



Antalya İli'nde Üretilen Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Popülasyonundan Büyüme Hormonu I Geni İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Mesut Yılmaz^{1*}, Mehmet Özbaş², Mehmet Akif Kılıç³

^{1*} Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Antalya, Türkiye, (ORCID: 0000-0001-8799-3452), myilmaz@akdeniz.edu.tr

² Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Antalya, Türkiye, (ORCID: 0000-0001-6277-1095), mozbas@akdeniz.edu.tr

³ Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-4356-3343), mkilic@akdeniz.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi 17 Ağustos 2020 ve Kabul Tarihi 8 Ekim 2020)

(DOI: 10.31590/ejosat.781631)

ATIF/REFERENCE: Yılmaz, M., Özbaş, M., & Kılıç, M.A. (2020). Antalya İli'nde Üretilen Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Popülasyonundan Büyüme Hormonu I Geni İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (20), 223-232.

Öz

Bu çalışmada, Antalya İli'nde yetiştirilen gökkuşığı alabalığı kültür popülasyonundan büyüme hormonu I geni izole ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla kültür popülasyonundan 10 birey örnek olarak alınmıştır. Örneklenen balıkların kas dokularından toplam DNA izole edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere primerler dizayn edilmiş ve hedef gen bölgesi çoğaltılmıştır. İzole edilen genin dizi analizi yapılmış ve 4591 nükleotitten oluştuğu tespit edilmiştir. Referans diziyeye kıyasla 2 transisyonel, 14 transversiyonel ve 38 insersiyonel baza karşılık gelen 54 nükleotitten oluşan varyasyon bulunmuştur. Tüm nükleotit farklılıkları genin intron bölgelerinde tespit edilmiştir. Genin intron bölgelerinde yer alan putatif hormon yanıt elemanları (HRE) değerlendirildiğinde ise daha önce raporlanan dizi ile tamamen uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışmada elde edilen veriler filogenetik ve gen aktarım çalışmalarında kullanılabilecek niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Büyüme hormonu geni, *rtghI*, HRE, Gökkuşığı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*.

Isolation and Characterization of Growth Hormone I Gene from Antalya Culture Population of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

Abstract

In this study, the growth hormone I gene was isolated and characterized from the rainbow trout culture population reared in Antalya Province. For this purpose, 10 individuals from the culture population were sampled. Total DNA was isolated from the muscle tissue of fish. Primers used in the polymerase chain reaction were designed and the target gene region was amplified. Sequence analysis of the isolated gene was performed and it was determined that the gene consisted of 4591 nucleotides. Compared to the reference sequence, 54 nucleotide differences were found corresponding to 2 transitional, 14 transversional and 38 insertional bases. All nucleotide variations are located in the intron regions of the gene. When the putative hormone response elements (HRE) were evaluated, they were seen to be completely compatible with the previously reported sequence. The data obtained in this study can be used in phylogenetic and gene transfer studies.

Keywords: Growth hormone gene, *rtghI*, HRE, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

* Sorumlu Yazar: myilmaz@akdeniz.edu.tr

1. Giriş

Genetik bilgi, genomda nükleik asit dizileri ile saklanır. Genler deoksiribonükleik asit (DNA) üzerinde genetik bilgiyi kodlayan birimlerdir ve genlerde ya bir protein kodlanmıştır ya da işlevsel RNA'nın bilgisi barındırılır (Gerstein et al., 2007; Hüttenhofer et al., 2005). Ökaryotlarda genler ekzon ve intron denilen alt birimlerden oluşmaktadır. Ekzonda eksprese edilecek proteine ait aminoasit dizisinin bilgisi 3'lü baz dizilerinden oluşan kodlar ile temsil edilmektedir (Nelson & Cox, 2017). Ekzonlar oldukça korunmuş bölgelerdir. İntron bölgesinde yer alan baz dizileri ise ekzona göre daha fazla varyasyon gösterebilirler (Filiz & Koç, 2011). Nükleik asit baz dizilerinde görülen bu varyasyonlar aynı türe ait popülasyonlar arasında ve türler arasındaki genetik farklılığın bir göstergesi olabilir ve filogenetik çalışmalarda yoğun olarak kullanılırlar (Klug et al., 2018; Kocher & Carleton, 1997). Mitokondriyal genler (Xia, 2008) ve yapısal genler (Marins et al., 2003) bu amaçla kullanılabilen genlerdendir.

Genlerden aynı zamanda gen aktarım çalışmalarında da yararlanılmaktadır. Bu çalışmalarda aynı ya da farklı türlerden alınan DNA parçaları (düzenleyici dizi ve yapısal gen gibi) bir araya getirilerek rekombinant gen kaseti oluşturulmakta ve hedef türe aktarılmaktadır. Başarılı bir gen aktarımı sonucunda aktarılan genin kodladığı protein, hedef türde istenilen karaktere sahip soyların elde edilmesini sağlamaktadır (Yılmaz, 2012). Bu yolla hızlı büyüyen, hastalıklara dirençli, üretim koşullarına toleranslı, istenilen renk ve et kalitesine sahip soylar elde edilebilmiştir.

