



Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi Atatürk University Journal of Agricultural Faculty

Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 51 (2): 159-167, 2020
Atatürk Univ. J. of Agricultural Faculty, 51 (2): 159-167, 2020
ISSN: 1300-9036, E-ISSN: 2651-5016
<http://dergipark.gov.tr/ataunizfd>

Araştırma Makalesi / Research Article

Plati Balığı, *Xiphophorus maculatus* Günther, 1866’nda Glutatyon Redüktaz Geninin Biyoenformatiği*

Mehtap BAYIR

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye
e-mail: mehtap.bayir@atauni.edu.tr
doi: 10.17097/ataunizfd.631335

Geliş Tarihi (Received): 16.10.2019 Kabul Tarihi (Accepted): 25.03.2020 Yayın Tarihi (Published): 19.05.2020

ÖZ: Bu çalışmada, plati balığı, *Xiphophorus maculatus*’ta antioksidan enzim genlerinden, glutatyon redüktaz (*gsr*)’in genomik organizasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla genin tanımlanması yapılmış, ekzon- intron organizasyonu, TATA kutusu, poli A kuyruğu ve genin ürettiği amino asitler belirlenerek gen yapısı bir tablo şeklinde sunulmuş, *gsr* gen kromozom bölgeleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu bölgede bulunan genlerin, diğer bazı model organizmalarda ve insanda bulunduğu gen bölgeleri belirlenerek korunmuş gen sentezi oluşturulmuş, diğer omurgalılar tarafından kodlanan amino asit dizileri belirlenmiş ve bu organizmalarla olan filogenetik ilişki tespit edilerek, gen yapılarının benzerlik-özdeşlik oranlarının % olarak değeri belirlenmiştir. Çalışmada NCBI veritabanı, Ensembl genomik veritabanı, MEGA 6 programı ve BioEdit yazılımı kullanılarak elde edilen istatistikler değerlendirilmiştir. Balıkların stress faktörlerine göstermiş oldukları tepkiler, farklı gen ürünlerinin etkilerini içeren çok yönlü seviyelerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Dolayısıyla moleküler çalışmalarla ölçülebilecek bir balık stress tepkisine bu balığın genetik özelliklerinin araştırılması ve anlaşılması moleküler çalışmalar açısından büyük önem taşıdığı için, biyoenformatik araçlar kullanarak önemli bir model organizma olan plati balığı, *X. maculatus*’ta, *gsr*’nin karakterizasyonu ve tanımlanması yapılmış ve balıklarda moleküler stres tepkisi üzerine yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak birtakım veriler bu çalışma ile bilim dünyasına sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Plati balığı, Genomik organizasyon, *gsr*, Model organizma

Bioinformatics of Glutathione Reductase Gene of Platy Fish, *Xiphophorus maculatus* Günther, 1866

ABSTRACT: In this study, the genomic organization of glutathione reductase (*gsr*) gene was determined in platyfish, *Xiphophorus maculatus* which is an important model organism. For this purpose, we studied bioinformatics of glutathione reductase gene (*gsr*) (gene structure and identification of gene, detecting of amino acid sequences encoded by other vertebrates, conserved gene synteny and phylogenetic relationships with other vertebrates) in platyfish, *X. maculatus*. However, bioinformatic studies of the *gsr* enzyme gene have not been performed in platyfish which is an important model organism. For all these purposes, in this study, the statistics obtained by using Ensembl genomic database, NCBI database, BioEdit software and MEGA6 program are presented. Stress responses in fish can reveal multifaceted levels involving the effects of different gene groups and products. Understanding the genetic characteristics of a model organism that reacts to stress is crucial for molecular studies. For this purpose, the characterization and identification of *gsr*, one of the antioxidant enzyme genes in platyfish, *X. maculatus* which is an important model organism, was made using bioinformatics tools and some data to be used in the future studies on the molecular stress response were presented to the scientific world.

Keywords: Platyfish, Genomic organisation, *gsr*, Model organism

GİRİŞ

Cyprinodontiformes takımı ve Poeciliidae familyasına ait olan plati balığı, *Xiphophorus maculatus* Günther, 1866, omnivor bir tatlı su balığı olup, kanallarda, otlulu göl kıyılarında ve yavaş akan sulu hendeklerde yaşayabilen (Zaret, 1984; Arthington, 1989) önemli bir sucul model organizmadır (Ahmad et

al., 2011). Erkek plati balığının anal yüzgeci modifiye organ (gonopodium) olduğundan dolayı balığın cinsiyet tayini, balık öldürülmeden yapılabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı cinsiyet belirleme araştırmaları için de iyi bir model olarak bilinmektedir (Schreibman and Kallman, 1978; McKenzie et al., 1983). Plati balığı

Bu makaleye atıfta bulunmak için / To cite this article: Bayır, M., 2020. Plati Balığı *Xiphophorus maculatus*, Günther, 1866’nda Glutatyon Redüktaz Geninin Biyoenformatiği. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 51 (2): 159-167.
doi: 10.17097/ataunizfd.631335

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7794-1058>

*Bu çalışma 20. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu (24-26 Eylül 2019, Mersin, Türkiye)’nda sunulmuş ve özet kitapçığında özeti basılmıştır.

