



## Medaka (*Oryzias latipes*) Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (*g6pd*) Geninin Genomik Organizasyonu

Mehtap BAYIR\*

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, ERZURUM

Geliş/Received: 04.12.2019

Kabul/Accepted: 04.02.2020

Atıf yapmak için: Bayır, M. (2020). Medaka (*Oryzias latipes*) Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (*g6pd*) Geninin Genomik Organizasyonu. *Anadolu Çev. ve Hayv. Dergisi*, 5(1), 38-44.

How to cite: Bayır, M. (2020). Genomic Organisation of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase (*g6pd*) Gene of Medaka (*Oryzias latipes*). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 38-44.

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

**\*Sorumlu yazarın:**

Mehtap BAYIR  
Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal  
Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE  
✉: [mehtap.bayir@atauni.edu.tr](mailto:mehtap.bayir@atauni.edu.tr)  
Cep telephone : +90 (544) 676 91 87

**Öz:** Ekzotermik canlılar, serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunabilmek için güçlü enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemine gereksinim duyarlar. Çalışmada Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (*g6pd*) enzim geninin tercih edilme nedeni, antioksidan savunma sistemin temel enzimlerinden birisi olmasıdır. Araştırmada medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* geninin yapısı (ekson ve intron dizilimleri, TATA kutusu, CAAT kutusu, Poli A kuyruğu) belirlenmiş, bu genin transkribe ettiği amino asitler tespit edilmiş ve diğer omurgalılarda aynı gen tarafından üretilen protein dizilimleri NCBI veri tabanı ve ENSEMBL veri tabanlarından elde edilerek Bioedit programında dizileme işlemi yapılmış, benzerlik-özdeşlik oranları % olarak hesaplanmış ve tablo olarak verilmiştir. Ayrıca yine elde edilen protein dizilimleri esas alınarak, BioEdit yazılımı ve MEGA6 programı kullanılarak, medaka (*O. latipes*) ve diğer bazı omurgalıları arasındaki filogenetik ilişki belirlenmiştir. Medaka *g6pd* geninde bulunan, plati balığı (*Xiphophorus maculatus*), zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), şişen balık (*Tetraodon nigroviridis*) ve insan (*Homo sapiens*) *g6pd/G6PD* genlerinin kromozomları üzerinde buldukları bölgeler belirlenerek manuel olarak korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir. Teleost balıkların stres oluşturan etmenlere karşı vermiş oldukları tepkiler, moleküler çalışmalarla ölçülmesi mümkün olan tepkilerdir ve dolayısıyla çalışılan türün genetik özelliklerinin belirlenmesi biyoteknolojik çalışmalar bakımından oldukça önemlidir. Bu nedenle biyoformatik veri tabanları ve programlar kullanılarak medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin karakterizasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. Böylece balıkların moleküler stres cevabı çalışmalarında kullanılabilen öncü veriler, bu araştırma ile bilim dünyasına sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Medaka, biyoformatik, model organizma.

## Genomic Organisation of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase (*g6pd*) Gene of Medaka (*Oryzias latipes*)

**Abstract:** Exothermic organisms need a strong enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system in order to be protected from the harmful effects of free radicals. The reason of Glucose 6 phosphate dehydrogenase (*g6pd*) enzyme gene is preferred in the study that this enzyme is one of the essential enzymes of the antioxidant defense system. In the study, the structure of the medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* gene (exon and intron sequences, TATA box, CAAT box, Poly A tail) was determined, amino acids transcribed by this gene were detected and protein sequences produced by the same gene in other vertebrates were recorded using data obtained from NCBI and ENSEMBL database, and the sequence of similarity-identity (%) was calculated and given as a table. Furthermore, based on the obtained protein sequences, the phylogenetic relationship between the medaka (*O. latipes*) and some other vertebrates was determined using BioEdit software and MEGA6 program. Conserved gene synthesis was designed by manually identifying the regions on the chromosomes of zebrafish, fugu, stickleback, platyfish and human *g6pd* genes of the conserved genes identified in the medaka. The responses of teleost fish to stress factors are possible to be measured by molecular studies and therefore it is very important for biotechnological studies to determine the genetic characteristics of the species studied. For this reason, characterization and identification of *g6pd* gene was performed by using bioinformatics databases and programs. thus, the pioneering data that can be used in molecular stress response studies of fishes have been presented to the scientific world with this research.