Büyüme hormonu geni (*gh*) balıklarda hem filogenetik çalışmalarda hem de gen aktarım çalışmalarında kullanılan yapısal bir gendir (Marins et al., 2003; Yılmaz, 2012). Alabalıklarda büyüme hormonu (GH); hipofiz bezinin anterior kısmında somatotrof hücreleri tarafından üretilen ve yaklaşık 22 kDa büyüklüğünde tek zincirden oluşan bir polipeptittir (Mori et al., 2001). Bu hormon balığın büyüme, gelişim ve metabolizmasını düzenlemektedir (Rothan et al., 2014; Kaplan, 1999; Nicoll et al., 1999; Özcan-Gökçek & Işık, 2020).

Salmonidlerde büyüme hormonunun moleküler yapısı ilk olarak chum salmon (*O. keta*) büyüme hormonunun izolasyonu, karakterizasyonu ve kısmi aminoasit dizisinin analiziyle aydınlatılmıştır (Sekine et al., 1985; Wagner et al., 1985). Ardından Agellon ve Chen (1986) gökkuşuğu alabalığı GH aminoasit dizisini ortaya koymuşlardır. Bunu takiben gökkuşuğu alabalığından *ghI* geni izole edilerek tanımlanmıştır (Agellon et al., 1988; Björnsson 1997).

Glukokortikoid, tiroid ve retinoik asit gibi hormonlar, nükleer reseptörler aracılığıyla fizyolojik yanıtlar ortaya çıkarmaktadırlar. Büyüme hormonu geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan sinyal reseptör kompleksi, DNA sekansının belirli bir bölgesine (hormone response element, HRE) bağlanmak ve seçilen genlerin ekspresyonunu düzenlemek üzere bir transkripsiyon faktörü olarak görev alır (Barlow et al., 1986; Slater et al., 1985).

Yapılan bu çalışmada, Antalya ilinde bulunan bir çiftlikte üretilen gökkuşuğu alabalığı popülasyonundan *ghI* geni izole ve karakterize edilerek literatürde rapor edilen (Yang et al., 1997) referans dizi ile benzerlik/farklılıkları araştırılmıştır. Tespit edilen varyasyonların putatif HRE bölgelerinde değişikliğe neden olup olmadığı değerlendirilmiştir. Böylece filogenetik ve

gen aktarım çalışmalarında kullanılabilecek kıymetli bir veri seti oluşturulmuştur.

2. Materyal ve Metot

2.1. Balıkların Temini

Gökkuşuğu alabalığı örnekleri (10 adet) Antalya İli'nde yetiştiricilik faaliyeti sürdüren bir çiftlikten temin edilmiştir. Örneklenen bireyler ayrı PE torbalara yerleştirilip etiketlenmiştir. Buzla soğutulmuş kutuda Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Laboratuvarına taşınmıştır. Laboratuvarda dorsal yüzgeçlerinin hemen gerisinden laterale yakın bölgeden alınan kas doku parçaları moleküler işlemler uygulanıncaya kadar -40°C derin dondurucuda steril tüpler içinde muhafaza edilmiştir.

2.2. DNA İzolasyonu

Toplam genomik DNA izolasyonu için yaklaşık 5 mg doku örneği ve CTAB DNA izolasyon protokolü (Freeland, 2008) kullanılmıştır. Kalıp DNA miktarları ve kalitesi nanodrop spektrofotometre (Thermo) ile belirlenmiştir (Kennedy & Oswald, 2011). İzole edilen kalıp DNA kullanılabilece kadar -20 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

2.3. Primer Dizaynı

Yang et al. (1997) tarafından bildirilen gökkuşuğu alabalığı *GHI* geni (*rtghI*) nükleotit dizisi izolasyon çalışmalarında referans dizi olarak kullanılmıştır. *rtghI* genine ait dizisinin 5' ve 3' ucunda yer alan bölgelerin Temel Bölgesel Hizalama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) yardımı ile GenBank veritabanında bulunan diziler ile uyumlarına bakılmıştır. Yapılan taramada yakın akraba türlere ait dizilerin korunmuş bölgeleri primer dizaynı için kullanılmıştır.

rtghI geni DNA bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılması için gerekli olan primerler hedef DNA bölgelerinin komplementer dizilerine karşılık gelen F 5' GCACTTTCAAGCTAAGTAACCATCCTTGGC 3' ve R 5' GCAGCAGACCCATGTTTGGAAAGTCTG 3' dizilerden oluşturulmuştur. PCR reaksiyonunda kullanılacak primerlerin primer uzunluğu, GC yüzdesi, bağlanma ve çözünme sıcaklıkları, 5' uç kararlılığı, 3' uç spesifikliği gibi kriterleri karşılayacak şekilde (Dieffenbach et al., 1995) dizayn edilmiştir. Primerler hizmet alımı yolu ile sentezletilmiştir (GenScript).

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları

Hedeflenen *rtghI* DNA bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltımı için DNA polimeraz (ExTaq, Takara Inc.) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. Reaksiyon farklı denatürasyon, primer bağlanma ve sentez sıcaklıkları deneyerek optimize edilmiştir (Kennedy & Oswald, 2011). PCR reaksiyonu için kullanılan termal döngü koşulları başlangıç denatürasyonu 95°C'de 3 dak, denatürasyon 98°C'de 10 sn, primerlerin bağlanması 55°C'de 10 sn., DNA sentezi 72°C'de 5,5 dak ve son uzatma 72°C'de 5 dak olarak uygulanmıştır. Denatürasyon, bağlanma ve sentez basamakları 30 döngü olacak şekilde reaksiyon sürdürülmüştür.