model organizma olarak yaygın bir şekilde kullanılan zebra balığı (*Danio rerio*) ve medaka (*Oryzias latipes*) kadar genetik çalışmalarda önemli bir yere sahiptir. Önemli miktarda zebra balığı veya medaka balığı genlerinin kopyalarının soylara özgü mevcudiyeti, yani bir gen çiftinin ya zebra balığı soyunda olup, alt fonksiyonlara bağlanması ve medaka soyunda olmaması veya bu durumun tersinin olması, farklı teleost balık türlerinde model canlı olarak kullanılmasının yolunu açmıştır (Schartl, 2014). Plati balığı, özellikle kanser araştırmalarında, üzerinde en fazla çalışılan model organizmalardan birisi olmakla beraber (Boswell et al., 2009) evrim, genetik, ekoloji, sistemak ve genomik gibi çeşitli alanlarda model organizma olarak kullanılmaktadır (Kang et al., 2013; Schartl et al., 2014). Bilimsel çalışmalardaki önemi dolayısıyla *Xiphophorus* genomu hakkındaki bütün genomik verilerin mevcut olduğu bir veritabanı olan *Xiphophorus* Genetic Stock Center oluşturulmuştur (Kallman, 2004). Kemikli (Teleost) balıklar, diğer omurgalılarından önemli bir farklılığa sahiptir. Bu farklılık, pek çok genin iki kopyasına sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Diğer omurgalılar bu genlerden sadece bir kopya taşımaktadır (Amores et al., 1998; Meyer and Schartl, 1999; Postlethwait et al., 2000; Braasch and Postlethwait, 2012). Bu özellik, çoğunlukla protein fonksiyonlarında kendini gösterir. Alt işlevsellik olarak adlandırılan, iki balık paralogunun gen bölgelerinin ifade bölgelerinin veya protein fonksiyonlarının, diğer omurgalılardaki tek bir ortologa eşdeğer olmaları nedeniyle bu tip genlerin fonksiyonel çalışmaları bilim dünyasında büyük etkiye sahiptir (Force et al., 1999). Plati balığı, *X. maculatus* evrimsel çalışmalar içinde önemli bir model olmakla beraber (Schartl et al., 2014), bu organizmanın tamamlanantüm sekanslarına ENSEMBL genom veri tabanından (http://uswest.ensembl.org/Xiphophorus_maculatus/Info/Index) erişmek mümkündür.

Organizmalarda, oksidatif stresin oluşturabileceği hasarlara karşı koruyucu rolü olan ve oluşan hasarları temizleyen veya hasarın oluşmasını engelleyen savunma sistemlerinden biride antioksidan savunma sistemi (Shinde et al., 2012). Antioksidanlara büyük etki yapabilen hücre içi ve hücre dışı faktörler, oksidanlar gibi davrandıkları için, hem oksidatif dengeyi hem de antioksidan enzim genlerinin ekspresyonunu (Jones, 1997; Rogers et al., 2000) değiştirmektedirler (Dougall, 1991; Sugino et al., 1998). Balıklarda meydana gelen oksidatif strese karşı savunma görevi yapan önemli bileşikler arasında glutasyon ve glutasyon türevleri ilk sıralarda yer alırlar

(Bonsignore et al., 1966, Bonsignore and Flora, 1972). Biyolojik verilerin bilimsel çalışmalarda çok fazla kullanılması nedeniyle, bu verilerden daha etkin bir şekilde yararlanabilmek için, verilerin işleme gereksinimi sonucunda, büyük bir çalışma sahasına sahip, bilgi teknolojisine dayanan ve multidisipliner bir bilim dalı olan biyoformatik ortaya çıkmıştır. Biyoformatik çalışmalar, farklı türdeki biyolojik verilere erişimin kolaylaştırılmasını, bu verilerin etkin kullanımını sağlamak ve aynı zamanda verilerin rasyonel bir şekilde yönetimi için gereksinim duyulan bilgisayar yazılımlarında yararlanmaktadır (Baxevanis and Ouellette, 2004; Atalay, 2002). Biyoformatik çalışmalarda BALSTX, BLASTN, MEDLINE, NCBI, ENSEMBL, UCSC, PDB, SWISSPROT, GenBank (USA), DDBJ (Japan), EMBL (Europe) gibi veri tabanları sıkça kullanılmaktadır (Attwood and Parry-Smith, 1999; Tandon and Bhattacharjee, 2009). Antioksidan enzimler üzerine yapılan araştırmalar, su ürünlerinde her zaman önemli çalışmalar olmakla beraber, model olarak kullanılan bir organizmada stres genlerinin biyoformatiğinin çalışılması, önemli genetik verilerin organizasyonunu sağlayacağı için, bu çalışmada, strese tepki gösteren bir sucül model organizma olan plati balığı, *X. maculatus*'nda antioksidan enzim genlerinden olan *gsr*'nin genomik organizasyonu çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Biyoformatik analizler

Glutasyon redüktaz geninin tanımlanması için, bu genin fonksiyonel gerçek bir gen olup olmadığının tespit etmek amacıyla NCBI veri tabanı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'nda, cDNA (ensembl veri tabanından alınan) sekansları kullanılarak BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) işlemi yapılmıştır. Çalışmada *gsr* genin 1 izoformu olduğu belirlenmiştir.

Korunmuş gen sentezini dizayn etmek amacıyla, plati balığı *gsr* geninin kromozom bölgesi belirlenmiş ve buradaki genlerin, zebra balığı (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*) ve insan (*Homo sapiens*)'da bulunduğu gen bölgeleri belirlenmiştir. Daha sonra tespit edilen gen bölgelerindeki sayısal rakamlara göre korunmuş gen sentezi oluşturulmuştur.

Plati balığı *gsr* genin diğer bazı sucül model organizmalarla ve bazı omurgalılarla olan filogenetik ilişkisinin tespiti için CLUSTALW (Thompson et al., 1994) BioEdit programı (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) kullanılmıştır. Plati balığı *Gsr* protein dizilimi ile zebra balığı (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*), stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) balon balığı