**\*Corresponding author's:**

Mehtap BAYIR  
Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal  
Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE  
✉: [mehtap.bayir@atauni.edu.tr](mailto:mehtap.bayir@atauni.edu.tr)  
Cep telephone : +90 (544) 676 91 87

**Keywords:** Medaka, bioinformatics, model organism.

## GİRİŞ

Medaka (*Oryzias latipes*), Doğu Asya'da yaşayan ve genellikle su, gölet ve çeltik tarlaları gibi tatlı sularında bulunan küçük bir balıktır (Hori, 2011). Medaka (*Oryzias latipes*)'nin fizyolojisi, embriyolojisi ve genetiği son 100 yıldır yoğun bir şekilde çalışılmakla beraber, son yıllarda bu organizmada yapılan çalışmalar, erken gelişim, pigmentasyon, cinsiyet belirleme ve insan hastalıkları için genetik model sistemler olarak kullanılması ve bu balığın biyolojik geçmişi üzerine odaklanmıştır (Naruse et al., 2011). Yamamoto (1951), ilk olarak, medaka için cinsiyet bağlantı haritasını oluşturmuş ve cinsiyetler arasındaki rekombinasyon sıklığındaki farklılıkları tanımlamıştır. Ayrıca ilk defa, balıklarda i ve ci losi arasında otozomal bağlantı olduğunu bildirmiştir. PCR teknolojisinin gelişmesinin ardından, medaka, zebra balığı, kirpi balığı ve diğer balık türlerinde genetik bir bağlantı haritası oluşturmak için birkaç girişimde bulunmuş ve bu deneylerin ilk aşamalarında, önceden herhangi bir genom bilgisi gerektirmediğinden parmak izi (finger-print) tipi işaretleyiciler kullanılmıştır. Daha sonraki aşamalarda, genomun spesifik bölgelerini, sekans bilgisi varlığında çoğaltan tek lokuslu markörler kullanılmış ve etkinleştirilmiş tek lokuslu markörler kullanılarak oluşturulan harita ortolog genler arasındaki bağlantı ilişkilerini karşılaştırmak için kullanılmıştır. Ardından teleostlara spesifik tüm genom çoğaltması uygulanmıştır (üçüncü WGD). Son olarak, tetraodon genom projesine ilaveten medaka genom sekanslama projesi hem medaka hem de tetraodon için yüksek kalitede bir taslak genom sekansı sağlamıştır. Tüm bu veriler, proto-kromozomların duplikasyonundan önce yeniden yapılanması ve mevcut medaka, tetraodon ve zebra balığı genomlarının oluşumuna yol açtığı potansiyel bir senaryoyu ortaya koyan üçüncü WGD'yi doğrulamıştır. Bu analiz ayrıca, teleost (kemikli) balıklarda mevcut ortolog genlerin korunmuş gen sentezini de tanımlamıştır. Son 100 yılda medakada yapılan araştırmalar, çok sayıda önemli biyolojik kaynak sağlamıştır. İlk kaynak, kaynaklardan ilki turuncu-kırmızı ve beyaz medaka gibi gövde rengi mutasyonlarını içermiştir.

Stres cevabının ölçülmesinin önemli bir kolu nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi hücrel oksidasyon radikallerinin meydana getirdiği zararlıdır. Oksijen biyolojik sistemlerde, organizmalar için elzem bir bileşik (Buechter, 1988) olmakla beraber canlı hücrelerinin tamamı, serbest radikaller adı verilen oldukça reaktif olan oksijen türevlerini de (ROS) oluşturabilmektedirler. (Halliwell, 1991; Bartosz, 2003). Canlı sistemlerde oluşturulan bu ROS'ler biyolojik olarak yararlı molekülleri okside ederek normal hücre ve doku fonksiyonlarında değişikliklere yol açabilirler. Bu oksidasyon oldukça kompleks bir sistem olan antioksidan savunma sistemi