2.5. PZR Ürünlerinin Kalitesinin Belirlenmesi, Saflaştırılması ve Dizi Analizi

Total DNA izolatlarının kalitesini belirlemek için örnekler %0,8'lik, PZR ürünleri görmek için örnekler %2'lik agaroz jelde

yürütülerek görüntülenmiştir. Her iki jelin elektroforezi için 8 volt/cm²lik bir elektrik alan kullanılmıştır (Brody & Kern, 2004). Örneklerin moleküler büyüklüklerini tespit etmek için jellerin bir kuyucuğuna 1kb Ladder (Bioron) yüklenmiştir.

Hedef diziyeye ait PZR ürünü jel ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla ticari bir kit (Nanohelix), üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda kullanılmıştır. İzole edilen genin dizi analizi hizmet alımı yoluyla (Genscript) yaptırılmıştır. Dizi analizinde 1,3-7 kb uzunluğundaki diziler için uygun olan "primer yürütme" tekniği kullanılmıştır (Bhatia & Dahiya, 2015; Clark & Pazdernik, 2013).

2.6. Kullanılan Yazılımlar

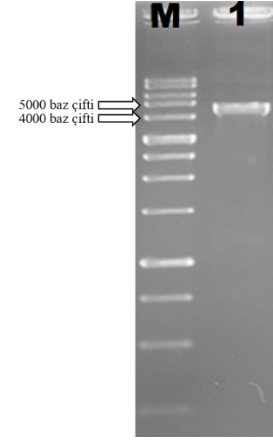
Bu çalışmalar sırasında referans dizinin baz uyumları ile dizayn edilen primer dizilerinin uygunluğunun kontrolü için BLAST, BioEdit (Hall, 1999), CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) ve FastPCR Professional (Kalendar et al., 2009) yazılımlarından yararlanılmıştır.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Büyüme hormonu I genine ait özgün nükleotit dizisi türler arasında farklılık gösterebilmektedir. Gökkuşuğu balıklarında yaklaşık 4500 baz çiftine sahip olan bu gen (Şekil 1) *Labeo* türlerinde yaklaşık 2500 baz çifti büyüklüktedir (Rajesh & Majumdar, 2007).

Daha önceki çalışmalarda (Yang et al., 1997; Agellon et al., 1988) rapor edildiği gibi *rtghI* geni 6 ekzon ve 5 introndan oluşmaktadır. Bu yapı baramundi (Yowe & Epping, 1995), atlantik salmon (Johansen et al., 1989; Male et al., 1992), tilapia (Ber & Daniel, 1993) ile benzerlik gösterirken, 5 ekzon ve 4 introna sahip olan *Labeo* türlerinden (Rajesh & Majumdar, 2007) farklıdır. Genin kodladığı amino asit sayısı da türler arasında farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda izole edilen genin referans dizi ile yapılan kıyaslamasında, daha önce rapor edildiği gibi, 6 ekzonda 630 baz çiftinden oluşan açık okuma çerçevesinde 210 amino asit kodladığı görülmüştür. Ancak,

büyüme hormonu geni *Labeo roita* 'da 4. ekzonda görülen 9 baz çiftlik delesyonla 207 amino asit kodlamaktadır (Rajesh & Majumdar, 2007).



Şekil 1. *rtghI* geni PCR ürününün agaroz jel görüntüsü (M: Markır)

Çalışmamızda izole edilen Antalya kültür popülasyonuna ait *rtghI* geninin dizi analizi sonuçları genin 4591 baz çiftine sahip olduğunu göstermektedir. Yang et al. (1997) ise *rtghI* geninin 4552 baz çiftlik bir nükleotit dizisinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Genin başlangıç (ATG) ve dur (TAG) kodları arasında yer alan nükleotit dizisi değerlendirildiğinde, bu iki dizinin %98,78 oranda birbiriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen %1,22 oranındaki uyumsuzluk genin intron bölgelerinde yer almaktadır ve 2 transisyonel, 14 transversiyonel ve 38 insersiyonel baza karşılık gelen 54 nükleotit varyasyonu içermektedir. Genin sadece ekzon bölgeleri karşılaştırıldığında, bu iki dizinin %100 uyumlu olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Ayrıca Antalya ilinde üretilen kültür popülasyonundan izole edilen *rtghI* geninde yer alan tüm intronların başlangıç ve bitiş dinükleotidleri klasik korunmuş GT/AG uçbirleşme bölgeleri (Mount, 1982) ile uyum içerisindedir.