(*Fugu rubripes*), benekli gar (*Lepisosteus oculatus*), tilapya (*Tilapia niloticus*) fare (*Mus musculus*) ve insan (*Homo sapiens*) Gsr protein sekansları dizilenmiştir. Sonrasında dış grup olarak insan limfosit sitosolik protein (*LCP2*)'in kullanıldığı (Kell et al., 2018) filogenetik ağacı oluşturmak için MEGA6 (Tamura et al., 2013) programından yararlanılmış ve maksimum olasılık metoduna göre filogenetik ağaç analizi yapılmıştır. Tüm biyoformatik çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da öncelikle *gsr* geninin biyolojik verilerine ulaşılmış ve bilgisayarlı algoritmalar (BioEdit yazılımı, BLOSUM62 matris program (Gromiha, 2010) ve MEGA6 programı (Tamura et al., 2013)) kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Plati balığı, *X. maculatus gsr* gen sekanslarını belirlemek için, ensembl veri tabanı kullanılmıştır. Buveri tabanındaki en uzun cDNA transkripti olan ENSXMAG00000016221 kullanılmıştır. Plati balığı, *X. maculatus gsr* geninin ekson-intron organizasyonu ve protein kodlayan nükleotidleri ile 5'-3' uçları belirlenmiş ve sonra tespit edilen transkripsiyonun başlangıç noktası (+1), TATA kutusu ve poli A kuyruğu, gen yapısı üzerinde gösterilmiştir (Çizelge 2).

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Biyofomatik analizler

Normal koşullarda, tüm canlılarda reaktif oksijen üretimi ve antioksidan seviyeleri dengede olmakla beraber, bu denge bozulduğunda, serbest radikallerin zararlı etkisi ortaya çıkmakta ve oksidatif stres kaynaklı hastalıklar olarak kendini göstermektedir (Scandalios 1993). Stresle ilişkili genlerin, stres toleransı olmayan ve stres toleransı yüksek olan balıklarda farklı olarak ekprese edilmeleri ve bu genlerinin tanımlanıp, karakterize edilmesi, hem akvakültür seçim programlarında kullanılabilir hem de diğer omurgalılar için bir model olacak önemli genetik veriler sağlayabilir (Iwama et al., 1999). Ayrıca oksidatif stresin, insanda pek çok hastalığa sebep olduğu ya da etki ettiği bilinmektedir (Halliwell et al., 1991; Gutteridge, 1993; Poljsak et al., 2013). Mevcut çalışmada da tüm bu amaçlar doğrultusunda plati balığı, *X. maculatus*'nda *gsr*'nin tanımlama karakterizasyonu yapılmıştır. Ensembl genomik veri tabanından plati balığının *gsr* genine aiten uzun cDNA dizisi elde edilmiş ve bu genin ekson-intron organizasyonu belirlenmiş ve bu genin 13 ekson ve 12 intronu olduğu görülmüştür. Tüm intronlarının gt ile başlayıp, ag ile sonlandığı belirlenmiştir.

Ensembl genom veri tabanından faydalanılarak plati balığı, *X. maculatusgsr* genin yapısı belirlenmiştir. Glutasyon redüktaz genin eksonları büyük harflerle, intronlar ise küçük harflerle gösterilmiştir (Çizelge 1). Transkripsiyonun başlama noktası +1 ile belirtilirken, 5' upstream dizilimi ve 3' downstream dizilimi küçük harflerle gösterilmiştir. TATA kutusu ve poli adenilasyon sinyal dizilimi sarı boyanmış ve büyük harflerle gösterilmiştir. Asterisk ile gösterilen stop kodununun plati balığı *gsr*geninde TGA dizilimine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1). Plati balığı, *Xiphophorus maculatus*) ile diğer teleost balıklardan olan zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rubripes*), medaka (*Oryzias latipes*) ve insan (*Homo sapiens*) Gsr protein dizilimleri, benzerlik ve özdeşlik oranlarının yüzde olarak belirlenmesi için kullanılmış olup, bu amaç için BLOSUM62 matris algoritmasından yararlanılmıştır (Gromiha, 2010).

Plati balığı *gsr* geni ile zebra balığı *gsr* geni ortolojisini görmek için, bu iki gene ait protein dizilimleri, BioEdit programı kullanılarak dizilenmiş ve benzerlikleri hesaplanmıştır. Plati balığı protein diziliminin özdeşlik-benzerlik oranlarına bakıldığında, dizi analizinde kullandığımız medaka ile %73-78, stickleback ile %71-77, balon balığı ile %66-72, zebra balığı ile %59-68 ve insan ile %55-66 oranında da özdeş-benzer olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Plati balığı, *X. maculatus gsr* geninin bulunduğu kromozom bölgesindeki diğer genler ensembl genom veri tabanından tespit edilmiş ve fiziksel olarak aynı bölgede bulunan, korunmuş olan bu genlerin, zebra balığı, medaka ve insanda bulunduğu bölgeler belirlenmiştir. Zebra balığı, medaka ve insan ile plati balığı *gsr*geninin korunmuş gen sentezi, plati balığı *gsr* geninin ışın yüzgeçlilerin tüm genom duplikasyonu sonucu oluştuğunu ortaya koyan önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Plati balığı *gsr* geni ile diğer teleost balıkların ve insanın *GSR/gsr* genleri arasındaki korunmuş gen sentezine bakıldığında, plati balığında 23. kromozom üzerinde *gsr* sentenik geninin, 14. kromozom üzerinde bulunan zebra balığı *gsr* geni; 10. ve 22. kromozomlar üzerinde bulunan medaka *gsr* geni; 2, 4., 7., 8. ve 20. kromozom üzerinde bulunan insan *GSR* geni ile korunmuş gen sentenisi sergilediği belirlenmiş olup, bu sonuçlardan plati balığının *gsr* geninin yüksek oranda korunmuş gen yapısı gösterdiği açıkça görülmektedir (Şekil 1). Bu değerlendirmeler sonucunda, kemikli balıkların pek çoğunda teleost spesifik tam genom duplikasyonun olduğu ve sonrasında duplike *gsr* genin bir kopyasının kaybolduğu sonucunu kanıtlamaktadır.