(ASS) tarafından minimize edilir. Bu sebeple, aerobik hücrelerde ve dokularda ROS üretimi, molekül oksidasyonu ve antioksidan tüketiminin kararlı bir durumu sürekli olarak devam eder (Filho et al., 2000). Normalde oksidasyon seviyesi, normal hücrel homeostatik mekanizmaları üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle hücre içinde sıkı bir şekilde kontrol edilir. Oksidatif dengeyle alakalı metabolik yollardaki hemostatik dengelere bağlı olan gen ekspresyonundaki düzensizlik kanser, yaşlanma, ailevi ve yaşa bağlı hastalıklarının pek çoğu ile bağlantılı olup, bu bakımdan omurgalı türlerin büyük çoğunluğunda stres tepkilerinin düzenlenmesinde bu genler oldukça büyük öneme sahiptirler (Lushchak, 2011). Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin düzenlenmesinde pek çok önemli gen yollarının rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar arasında antioksidan enzimler predominant olanlardır. Bu genler süperoksit üretiminin bir sonucu olarak metabolik yolda  $H_2O_2$  üretilmesine neden olurlar (Trachootham et al., 2008). Hücreler, bir takım koruyucu mekanizmalara sahiptir ve bu mekanizmalar özellikle hücreleri serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden korur. Antioksidan sistemler hücreyi oksidatif strese karşı korumakla yükümlü olup, serbest radikaller kadar çeşitlidirler. Antioksidan enzimlerden biri olan G6PD, temel görevi NADPH üretmek olan PPP'nin ilk basamağını katalizleyen anahtar enzimdir (Pilz et al., 1984; Keha & Küfrevioğlu, 1997; Lehninger, 2000, Aytekin & Kargın, 2019). DNA'nın, steroidlerin, yağ asitlerinin, bazı aminoasitlerin ve indirgenmiş glutatyonun sentezinde kullanılan NADPH'lar (Bonsignore et al., 1966; Bonsignore & Flora, 1972) aynı zamanda hücrede hidrojen ve elektron kaynağı olarak görev yapmakta ve hem büyüme hem de üreme proseslerinde esansiyel bir bileşik olarak görev yapmaktadır (Kan et al., 1988). Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz, nükleotid öncülleri ve NADPH de dahil olmak üzere çeşitli temel moleküllerin üretilmesinden sorumlu korunmuş bir yol olan pentoz fosfat yolunun ilk enzimidir (Miclet et al., 2001). NADPH, birçok oksidatif stresin düzenlenmesinde rol oynayan enzimler tarafından, birçok hücrel reaksiyonda kullanılan önemli bir elektron kaynağıdır. Buna göre, bu yardımcı faktör, en az üç antioksidan yolağında, glutation, tioredoksin ve glutaredoxin döngülerinde rol oynar. Glutatyon döngüsünde, NADPH, glutatyon disülfid (GSSG)'e oksidasyonundan sonra serbest radikal temizleyici molekül glutatyonunu (GSH) yeniler. NADPH'den gelen elektronlar, iki GSH molekülü serbest bırakmak üzere GSSG'nin ayrıldığı glutatyon redüktaz tarafından katalize edilen reaksiyon sırasında serbest bırakılırlar. NADPH, diğer antioksidan yollarında da benzer bir rol oynamaktadır (Becker et al., 2003). G6PD enzim aktivitesi balıklarda özellikle beslenme ve çevresel şartlarla

değişiklik göstermektedir ve bu enzimin aktivitesinde olabilecek olağan dışı değişiklikler balık metabolizmasında önemli marazlara yol açabilmektedir (Bayır, 2002).

Çalışmada plati balığı (*Xiphophorus maculatus*), zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), şişen balık (*Tetraodon nigroviridis*) ve insan (*Homo sapiens*) *g6pd/G6PD* genlerinin kromozomlar üzerinde buldukları bölgeler belirlenerek manuel olarak korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir. Teleost (kemikli) balıkların stres oluşturan etmenlere karşı vermiş oldukları tepkiler, moleküler çalışmalar ile ölçülmesi mümkün olan tepkilerdir. Dolayısıyla çalışılan türün, genetik özelliklerinin belirlenmesi bakımından biyoteknolojik çalışmalar oldukça önemlidir. Bu nedenle biyoformatik veri tabanları ve programları kullanılarak medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin karakterizasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. Yapılan bu araştırma ile balıkların moleküler stres cevabı çalışmalarında kullanılabilir, öncü verilerin bilim dünyasına sunulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Biyofomatik Analizler:** Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (*g6pd*) geninin fonksiyonel bir gen olup olmadığını belirlemek için NCBI veri tabanı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'nda, gene ait cDNA dizilimi kullanılarak blastma (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) işlemi yapılmıştır. Bu genin fonksiyonel bir gen olduğu doğrulandıktan sonra, geninin tanımlanması ve karakterizasyonu için, ENSEMBL, NCBI, EXPASY gibi veri bankaları kullanılmıştır. Çalışmada *g6pd* genin bir tane izoformu olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada, medaka (*O. latipes*) *g6pd* genine ait korunmuş gen sentezi oluşturmak amacıyla öncelikle bu genin kromozom bölgesi tespit edilmiştir. Daha sonra bu kromozom bölgesinde bulunan diğer genlerin, zebra balığı (*Danio rerio*) ve insan (*Homo sapiens*)'da mevcut gen bölgeleri tespit edilmiş ve korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir (Şekil 1).

CLUSTALW (Thompson et al., 1994) BioEdit programı (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) kullanılarak, medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin diğer bazı omurgalılarla filogenetik yakınlığı tespit edilmiştir (Şekil 2).