Tablo 1. Antalya ilinde üretilen kültür popülasyonundan izole edilen *rtghI* geni nükleotid dizisinin referans dizi (Yang et al., 1997) ile karşılaştırması

Yang et al., 1997	1 ACATACTCAACCGACCACCGCACTTTCAAGCTAAGTAACCATCCTTGGCA	50
Mevcut çalışma	1 ACATACTCAACCGACCACCGCACTTTCAAGCTAAGTAACCATCCTTGGCA	50
Yang et al., 1997	51 ATTAAGAGTAAAAATGGGACAAGgtaagcctgctttttctgtctatttat	100
Mevcut çalışma	51 ATTAAGAGTAAAAATGGGACAAGgtaagcctgctttttctgtctatttat	100
Yang et al., 1997	101 tttttcagtggaagtcagtgaccatttagtacaatttaactactgcta	150
Mevcut çalışma	101 tttttcagtggaagtcagtgaccatttagtacaatttaactactgcta	150
Yang et al., 1997	151 tgaggttataatctattgacacagaaccacctgctttaacaacctaacta	200
Mevcut çalışma	151 tgaggttataatctattgacacagaaccacctgctttaacaacctaacta	200
Yang et al., 1997	201 tgtgatccataacatttacatttgagtcatttagcagacactcttatcca	250
Mevcut çalışma	201 tgtgatccataacatttacatttgagtcatttagcagacactcttatcca	250

Yang et al., 1997	251	ga-cgacttacatgagcaattggggttacgtgccttgctcaagggcacat	299
Mevcut çalışma	251		300
Yang et al., 1997	300	cagatttctcacctagtcagctctggggttgaaaccagtaacgaccagc	349
Mevcut çalışma	301		350
Yang et al., 1997	350	gctcttaaccgcta-gctattgggtgtacgatggctgagaaaatcttacc	398
Mevcut çalışma	351		400
Yang et al., 1997	399	aatgtatctcaccataaattcgacttactcgttttctacatttctatttg	448
Mevcut çalışma	401		450
Yang et al., 1997	449	aatctctcttttagTGTTTCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTT	498
Mevcut çalışma	451	TGTTTCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTT	500
Yang et al., 1997	499	TCCTGAGTCAAGGGGCAGCGATAGAAAACCAACGGCTCTTCAACATCGCG	548
Mevcut çalışma	501	TCCTGAGTCAAGGGGCAGCGATAGAAAACCAACGGCTCTTCAACATCGCG	550
Yang et al., 1997	549	GTCAGCCGGGTGCAACATCTCCACCTATTGGCTCAGAAAATGTTCAATGA	598
Mevcut çalışma	551	GTCAGCCGGGTGCAACATCTCCACCTATTGGCTCAGAAAATGTTCAATGA GRE, PRE, ARE, MRE	600
Yang et al., 1997	599	CTTTgtaagacagcttttgaatcttctttggacatatcaaatagtgtatc	648
Mevcut çalışma	601	CTTTgtaagacagcttttgaatcttctttggacatatcaaatagtgtatc	650
Yang et al., 1997	649	aatgattgttcttcttctttagacagtgctcctcagcacacaaccctcgt	698
Mevcut çalışma	651	aatgattgttcttcttctttagacagtgctcctcagcacacaaccctcgt GRE, PRE, ARE, MRE	700
Yang et al., 1997	699	ggctaaaaaaatctctctctccctttgtgattttgtgcagGACGGTACCC	748
Mevcut çalışma	701	ggctaaaaaaatctctctctccctttgtgattttgtgcagGACGGTACCC	750
Yang et al., 1997	749	TGTTGCCTGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCTGCTGGACTTC	798
Mevcut çalışma	751	TGTTGCCTGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCTGCTGGACTTC	800
Yang et al., 1997	799	TGTAACTCTGACTCCATCGTGAGCCAGTCGACAAGCAGACTCAGAA	848
Mevcut çalışma	801	TGTAACTCTGACTCCATCGTGAGCCAGTCGACAAGCAGACTCAGAA	850
Yang et al., 1997	849	GAGTTCAgtaagtaacctggccgaaacacttacgcatggtatgcccttta	898
Mevcut çalışma	851	GAGTTCAgtaagtaacctggccgaaacacttacgcatggtatgcccttta	900
Yang et al., 1997	899	gaaccatataaagtgtcaaactcgctattcaccttaaatatgaactcctcc	948
Mevcut çalışma	901	gaaccatataaagtgtcaaactcgctattcaccttaaatatgaactcctcc	950
Yang et al., 1997	949	atgatgcaagattccaaaaataaataata--taataataattgaaacaat	996
Mevcut çalışma	951	atgatgcaagattccaaaaataaataataataggcatctcaatttgaacaat	1000
Yang et al., 1997	997	cgatagaacttacggtagtcattagttattgggcaagcagaccaccaatt	1046
Mevcut çalışma	1001	cgatagaacttacggtagtcattagttattgggcaagcagaccaccaatt ERE	1050
Yang et al., 1997	1047	atgtaaaactccaatttctaattttacatttttaatttgatttgaaccttta	1096
Mevcut çalışma	1051	atgtaaaactccaatttctaattttacatttttaatttgatttgaaccttta	1100
Yang et al., 1997	1097	tttaactaggcaagtcagttaagaacaaattctcatttataatgacaagc	1146
Mevcut çalışma	1101	tttaactaggcaagtcagttaagaacaaattctcatttataatgacaagc	1150