Çizelge 1. Plati balığı, *Xiphophorus maculatus* glutasyon redüktaz geni nükleotit dizilimi
Table 1. The nucleotide sequence of platyfish, *Xiphophorus maculatus* glutathione reductase gene

5' tattttatgtgagtttagtgacaaaacgctttaatgtatttgcaggaagtgtctttt
 acttttgacggttctcttttgtctgAATTgtgtcaccttgacaacaggctgacttgcgcta
 +1
 GTGCGATTCTAAAGATTGGCAATTCACAAATCAGCGTAGAATTTACGTAAGGACCTAAA
 TATACGACAAAACAACGTGCTGTTAAGGAGGAACGCTGTACTGTCCGAGCTTCCACCGA
 AATTAACTCGAATAGACCGTTATCTATCTGGAGGTTGTAAGAATTTATAGAGCAAACAGT
 TACCCTACTGTGTGCGGTTTGTAGACTTCCCACGTTCCCATGTGTGACCTTCGCTGACATGG
 ATCAAAATGCCTTGTAACATATTGGAGCATGCAGCTTTTAAAAATTGCGAGGTTACTGT
 -M--Q--L--L--K--I--R--R--L--L--
 GTGTGTCTTTGCGGAGgtgag"N368"cgcagACACGAACTTGTCCGCCGAGCATGGCA
 C--V--S--L--R--R--R--H--E--L--V--R--R--S--M--A--
 TCGAACCGGGCATCGGCAGCGGAGACGCCCGCTTCGACTTCCTGGTGATCGGCGGCGGG
 -S--N--R--A--S--A--A--E--T--T--R--F--D--F--L--V--I--G--G--G--G--
 TCTGGAGGTTGCGCGGGCTCGGAGAGCGCGGGAACCTCGGAGCGCAACACCGCGTGTG
 -S--G--G--L--A--G--A--R--R--A--A--E--L--G--A--N--T--A--V--I--
 GAGAGCCCAAACCTCGGAGGTACCTGCgtgag"N1072"cccagGTCACGTTGGATGTG
 -E--S--H--K--L--G--G--T--C--V--N--V--G--C--
 TTCTTAAAAAGgtag"N81"cacagGTTATGTGGAATGCAGCAGTTTCATGCTGAGTATC
 V--P--K--K--V--M--W--N--A--A--V--H--A--E--Y--
 TGCACGATCACAGCGATTATGGCTTTGCAACTGAAAAAGTTCATTTCAGTTGGGAGACTC
 L--H--D--H--S--D--Y--G--F--A--T--E--K--V--H--F--S--W--E--T--
 gtaag"N1185"tgacgTTAAGGCCAAAAGGACGCTTACGTTTCTCGCCTGAACCAT
 L--K--A--K--R--D--A--Y--V--S--R--L--N--H--I--
 TTATCGCAACAACCTGGACAAAgtgag"N159"tccagGCTAAAATTGAACTATTCAG
 -Y--R--N--N--L--D--K--A--K--I--E--T--I--Q--
 GCTTCGCCAGGTTTACAGATGACCTTGAGCCACCGTGGAGGTCATGGTAGAAAACCTGA
 G--F--A--R--F--T--D--D--P--E--P--T--V--E--V--N--G--R--K--L--
 CGGCCTCATATCCCTCATAGCCACCGGGGGCAGCCTTCTGTTCTGAGTGACGAAGAAG
 T--A--P--H--I--L--I--A--T--G--G--Q--P--S--V--L--S--D--E--E--
 TTCCAGttgga"N64"tttagGTGCAAGTCTTGGCATTACTAGTGATGGCTTTTTTGAAC
 V--P--G--A--S--L--G--I--T--S--D--G--F--F--E--
 TTGAAACCTTCCAAAgtaag"N65"attagCGCAGTGTGATTGTAGGCGCTGGCTATA
 L--E--T--L--P--K--R--S--V--I--V--G--A--G--Y--
 TTGCTGTAGAAATGGCCGGCATCCTAGCCACCGTGGGGTCCAAAACATCCCTTGTATTTC
 I--A--V--E--M--A--G--I--L--A--T--L--G--S--K--T--S--L--V--I--
 GACAAACAGGGgtaag"N79"gttagGTTTTGAGAACTTTGATGCATTCATAAGCGCAA
 R--Q--T--G--V--L--R--N--F--D--A--F--I--S--A--
 ATTTGACCAAGAACCTCCAAAACAACCGCATCGACCTGTGGAAGAACCTCAGGTGAAAT
 N--C--T--K--E--L--Q--N--N--G--I--D--L--W--K--N--S--Q--V--K--
 CTGTGAGTAAGACCGACAAGGCTTTGAGGTGACGATTTGTTACCAAGACCCAGAGAAGA
 S--V--S--K--T--D--K--G--L--E--V--T--I--V--T--K--D--P--E--K--
 ACGATGAGAAGATCAGCACCATTTGAGGAAGTGGAGTGCCTTTTGTGGGCCATAGGAAGGC
 N--D--E--K--I--S--T--I--E--E--V--E--C--L--L--W--A--I--G--R--
 AGCCCAACACATCTGGGCTGAAACATCGGCAGCATGgtaac"N2216"accagGGTCTGGA
 Q--P--N--T--S--G--L--N--I--G--S--M--G--L--D--
 CACTGATGAAAGAGGCCACATCATCGCGGATGAATTCAGAACACCTCTCGGCAGGAAT
 -T--D--E--R--G--H--I--I--A--D--E--F--Q--N--T--S--R--P--G--I--
 CTATGCTGTTGGGGATGTTTGTGGCAAAGCTCTTCTCACACCTGgtgag"N69"ggcagT
 -Y--A--V--G--D--V--C--G--K--A--L--L--T--P--V--
 TGCCATTGCTGCAGGCAGAAAGCTTGCCCATAGATTGTTTGGGGCAAGAAGGACTCCAA
 -A--I--A--A--G--R--K--L--A--H--R--L--F--E--G--K--K--D--S--K--
 GTTGGACTACTCCAGCATCCCCACAGTGGTGTTCAGCCACCCACCCATTGGTACCCTGGG
 -L--D--Y--S--S--I--P--T--V--V--F--S--H--P--P--I--G--T--V--G--
 CCTCACAGAAGgtgac"N128"ctcagAGGAGGCTGTTAAATCCCATGGAAAGGAGAATG
 -L--T--E--E--E--A--V--K--S--H--G--K--E--N--V--
 TAAAGATCTATAAGACATCTTTCACGCCGATGTATCACGCCATCACGAGCAGGAGGAGCC
 -K--I--Y--K--T--S--F--T--P--M--Y--H--A--I--T--S--R--R--S--
 CATGCATCATGAAGCTGGTGTGTGGGCAAGGAGGAGAAGgtgac"N104"tgacgGTG
 P--C--I--M--K--L--V--C--V--G--K--E--E--K--V--
 GTGGCCTGCATATGCAGGCGCTTGGTGTGATGAAATGCTTCAGGGATTTGCTGTGCC
 -V--G--L--H--M--Q--G--L--G--C--D--E--M--L--Q--G--F--A--V--A--
 ATCAAAATGGGTGCGACCAAGCAGACTTTGACAACTGTTCGACATCCACCCACCTCG
 -I--K--M--G--A--T--K--A--D--F--D--N--T--V--A--I--H--P--T--S--
 TCCGAGGAGTTTGTCAAAATGCGTTGAacatgacaaaaactccggataatcagcccgaa
 -S--E--E--F--V--T--M--R--*--
 accagAATAttctctcatcagagtgatgacttg 3'

