde olduğu gibi anoda doğru hareket eden iki fraksiyon vardır, fakat birinin (ki bu III. banda yakın olanıdır) protein miktarı diğerlerinininkine nazaran oldukça fazla ve pozisyonu da farklıdır (yani daha hızlı yürüyen bir proteindir); bu da *karelinii* alt-türünü karakterize etmektedir.

Kantitatif mukayese: Bu 4 alt-türe ait serum protein fraksiyonları densitometre ile değerlendirilerek kantitatif mukayeseleri yapılmıştır. Her bir alt-türün erkek ve dişisi arasında pek fazla fark olmadığından sadece erkekleri mukayese edilmiştir. Şekil 2'de her bir türe ait serum-proteinlerinin densitometrik eğrileri görülmektedir. *T. cristatus*'un 4 alt-türü için karakteristik olan 4 bandın pikleri aşağı yukarı eşdeğerdedir. Sadece *dobrogicus*'da III. no.lu fraksiyonun biraz düşük olduğu görülür.

Proteinlerin total konsantrasyonuna bakarsak, eğrilerden de görüleceği gibi, *dobrogicus*'dan *cristatus*'a ve *cristatus*'tan *carnifex*'e doğru protein konsantrasyonu giderek artar ve *karelinii*'de en üst düzeye ulaşır.

SONUÇ

Burada 4 alt-türe ait görülen ferogramların incelenmesi ve fraksiyonların densitometrik değerlerinin mukayesesi, bu kurbağaların hepsinin aynı türe ait olduklarını gösterir. O halde bu serolojik çalışma, WOLTERSTORFF (1923) ve HERRE (1933)'in farklı yollardan saptadıkları sonuçları teyid eder.

Burada alt-türler arasındaki karakteristik farklılıklar III. band (transferrin) ile IV. band (albumin) arasında belirgindir. Bununla beraber bu bölge, alt -türler arasındaki benzerlik (akrabalık) için karakteristiktir denilebilir.

Bu ferogramlar, başka türlerin alt-türlerine ait ferogramlarıyla mukayese edilse (örneğin, *Salamandra*' ninkileri) köklü farklılıklar olduğu görülür; özellikle hızlı hareket eden bölgelerde (yani bilhassa Albumin bölgelerinde) göze çarpar. İncelenen bu 4 alt-türde ise, hızlı hareket eden bölgede büyük bir uygunluk görülmüş ve bu nedenle de 4 ırk arasında yakın ilişki düşünülmüştür. Irk seviyesindeki farklılıklar yavaş hareket eden bölgede (globulin fraksiyonlarında) barizdir. Protein konsantrasyonunun *dobrogicus*'dan *cristatus*'a ve *carnifex*'den *karelinii*'ye doğru tedit arttığı görülmüş, fakat total konsantrasyon miktarının (26,4 - 26,6 mg/ml. serum) yorum yapılamıyacak değerde olduğu anlaşılmıştır. Fraksiyon sayısındaki farklılık da çok azdır (12-14 ki bu kadar az fark, aynı ırkın erkek ve dişileri arasında da saptanmıştır). Bu nedenlerle FACHBACH, incelediği 4 alt-türün aynı filogenetik safhada olduklarına inanır.

ÖZET

Çok yönlü uygulama alanı olan elektroforez, son zamanlarda taksonomide de oldukça işe yarar hale gelmiştir. Özellikle diğer yöntemlerle taksonomik durumları halledilemeyen hayvanların akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmakta yardımcı olmuştur. Serolojik çalışmalardan bir örnek olarak aldığımız FACHBACH'ın araştırmasında, *Triturus cristatus*'un ırk durumunun bu yöntemle nasıl vuzuha kavuştuğu açıkça görülmektedir.

BİBLİYOGRAFYA

- 1 - BOLKAY, S. I. (1928).: Die Schadel der Salamandrinen mit besonderer Berücksichtigung auf ihre systematische Bedeutung. Z. Anat. 86, 259-319.
- 2 - CHEN, P.S. (1967). : Separation of Serum Proteins in different Amphibian Species by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Experientia 23, 483-485,
- 3 - COATES, M. L., TWITTY, V. C.(1967). : A genetic Analysis of differences in the Dicoelectrophoretic Patterns of Serum Proteins within the Salamander Genus *Taricha*. Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 173-180,
- 4 - DESSAUER, H. C., FOX, W. (1956). : Characteristic Electrophoretic Patterns of Orders of Amphibia and Reptilia. Science 124, 225-226,
- 5 - FACHBACH, G. (1974). : Das Serum - Eiweissbild der *Triturus cristatus* - Unterarten Z. zool. Syst. Evolut. - forschung Bd. 12, H, 1, 22-30,
- 6 - FACHBACH, G., ALBERT, W. (1971) : Zur Klärung verwandtschaftlicher Beziehungen bei Vertretern der Gattung *Salamandra* mit Hilfe der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese. I. Z. zool. Syst. Avolut. - forschung 9, 49-60.
- 7 - FLINDT, R., et al. (1968). : Das Serumeiweissbild mitteleuropäischer Anuren. Zool. Jb. Physiol. 74, 155-163,
- 8 - FRIEDEN, E. et al. (1957). : Changes in Serum Proteins in Amphian Metamorphosis. Science 126, 559-560,
- 9 - GALLIEN, C. I., et al. (1966). : Analyse comparative des proteines seriques dans deux especes du genre *Pleurodeles* (Amphibien Urodele) : *Pleurodeles waltii* et *Pleurodeles poireti* C. R. Acad. Sci. (Paris) 263, 2040-2042,
- 10 - HERRE, W. (1933). : Vergleichende Untersuchungen an den Unterarten des *Triturus cristatus* Laur. Z. F. Anatomie u. Entw.-gesch. 99, 1-62,
- 11 - KIORTIS, V., KIORTIS, M. (1960). : Fractionnement par electrophorese sur des proteines seriques de trois especes du genre *Triturus* Rev. Suisse Zool. 67, 119-127,
- 12 - OBST, F. J., AMBROSIUS, H. (1971). : Taxonomische Studien an europäischen Landshildkröten (Reptilia: Testudinidae) mit serologisch-immunologischen Methoden. Zool. Abh. Dresden 30, 297-331.
- 13 - SHONTZ, N. N. (1968).: Electrophoretic patterns of proteins of Salamanders of the genus *Desmognathus* (Family Plethodontidae). Copeia, 683-692,
- 14 - TUNNER, H. G. (1970). : Das Serumeiweissbild einheimischer Wasserfrösche und der Hybridcharakter von *Rana esculenta* Verh. d. Dtsch. Zool. Ges. 64, 352-358,
- 15 - WOLTER storff, W. (1923). : Übersicht über die Unterarten und Formen des *Triton cristatus* Laur. Bl. Aquar. Terrarkde 34, 120-126,