Yang et al., 1997	1994	gattgattcattttatgctacacaaagatatataacatacatgtttcaac	2043
Mevcut çalışma	2001		2050
Yang et al., 1997	2044	attttcacaaagatgaacaagttaccagaattttgcaaactcaacttg-a	2092
Mevcut çalışma	2051		2100
Yang et al., 1997	2093	cgctgatgtggcctgtataccatgagttgcaggccactgtattagggta	2142
Mevcut çalışma	2101	.	2150
Yang et al., 1997	2143	aagctacacctcaaatatggtattatgagataagtcatgtattgttgta	2192
Mevcut çalışma	2151		2200
Yang et al., 1997	2193	aagacttgaatt-----acttgaaggcc	2215
Mevcut çalışma	2201		2250
Yang et al., 1997	2216	acaggactgaaaatgaatgacaacagccatgtctctgtcactaacatata	2265
Mevcut çalışma	2251		2300
Yang et al., 1997	2266	cagtcatgggtgataactacacttcaactcaaaaaggccaggcacactggg	2315
Mevcut çalışma	2301		2350
Yang et al., 1997	2316	aaattatatttgagacgtggcttagtgggggcattactaaaaaatgtcaa	2365
Mevcut çalışma	2351		2400
Yang et al., 1997	2366	gctgatacaactcaaatctggacacatcacaggtgactctataggttg	2415
Mevcut çalışma	2401		2450
Yang et al., 1997	2416	agtaatgactgactataacatcactttaagtaactgcagtcagattctgt	2465
Mevcut çalışma	2451		2500
Yang et al., 1997	2466	atattaagtgcacaggtttcctaaaaagtgttgagtaatggcagcacat	2515
Mevcut çalışma	2501		2550
Yang et al., 1997	2516	tggggtttacagtgcacatgaaagggaaatacctttatgctttcctagtta	2565
Mevcut çalışma	2551		2600
Yang et al., 1997	2566	gaaagcatagtgtaggaccacgtatgcctcttctcagcagatctttcagg	2615
Mevcut çalışma	2601		2650
Yang et al., 1997	2616	gctttacattgtgatgtggtaactgaccttatccatcatcgtgattatat	2665
Mevcut çalışma	2651		2700
Yang et al., 1997	2666	cagtgcacccccattcaatgactgaatatcgccccattcaaggacattta	2715
Mevcut çalışma	2701		2750
Yang et al., 1997	2716	tgcattgtgtcttttgctacgtgtgctttcagaaaggcccaataaacaat	2765
Mevcut çalışma	2751		2800
Yang et al., 1997	2766	attgatatgcacacatccacccaccatgcatctctctctgtctcccaca	2815
Mevcut çalışma	2801		2850
Yang et al., 1997	2816	gGGGAGCCAGGATGGCGTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGC	2865
Mevcut çalışma	2851	gGGGAGCCAGGATGGCGTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGC	2900

Yang et al., 1997	2866	TGCCCCCTACGGAACTACTACCAGAACCCTGGGGGGCGACGGAACGTC	2915
Mevcut çalışma	2901	TGCCCCCTACGGAACTACTACCAGAACCCTGGGGGGCGACGGAACGTC	2950
Yang et al., 1997	2916	AGGAGGAAC TACGAGTTGTTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGgt	2965
Mevcut çalışma	2951	AGGAGGAAC TACGAGTTGTTGGCTTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGgt	3000
		RXR-RAR	
Yang et al., 1997	2966	cggcaaccatggtgccttcaatatcatgtgccttctctgtattttctacag	3015
Mevcut çalışma	3001	<u>g</u> cgcaaccatggtgccttcaatatcatgtgccttctctgtattttctacag	3050
Yang et al., 1997	3016	tgcggtgttttttgtgttctctattgcaaagtattgtagtaataaact	3065
Mevcut çalışma	3051	tgcggtgttttttgtgttctctattgcaaagtattgtagtaataaact	3100
Yang et al., 1997	3066	cacggacactagagaagc-ttaaccaagtttaattcttcccaaagttct	3114
Mevcut çalışma	3101	cacggacactagagaagc-ttaaccaagtttaattcttcccaaagttct	3150
Yang et al., 1997	3115	gtaccgctgtaatcagacagcaaacatttctcaatccacagtcataac	3164
Mevcut çalışma	3151	gtaccgctgtaatcagacagcaaacatttctcaatccacagtcataac	3200
Yang et al., 1997	3165	atcttacttaaaacactcctccttctcaatccttacagtttatggtcc	3214
Mevcut çalışma	3201	atcttacttaaaacactcctccttctcaatccttacagtttatggtcc	3250
Yang et al., 1997	3215	acaggaagctaataaagaggataacaggacaacaacatttattgctgcc	3264
Mevcut çalışma	3251	acaggaagctaataaagaggataacaggacaacaacatttattgctgcc	3300
Yang et al., 1997	3265	ttcagagaatctgtcctcacctcctgacctcaaccctcatctaatccac	3314
Mevcut çalışma	3301	ttcagagaatctgtcctcacctcctgacctcaaccctcatctaatccac	3350
Yang et al., 1997	3315	agatgtccattgttttttttcggagaaccattaagttctgacatgaccca	3364
Mevcut çalışma	3351	agatgtccattgttttttttcggagaaccattaagttctgacatgaccca	3400
Yang et al., 1997	3365	gtttctttcatttactatctcaatgatcaacgtttagccgattccaacag	3414
Mevcut çalışma	3401	gtttctttcatttactatctcaatgatcaacgtttagccgattccaacag	3450
Yang et al., 1997	3415	tatctttgggtctttaaactatataattattactattattgttcattgatc	3464
Mevcut çalışma	3451	tatctttgggtctttaaactatataattattactattattgttcattgatc	3500
Yang et al., 1997	3465	aagactgttctcgag-aaggtctggtgacctagaacacacacattaaat	3513
Mevcut çalışma	3501	aagactgttctcgagaaaggtctggtgacctagaacacacacattaaat	3550
Yang et al., 1997	3514	gtgtcaactataaaccattcttctttttttgaacccccgagGTCGAGACC	3563
Mevcut çalışma	3551	gtgtcaactataaaccattcttctttttttgaacccccgag GTCGAGACC	3600
		RXR-RAR, RXR-TR, RXR-RXR, TR-TR, TR-RAR	
Yang et al., 1997	3564	TACCTGACCGTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAAGTCACTCT	3613
Mevcut çalışma	3601	TACCTGACCGTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAAGTCACTCT	3650
		TR-RAR, RXR-TR	
Yang et al., 1997	3614	GTAGACGTGGGCTGGAGAGGCCAGCCAGCAAGAGCCTGTCTCCAGGGTTCG	3663
Mevcut çalışma	3651	G TAGACGTGGGCTGGAGAGGCCAGCCAGCAAGAGCCTGTCTCCAGGGTTCG	3700
		DUR	
Yang et al., 1997	3664	GTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCCTGCACTGAGGTGCATTTTCAA	3713
Mevcut çalışma	3701	GTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCCTGCACTGAGGTGCATTTTCAA	3750