Çizelge 2. Plati balığı (Pb) ile diğer omurgalılarından Stickleback (St), Zebra balığı (Zb), Balon balığı (Bb), Medaka (Me) ve İnsan (In) *gsr* genleri arasındaki benzerlik-özdeşlik yüzde oranları

Table 2. Identity-Similarity Rate of platyfish (Pb) and the other vertebrates (stickleback (St), zebrafish (Zb), Fugu (Bb), medaka (Me) and human (In))

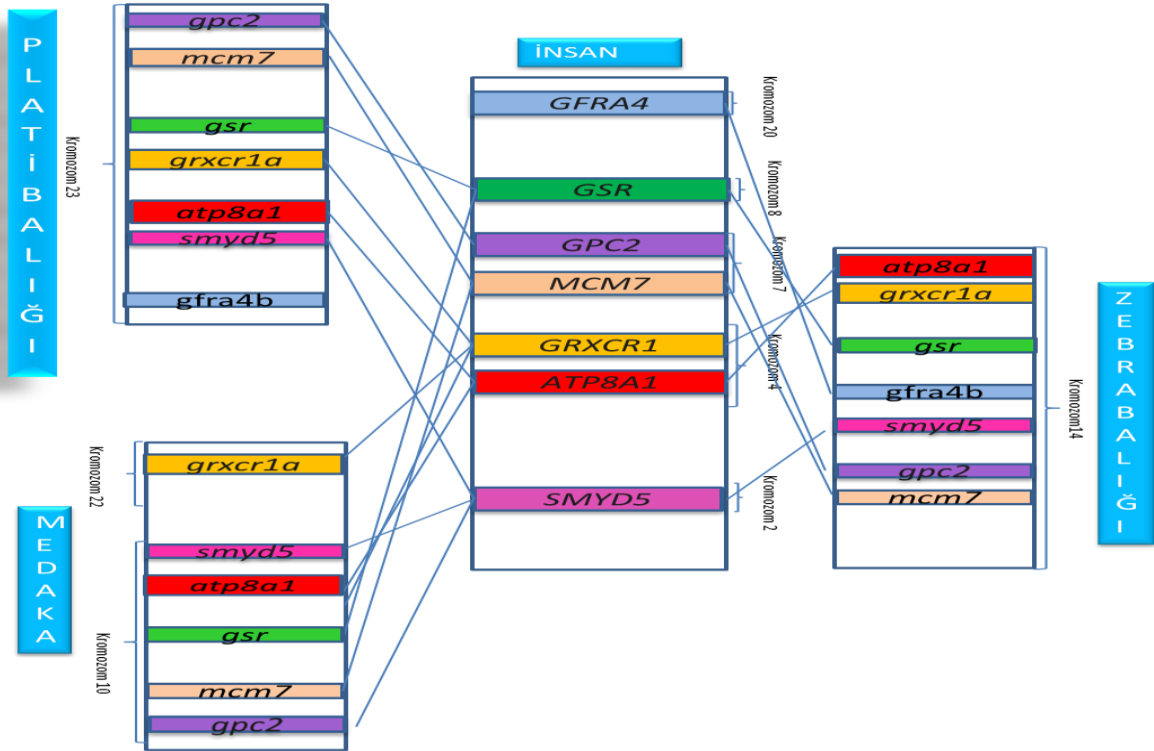
Pb Gsr	1	-----		
Me Gsr	1	-----MLLKKICRLLPSVS-----LSFPRLRVLRR		
St Gsr	1	-----SPRRHAALTRR		
Bb Gsr	1	MTQQWLKFGPPTRASELRARPASASFLVMAEVLRLTRVQLLFSSKQRLFSAFRCQDVVRR		
Zb Gsr	1	-----		
In Gsr	1	-----MALLPRALSAGAGPSWRRARAARFRGFLLLLPEPALTRALSRAMACRQ		
Pb Gsr	1	-----		
Me Gsr	25	---SSMA---SESDATRFDFLVIGGSRGGLAGARRAAELGANAAVIESHKLGGTCVNVGCV		
St Gsr	11	---AMAS---ADPQTTRLDFLVIGGSRGGLAGARRASELGASAAVIESHRLGGTCVNVGCV		
Bb Gsr	60	---SMASDPSSTDI TRDFLVIGGSRGGLAGARRASELGASAAVIESHKLGGTCVNVGCV		
Zb Gsr	1	-----MASGSRVSRFDFLVVGGSRGGLAGARRAAELGATTAVIESHRLGGTCVNVGCV		
In Gsr	49	EPQPQGPAAAAGAVASYDYLVIGGSRGGLASARRAAELGARRAAVESHKLGGTCVNVGCV		
Pb Gsr	1	-----		
Me Gsr	81	PKKV.....C...E.GSR.R...A.....IAH..R.....VT		
St Gsr	67	PKKV.....EV.S.R...A.....I.H..R.....VQ		
Bb Gsr	118	PKKV.....EVGN.R...A..T.....I.H..R.....Q		
Zb Gsr	53	PKKV..TST.....E...EGA.A...QII.H.....Q..S..E.G..		
In Gsr	109	PKKV..T..S.FM...A...PCEGK.N.RVI.E.....A..Q...T.SH..		
Pb Gsr	57	TIQGFARFTDDPEPTVEVNGRKLTAIPHILATGGQPSVLSDEEVPASLGITSDGFFELE		
Me Gsr	141	F...Y.....A.....K.Y.....S.....N.....		
St Gsr	127	N...H...N.....D...Y.....T...ADI..GN.....		
Bb Gsr	178	...H...N.....K.Y.....T.....		
Zb Gsr	113	F.H.Y.....K.Y..T...S...H..TV.EDD...S...C.....		
In Gsr	169	I.R.H.A..S..K..I..S.K.Y.....M..TPHESQI.....Q..		
Pb Gsr	117	TLPKRSVIVGAGYIAVEMAGILATLGSRKTSLVIRQTVGLRNFDAFISANCTKELQNNGID		
Me Gsr	201S.....I.....L.....I.....		
St Gsr	187T.....S.....MI...S.....S.L.T.....S.V.		
Bb Gsr	238	S.....V.....S.....I.....SL..T.....S...		
Zb Gsr	173	SC.....S.....II..G.....L..S.....		
In Gsr	229	E..G.....SA.....M..HDK...S..SM..T...E..E.A.VE		
Pb Gsr	177	LWKNSQVKSVSKTDKGLEVTIVTKDPEK--NDEKISTIEEVECLLWAIGRQPNTSGLNIG		
Me Gsr	261C..E.....D.T-.....V...D.....A.....		
St Gsr	247T..R..E.....V.....-Q..D.....VA		
Bb Gsr	298R..C.....A.R...RKNEE..LR..Q..D.....IT....		
Zb Gsr	233	.R..T...K.NG..SI.L...DDKDSQ..FD..ND.D.....E..A..LS		
In Gsr	289	VL.F...E.K..LS...SM..AV.GR---LPVMTM.PD.D.....V...KD.SLN		
Pb Gsr	235	SMGLDTERGHIIADEFQNTSRPGIYAVGDVCGKALLTP--VAIAAGRKLHRLFEGKKD		
Me Gsr	320	A..V...D...V.D...T.S.....--.....		
St Gsr	294	A...EM.....VV.....GP.....D.N.		
Bb Gsr	358	HLNV...K...VV.....A.....R.....--.....		
Zb Gsr	293	QI.VKL...VV.....V.....R.....		
In Gsr	346	KL.IQ..DK...V.....NVK.....--.....Y.E.		
			Özdeşlik (%)	Benzerlik (%)
Pb Gsr	353	KLVCVGKEEKVVGLHMQLGCEMLQGFVAIAIKM	100	100
Me Gsr	438	73	78
St Gsr	414	...E.....	71	77
Bb Gsr	476S.....	66	72
Zb Gsr	367	...A.EN.....F.....VN.	59	68
In Gsr	464	.M..AN.....I.....V..	55	66