Yang et al., 1997	3714	TTGAGATTCTCCATTAACATGCTTTTCAGTCTAGAGTAATTTTATTTTG 	3763
Mevcut çalışma	3751	TTGAGATTCTCCATTAACATGCTTTTCAGTCTAGAGTAATTTTATTTTG	3800
Yang et al., 1997	3764	GATCTAGTAGAGCCTGACTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTTGCCTTTTTTTC 	3813
Mevcut çalışma	3801	GATCTAGTAGAGCCTGACTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTTGCCTTTTTTTC	3850
Yang et al., 1997	3814	TCTGAAATCAACAACAACACTTTCTATATTGACTCTATCACTCTGAGCTA 	3863
Mevcut çalışma	3851	TCTGAAATCAACAACAACACTTTCTATATTGACTCTATCACTCTGAGCTA	3900
Yang et al., 1997	3864	CCATTGATTAGTACATTTACAGAAAAGGTTATTAATGTCTTATTTAGAT 	3913
Mevcut çalışma	3901	CCATTGATTAGTACATTTACAGAAAAGGTTATTAATGTCTTATTTAGAT	3950
Yang et al., 1997	3914	ATATGGTTCATGGCGGTGCTACTGTTTATGCATACGTTAATATTTAGGGG 	3963
Mevcut çalışma	3951	ATATGGTTCATGGCGGTGCTACTGTTTATGCATACGTTAATATTTAGGGG	4000
Yang et al., 1997	3964	TGAAATGAGAACTTGTAGAGCTCCAAGCTTTTGGATAATATATTTAGAG 	4013
Mevcut çalışma	4001	TGAAATGAGAACTTGTAGAGCTCCAAGCTTTTGGATAATATATTTAGAG	4050
Yang et al., 1997	4014	TAATTTCCCTTTACGTATTTTCATTCCTTAATCTTATTGTTTGAACTAAT 	4063
Mevcut çalışma	4051	TAATTTCCCTTTACGTATTTTCATTCCTTAATCTTATTGTTTGAACTAAT	4100
Yang et al., 1997	4064	AGTGATTCATGTTTCAATAAAGATGTTCTTCTCTGCAGcacataatctct 	4113
Mevcut çalışma	4101	AGTGATTCATGTTTCAATAAAGATGTTCTTCTCTGCAGcacatgatctct	4150
Poly A			
Yang et al., 1997	4114	tggcttctatattaatctttcaaatcaacattttttacaagttccttagc 	4163
Mevcut çalışma	4151	tggcttctatattaatctttcaaatcaacattttttacaagttccttagc	4200
Yang et al., 1997	4164	cccaacattcctatggtgtctctcggacaacttagggctggattcaatcc 	4213
Mevcut çalışma	4201	cccaacattcctatggtgtctctcggacaacttagggctggattcaatcc	4250
Yang et al., 1997	4214	gtatcgcagatgctccatttgaaatgtaaaggcaatggtcctgcggttcgc 	4263
Mevcut çalışma	4251	gtatcgcagatgctccatttgaaatgtaaaggcaatggtcctgcggttcgc	4300
Yang et al., 1997	4264	-gagactgcattcacttcaaagcctgcatatgtcggctcaatcgaaatt 	4312
Mevcut çalışma	4301	ggagactgcattcacttcaaagcctgcatatgtcggctcaatcgaaatt	4350
Yang et al., 1997	4313	acctgaaaaatggtatatacggttcttcagcgatacggattgaatccagccc 	4362
Mevcut çalışma	4351	acctgaaaaatggtatatacggttcttcagcgatacggattgaatccagccc	4400
Yang et al., 1997	4363	atagttacgtacatttgattggcaaaaacatgaatgtccaccgtctggt 	4412
Mevcut çalışma	4401	atagttacgtacatttgattggcaaaaacatgaatgtccaccgtctggt	4450
Yang et al., 1997	4413	gcgaatggtgaataaaaactccatttcaactttgtctgccaattgtccata 	4462
Mevcut çalışma	4451	gcgaatggtgaataaaaactccatttcaactttgtctgccaattgtccata	4500
Yang et al., 1997	4463	gggttggttggttatatacctcggaaattgagaaaagatatccgatggcac 	4512
Mevcut çalışma	4501	gggttggttggttatatacctcggaaattgagaaaagatatccgatggcac	4550
Yang et al., 1997	4513	atattaataaacagactttccaacatgggtctgctgcag 4552 	
Mevcut çalışma	4551	atattaataaacagactttccaacatgggtctgctgcag 4591	