Plati balığı *gsr* geni ile zebra balığı *gsr* geni ortolojisini görmek için, bu iki gene ait protein dizilimleri, BioEdit programı kullanılarak dizilenmiş ve benzerlikleri hesaplanmıştır. Plati balığı protein

diziliminin özdeşlik-benzerlik oranlarına bakıldığında, dizi analizinde kullandığımız medaka ile %73-78, stickleback ile %71-77, balon balığı ile %66-72, zebra balığı ile %59-68 ve insan ile %55-66 oranında da

özdeş-benzer olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Plati balığı, *X. maculatus gsr* geninin bulunduğu kromozom bölgesindeki diğer genler ensembl genom veri tabanından tespit edilmiş ve fiziksel olarak aynı bölgede bulunan, korunmuş olan bu genlerin, zebra balığı, medaka ve insanda bulunduğu bölgeler belirlenmiştir. Zebra balığı, medaka ve insan ile plati balığı *gsr* geninin korunmuş gen sentezi, plati balığı *gsr* geninin ışın yüzgeçlilerin tüm genom duplikasyonu sonucu oluştuğunu ortaya koyan önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Plati balığı *gsr* geni ile diğer teleost balıkların ve insanın *GSR/gsr* genleri arasındaki korunmuş gen sentezine bakıldığında, plati balığında

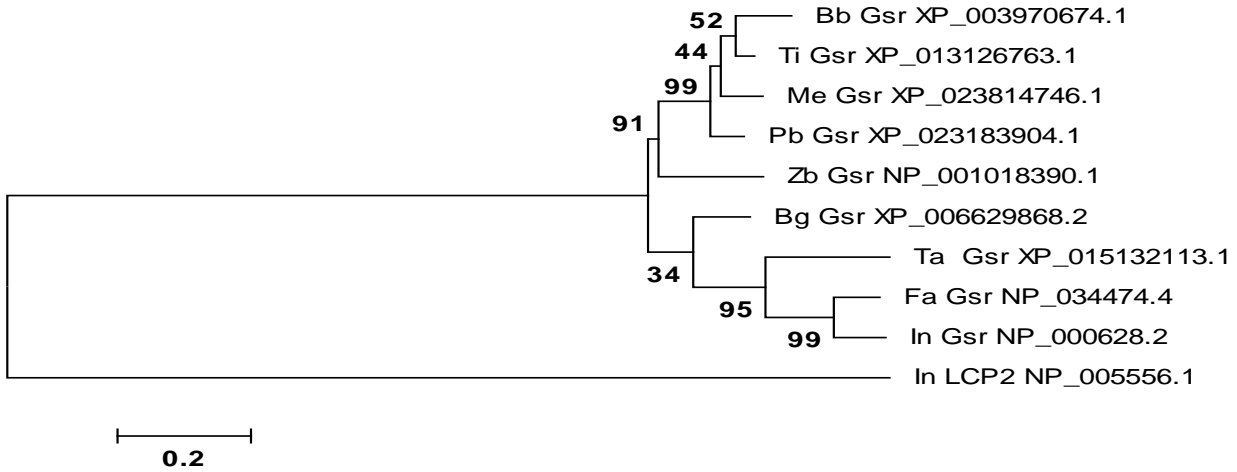
23. kromozom üzerinde *gsr* sentenik geninin, 14. kromozom üzerinde bulunan zebra balığı *gsr* geni; 10. ve 22. kromozomlar üzerinde bulunan medaka *gsr* geni; 2, 4., 7., 8. ve 20. kromozom üzerinde bulunan insan *GSR* geni ile korunmuş gen sentenisi sergilediği belirlenmiş olup, bu sonuçlardan plati balığının *gsr* geninin yüksek oranda korunmuş gen yapısı gösterdiği açıkça görülmektedir (Şekil 1). Bu değerlendirmeler sonucunda, kemikli balıkların pek çoğunda teleost spesifik tam genom duplikasyonunun olduğu ve sonrasında duplike *gsr* genin bir kopyasının kaybolduğu sonucunu kanıtlamaktadır.



Şekil 1. Plati balığı *gsr* geni korunmuş gen sentezi
Figure 1. Conserved gene synteny of platyfish *gsr* gene

Plati balığı, *X. maculatus gsr* geni ile diğer bazı sucul model organizmalar, fare ve insan *GSR* genleri arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla maksimum olasılık metoduna (Felsenstein, 1989) göre filogenetik ağaç dizayn edilmiştir. Kullanılan dizilimlerin erişim numaraları (Accession number) ise, plati balığı *Gsr*: XP_005802132.1, medaka *Gsr*: XP_023814746.1, balon balığı *Gsr*: XP_003970674.1, zebra balığı *Gsr*: NP_571369.1, benekli gar *Gsr*:

XP_006629868.2, tavuk *Gsr*: XP_015132113.1, fare *Gsr*: NP_034474.4, insan *Gsr*: NP_000628.2 ve dış grup olarak kullanılan insan LCP2: NP_005556.1 olarak NCBI veri tabanından bulunmuştur. Plati balığı ile diğer teleost balıkların glutasyon redüktaz proteinlerinin, diğer omurgalılarından farklı bir bölgede kümelenme gösterdiği filogenetik ağaçta net bir şekilde görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Plati balığı *gsr* geni için maksimum olasılık (maximum likelihood) metoduyla hazırlanmış filogenetik ağaç
Figure 2. Phylogenetic tree of platyfish *gsr* gene. Maximum likelihood method was used for analysis

İnsan *LCP2* geninin dış grup olarak kullanıldığı filogenetik ağaçta, plati balığının medaka (99) ve zebra balığı (99) ile büyük yakınlık gösterdiği, tavuk, fare ve insan ile olan yakınlığının ise (34) daha az olduğu görülmektedir. İnsan ile fare *Gsr* proteinlerinin çok yakın olduğu (99), tavuk *Gsr* protein diziliminde bu iki organizmaya oldukça yakın (95) olduğu ve bu organizmaların, balıklardan farklı bir yerde kümelenme gösterdiği görülmektedir.

SONUÇ

Teleost balıkların stres faktörlerine maruz kalmaları durumunda hücresel seviyedeki stress cevaplarının ölçülmesi için stres genleri tarafından üretilen protein ve enzimlerin ifadelerinin belirlenmesi ve böylece stress tepkilerinin ölçülmesi, moleküler düzeyde gerçekleştirilen çalışmalar için büyük önem arz etmektedir. Balık türlerinin stres toleransları ve stress genlerinin ifadesi birbirinden farklı olabileceği için, bu genlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi, su ürünleri seçim programlarında, stres toleransının geliştirilmesine yardımcı olmak için kullanılabilir önemli veriler olarak kullanılmaktadır. Buna ilaveten antioksidan enzim genlerinden biri olan glutatyon reduktazın, hem insan hem de diğer omurgalılar için model teşkil eden bir canlı olan plati balığında in siliko analizlerinin yapılması önemli genetik veriler sağlayacaktır. Bu nedenle, çalışmada biyoenformatik veri tabanları ve programları kullanarak plati balığı, *Xiphophorus maculatus*'ta *gsr* geninin tanımlanması ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar, çalışma kapsamında herhangi bir kişisel ve finansal çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Amores, A., Force, A., Yan Y.L., Joly L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., 1998. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, 282: 1711-1714.
- Arthington, A.H., 1989. Diet of *G. affinis holbrooki*, *Xiphophorus helleri*, *X. maculatus* and *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae) in streams of southeastern Queensland, Australia. *Asian Fish Sci.*, 2 (2): 193-212.
- Atalay, R.Ç., 2002. Neden Biyoinformatik?, *Avrasya Dosyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel, Sonbahar*, 8 (3): 129-141.
- Attwood, T.K., Parry-Smith, D.J., 1999. *Introduction to Bioinformatics*, Prentice Hall, Harlow, 240 p.
- Baxevanis, A.D., Ouellette, B.F.F., 2004. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, 2nd Edition, John Wiley & Sons Inc., New York (NY), 356 p.
- Bonsignore, A., Fornaini, G., Leoncini, G., Fontani, A., Segni, P., 1966. Characterization of leucocyte glucose 6 phosphatase dehydrogenase in Sardinian Mutants. *J. Clin. Invest.*, 45: 12-16.
- Bonsignore, A., De Flora, A., 1972. Regulatory properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Curr. Top. Cell.*, 6: 21-62.
- Boswell, M.G., Wells, M.C., Kirk, L.M., Ju, Z., Zhang, Z., Booth, R.E., Walter, R.B., 2009. Comparison