Not: Ekzonlar büyük harfle, intronlar küçük harfle, kodlama bölgesi koyu harflerle belirtilmiştir. Putatif HRE'lerin altı kesikli çizgi, başlama ve dur kodlarının altları çift çizgi ve putatif Poly A sinyal dizisi altı çizili olarak verilmiştir. BŞL: Başlama kodu, DUR: Dur kodu, Poly A: Poliadenilasyon sinyali, GRE: glukokortikoid yanıt elementi, PRE: progesteron yanıt elementi, ARE: androjen yanıt elementi, MRE: mineralokortikoid hormon yanıt elementi, ERE: Östrojen yanıt elementi, RXR: retinoid X reseptörü, RAR: retinik asit reseptörü, TR: tiroid hormon reseptörü.

İzole edilen genin başlangıç kodu 1-3. bazlar, dur kodu ise 3589-3591. bazlar arasında bulunmaktadır. Ayrıca, poliadenilazson sinyali ise 4053-4058. Baz arasında yer almaktadır. Yang et al. (1997)'nin bildirdiği dizide ise başlangıç kodu 1-3. bazlar, dur kodu 3552-3554. bazlar, poliadenilazson sinyali ise 4016-4021. bazlar arasında bulunmaktadır. Özellikle kültür soylarına ait gen havuzları çok farklı kaynak popülasyonlardan gelen bireylerin karılmasından oluşmaktadır. Bunun yanında ıslah çalışmaları ile kültür soyları istenilen karakter yönünde seçilmektedir (Carvalho, 1993). Dolayısıyla kültür popülasyonlarının genetik yapısı farklılıklar gösterebilmektedir. Bu çalışmada gözlenen farklılıkların bahsedilen popülasyonlar arası varyasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

GH geni üzerindeki ilgili putatif HRE'lere glukokortikoid, tiroid hormon ve retinoik asit gibi moleküllerin bağlanmasıyla genin hormonlar tarafından düzenlenmesi sağlanmaktadır (Barlow et al., 1985; Slater et al., 1985). Tablo 1'de işaretlenmiş olan putatif HRE'ler (GRE, PRE, ARE, MRE, ERE, RXR, RAR, TR) daha önce rapor edilen çalışma (Yang et al., 1997) verileri ile uyum içerisindedir. Bu durum tespit edilen 54 nükleotit varyasyonunun genin HRE'ler yoluyla düzenlenmesinde farklılık yaratmadığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada Antalya İli'nde yetiştirilen gökkuşuğu alabalığı popülasyonundan büyüme hormonu I geni izole ve karakterize edilmiştir. Genin intron bölgelerinde referans diziyeye kıyasla varyasyonların olduğu, bu varyasyonların genin ekzon bölgesinde olmamasından dolayı kodlanan aminoasit dizisi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca, intronların başlangıç ve bitiş dinükleotidleri klasik korunmuş uçbirleşme bölgeleri ile uyum içerisindedir. Bunun yanında yine referans diziyeye kıyaslandığında incelenen hormon yanıt elementlerinin de varyasyonlardan etkilenmediği tespit edilmiştir.

4. Sonuç

Antalya ilinde üretilen gökkuşuğu alabalığı çiftlik popülasyonundan izole ve karakterize edilen rtghI geninin daha önce rapor edilen referans dizi ile olan benzerlik ve farklılıkları ortaya konmuştur. Tespit edilen varyasyonlar intron bölgelerinde yer aldığından genin kodladığı amino asit dizisinde farklılık yaratmamaktadır. Benzer şekilde intron bölgesinde yer alan değerlendirilen putatif HRE'ler de tespit edilen varyasyonlardan etkilenmemektedir. Bu çalışmada elde edilmiş olan veriler filogenetik ve gen aktarım çalışmalarında kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca, büyüme hormonu geninin ülkemizde kültürü yapılan tüm soylardaki benzerlik ve farklılıkları araştırılarak su ürünleri genetik ıslah programlarını destekleyecek verilerin oluşturulabileceği çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmaların ışığında büyüme ve gelişme ile genetik varyasyon arasındaki ilişkiler araştırılabilir. Bu yolla verimli soylar tespit edilebilirse katma değeri daha yüksek üretim yapma olanağı doğacaktır.

5. Teşekkür

Bu çalışmada uygulanan prosedürler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım-Kullanım ve Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 2009.09.40 nolu karar ile etik olarak uygunluğu onaylanmıştır. Çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

tarafından 2009.03.0121.012 no'lu proje ile desteklenen Mesut YILMAZ'a ait doktora tezinden üretilmiştir.

Kaynakça

- Agellon, L.B. & Chen, T.T. (1986). Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 5(6), 463-471.
- Agellon, L.B., Davies, S.L., Chen, T.T. & Powers, D.A. (1988). Structure of a fish (*Rainbow trout*) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 5136-5140.
- Barlow, J. W., Voz, M. L., Eliard, P. H., Mathy-Harter, M., De Nayer, P., Economidis, I. V., Martial, J. A. & Rousseau, G. G. (1986). Thyroid hormone receptors bind to defined regions of the growth hormone and placental lactogen genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(23), 9021-9025.
- Ber, R., & Daniel, V. (1993). Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. *Gene*, 125, 143-150.
- Bhatia, S. & Dahiya, R. (2015). *Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science: içinde Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, Academic Press, California.
- Björnsson, B.T. (1997). The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17: 9-24.
- Brody, J.R. & Kern, S.E. (2004). History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 333(1), 1-13.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, 43(sa), 53-73.
- Clark, D. P. & Pazdernik, N. J. (2013). *DNA Sequencing: içinde Molecular Biology (Second Edition)*, Academic Press, California.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J. & Dveksler, G.S. (1995). General concepts for PCR primer design in: *PCR Primer, A Laboratory Manual*, Dieffenbach CW, Dveksler GS Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Filiz, E. & Koç, İ. (2011). Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler. *GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 207-214.
- Freeland, J. R. (2008). *Ekologia Molekularna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Gerstein, M.B., Bruce, C., Rozowsky, J.S., Zheng, D., Du, J., Korbel, J.O., Emanuelsson, O., Zhang, Z.D., Weissman, S. & Snyder, M. (2007). What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Research*, 17 (6), 669-681.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hüttenhofer, A., Schattner, P. & Polacek, N. (2005). Non-coding RNAs: hope or hype?. *Trends Genet.*, 21 (5), 289-97.
- Johansen, B., Johnsen, O.C., & Valla, S. (1989). The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 77, 317-324.
- Kalendar, R., Lee, D. & Schulman, A.H. (2009). Fast PCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1), 1-14.

- Kaplan, S. L. (1999) Hormonal regulation of growth and metabolic effects of growth hormone. In: Kostyo JL, Goodman HM (Eds) Handbook of Physiology. The endocrine system, Vol V: Hormonal control of growth. Oxford University Press, New York.
- Kennedy, S. & Oswald, N. (2011). PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Palladino, M. A. & Spencer, C. A. (2018). Genetik Kavramlar (11. Baskı). Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kocher, T.D. & Carleton, K.L. (1997). Base Substitution in Fish Mitochondrial DNA: Patterns and Rates: içinde Molecular Systematics of Fishes, pp 13-24. Academic Press, California.
- Male, R., Nerlaand, A.H., Lorens, J.B., Telle, W., Lossius, I., & Totland, G.K. (1992). The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene. Biochem. Biophys. Acta, 1130, 345-348.
- Marins, L. F., Levy, J. A., Folch, J. M. & Sanchez, A. (2003). A growth hormone-based phylogenetic analysis of euteleostean fishes including a representative species of the Atheriniformes Order, *Odontesthes argentinensis*. Genetics and Molecular Biology, 26 (3), 295-300.
- Mori, T., Deguchi, F. & Ueno, K. (2001). Differential Expression of GH1 and GH2 Genes by Competitive RT-PCR in Rainbow Trout Pituitary. General and Comparative Endocrinology, 123, 137-143.
- Mount, S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. Nucleic Acids Research, 10, 459-472.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2017). Lehninger Principles of Biochemistry (7th Ed.). W.H. Freeman and Company, New York.
- Nicoll, C. S., Rodgers, B. D. & Kelly, K. M. (1999) Hormonal regulation of growth and development of nonmammalian vertebrates. In: Kostyo JL, Goodman HM (Eds) Handbook of physiology. The endocrine system, Vol V, Hormonal control of growth. Oxford University Press, NY.
- Özcan-Gökçek, E., & Işık, R. (2020). Associations between genetic variants of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene and growth traits in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Fish Physiology and Biochemistry, 46, 1131-1138.
- Rajesh, R. & Majumdar, K. C. (2007). A comparative account of the structure of the growth hormone encoding gene and genetic interrelationship in six species of the genus *Labeo*. Fish Physiol Biochem, 33, 311-333.
- Rothan, H. A., Ser Huy, T., & Mohamed, Z. (2014). Effect of Codon Optimisation on the Production of Recombinant Fish Growth Hormone in *Pichia pastoris*. The Scientific World Journal, 1-6.
- Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itoh, S. & Kawauchi, H. (1985). Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 4306-4310.
- Slater, E. P., Rabenau, O., Karin, M., Baxter, J. D., & Beato, M. (1985). Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. Molecular and Cellular Biology, 5(11), 2984-2992.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22(22), 4673-4680.
- Wagner, G.F., Fargher, R.C., Brown, J.C. & Mckeown, B.A. (1985). Further characterization of growth hormone from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). General and Comparative Endocrinology, 60, 27-34.
- Xia, J., Xia, K. & Jiang, S. (2008). Complete mitochondrial DNA sequence of the yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* and a genomic comparison among closely related sparid species. Mitochondrial DNA, 19(4), 385-393.
- Yang, B., Chan, K., Lin C. & Chen, T.T. (1997). Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth hormone 1 gene and the promoter region of growth hormone 2 gene. Archives of Biochemistry Biophysic, 340, 359-368.
- Yılmaz, M. 2012. Dağ Alası (*Salmo trutta macrostigma* Dumeril, 1858) için β -aktin Promotör-rtg η İfade Vektörünün Hazırlanması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Yowe, D.L., & Epping, R.J. (1995). Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. Gene, 162, 255-259.