- of gene expression responses to hypoxia in viviparous (*Xiphophorus*) and oviparous (*Oryzias*) fishes using a medaka microarray. *Comparative biochemistry and physiology c-Toxicology & Phar.*, 149 (2): 2558-2265.
- Braasch, I., Postlethwait, J.H.I., 2012. Polyploidy in fish and the teleost genome duplication. In *Polyploidy and Genome Evol.* (ed. P. S. Soltis and D. E. Soltis), 341-383.
- Buechter, D.D., 1988. Free radicals and oxygen toxicity. *Pharmaceutical Res.*, 5 (5): 253-260.
- Dougall, W.C., 1991. Nick HS. Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrin.*, 129: 2376-2384.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP-Phylogeny inference package. *Cladistics*, 5: 164-166.
- Gromiha, M.M., 2010. Protein folding, stability and interactions. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 11 (7): 497.
- Gutteridge, J.M.C., 1993. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radical Res. Commun.*, 19 (3): 141-158.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American J. of Med.*, 91 (3): 14-22.
- Iwama, G.K., Vijayan, A.M., Forsyth, B., Ackerman, P.A., 1999. Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *mer. Zool.*, 39: 901-909.
- Jones, P.L., Ping D., Boss, J.M., 1997. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1b regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-b and NF-jB. *Mol Cell Biol.*, 17: 6970-6981.
- Kallman, K.D., Walter, R.B., Morizot, D.C., Kazianis, S., 2004. Two new species of *Xiphophorus* (Poeciliidae), from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca, Mexico, with a Discussion of the Distribution of the *X. clemenciae* Clade. *American Mus. Novitates*, 3441: 1-34.
- Kell, A.J.E., Yamins, D.L.K., Shook, E.N., Norman-Haignere, S.V., 2018. A Task-Optimized Neural Network Replicates Human Auditory Behavior, Predicts Brain Responses, and Reveals a Cortical Processing Hierarchy. *Neron*, 98 (3): 630-644.
- Ken, C.F., Lin, C.T., Wu, J.L., Shaw, J.F., 2000. Cloning and expression of a cDNA coding for catalase from zebrafish (*Danio rerio*). *J Agric Food Chem. Jun.*, 48 (6): 2092-2096.
- Mahdi, A.A., Shukla K.K., Ahmad, M.K., Rajender, S., Shankhwar, S.N., Singh, V., Dalela, D., 2011. Withania somnifera Improves Semen Quality in Stress-Related Male Fertility. *Hindawi Pub. Corp. Evidence-Based Comp. and Alt.Med.*. Article ID 576962, 1-9.
- Mckenzie, F.T., Bischoff, W.D., Bishop, F.C., Loijen, M., Schoonmaker, J., Wollast, R., 1983. Magnesian calcites: low temperature occurrence, solubility and solid-solution behavior. In: *Carbonates: Mineralogy and Chemistry. Reviews in Mineralogy*, vol. 11 (ed. Reeder, R.J.). Mineralogical Society of America, Washington, DC, 97-143.
- Poljsak, B., Šuput D., Milisav I., 2013. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Med. and Cellular Longevity*, Article ID 956792, 1-12.
- Postlethwait, J.H., Woods, I.G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y.L., Kelly, P.D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A. and Talbot, W.S., 2000. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.*, 10: 1890-1902.
- Rogers, R.J., Chesrown, S.E., Kuo, S., Monnier, J.M., Nick, H.S., 2000. Cytokine-inducible enhancer with promoter activity in both the rat and human manganese-superoxide dismutase genes. *Biochem. J.*, 347: 233-242.
- Schartl, M., 2014. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human Disease. Published by The Company of Biologists Ltd. *Dis. Models & Mech.*, 7: 181-192.
- Schartl, M., Walter, R.B., Shen, Y., Garcia, T., Catchen, J., Amores, A., Braasch, I., Chalopin, D., Volff, J.N., Lesch, K.P., Bisazza, A., Minx, P., Hillier, L., Wilson, R.K., Fuerstenberg, S., Boore J., Searle S., Postlethwait J.H., Warren W.C., 2014. The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. *Nat Genet.*, 45 (5): 567-572.
- Schreibman, M.P., Kallman, K.D., 1978. The genetic control of sexual maturation in the teleost, *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae); a review. Biology Department, Brooklyn College of the City University of New York, 11210, Osborn Laboratories of Marine Sciences, New York Aquarium, Brooklyn, New York 11203, USA. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18 (4): 957-962.

- Sen, S., 2011. Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy. Chapter 1: 1-37.
- Shinde, A., Ganu, J., Naik, P., 2012. Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A Review. *J Dent Allied Sci.*, 1 (2): 63-66.
- Sugino, N., Hirosawa-Takamori M., Zhong L., 1998. Hormonal regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid in the rat corpus luteum: induction by prolactin and placental lactogens. *Biol Rept.*, 59: 599-605.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biol. and Evol.*, 30 (12): 2725-2729.
- Tandon, P., Bhattacharjee, P., 2009. *Bioinformatics: An overview, Plant Tissue Culture and Molecular Markers*, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., Green Park Extension Uphaar Cinema Market, New Delhi, India, 29-49.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Volff, J.N., Bouneau, L., Ozouf-Costaz, C., 2003. Fischer C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in genetics: TIG.*, 19: 674-678.
- Zaret, T.M., 1984. Evolutionary ecology of neotropical freshwater fishes. *Proceedings of the 1st international symposium on systematics and evolutionary ecology of neotropical freshwater fishes, held at DeKalb, Illinois, U.S.A.*, Publisher: 65 (4): 1336-1338.