Filogenetik ağaç dizaynında zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), kirpi balığı (*Tetraodon nigroviridis*), makobe ada çiklidi (*Pundamilia nyererei*), insan (*Homo sapiens*), adi sazan (*Cyprinus carpio*), dikenli balık (*Gasterosteus aculeatus*), fare (*Mus musculus*), tavuk (*Gallus gallus*), elektrikli yılan balığı (*Electrophorus electricus*) *g6pd* protein sekansları

kullanılmıştır. Adı geçen canlılara ait protein dizilimleri Bioedit programında hizalanmış ve daha sonra MEGA6 (Tamura et al., 2013) programı kullanılarak, dış grup olarak zebra balığı (*Danio rerio*) Cu/Zn superoksit dismutaz geni (*Sod1*)'in kullanıldığı filogenetik ağaç, maksimum olasılık metoduna göre dizayn edilmiştir (Kell et al., 2018).

Medaka (*O. latipes*) *g6pd* gen diziliminin tespiti için, ensembl veri bankası kullanılmıştır. Bu veri tabanındaki tek cDNA transkripti olan ENSORLT00000015543.2 kullanılmıştır. Medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin ekson ve intronları, eksonların üretmiş oldukları aminoasitler, *g6pd* geninin 5' ve 3' uçları ve bu bölgede bulunan, transkripsiyon olayında önemli rolü olan yapılardan TATA kutusu ve poli A kuyruğu ile transkripsiyonun başlangıç noktası (+1), dizayn etmiş olduğumuz gen yapısı üzerinde gösterilmiştir (Tablo 1).

## BULGULAR

**Biyofomatik Analizler:** Omurgalıların stres tepkileri, gerek akut gerekse kronik durumlarda karakterize edilebilen fizyolojik yollar arasındaki farklı etkileşimleri de kapsar. Balıkların akut stres yanıtı çevredeki değişikliklerle (örneğin zararlı bir kimyasalla temas, aniden artan sıcaklık veya tuzluluk vs.) beraber değişir (Iwama et al., 1999). Balıkların yaşam ortamları olan suda zaman zaman meydana gelen olumsuzluklardan olan pH ve sıcaklık değişimleri ve oksijen yetersizliği gibi stres etmenleri proteinlerin fonksiyonel yapılarının değişimine neden olmakta ve protein katlanmalarında açılmalar meydana gelebilmektedir. Bunun sonucunda ise bu proteinler hücredeki farklı proteinlerle kümeler meydana getirebilir. Sonuçta uyum bozukluğu dolayısıyla proteinlerde fonksiyon kaybı gerçekleşir (Basu et al., 2000). Dolayısıyla balıkların maruz kalma olasılığı yüksek olan bu tip stres faktörlerinin antioksidan enzim genlerinin ekspresyonlarında meydana getireceği değişiklik oldukça önemlidir. Ayrıca çeşitli genlerin ve proteinlerin çevresel stres faktörlerine karşı cevaplarının belirlenmesi ve farklı seviyelerde nasıl tanımlandıklarını anlamak için deneysel kanıtlardan önce biyoformatik çalışmaların tamamlanmış olmasına ihtiyaç duyulur. Medaka (*O. latipes*) model organizma olarak büyük önem taşıyan bir organizma olduğu için, *g6pd* antioksidan enzim geninin ayrıntılı biyoformatik çalışmasının yapılması büyük önem taşımaktadır. Yapılan bu araştırmada, medaka balığının *g6pd* genine ait ayrıntılı biyoformatik çalışmalar tamamlanarak hem balık fizyolojisi çalışmalarına hem de model organizma olması açısından diğer pek çok akvakültür çalışmasına sunulacak temel biyoformatik veriler paylaşılmıştır.

Biyoenformatik çalışmalar kapsamında, öncelikle *g6pd* geninin genomik verilerine ulaşmak için ENSEMBL, UNIPROT ve NCBI veritabanları kullanılmış ve istatistiksel değerlendirmeler için BioEdit yazılımı, BLOSUM62 matris programı ve MEGA6 programı bilgisayarlı algoritmalar dan yararlanılmıştır. Ensembl veri tabanından medaka balığının *g6pd* genine ait cDNA sekansı elde edildikten sonra yine aynı veri tabanı kullanılarak bu genin ekson (13 tane) ve intronlarına (12

tane) ulaşılmıştır. Genin 514 amino asit ürettiği tespit edilmiş olup, bu amino asitler ve hangi eksonlar tarafından üretildiği Tablo 1’ de gösterilmiştir. İtronlarının hepsinin gt-ag kuralını takip ettiği görülmüştür. Belirlemiş olduğumuz gen yapısında intronlar, 5’ ve 3’ uçları küçük harflerle, eksonlar ise büyük harflerle gösterilmiştir. Protein üretimin metiyonin ile başladığı ve stop kodununun ise TAA olduğu tespit edilmiştir.

**Table 1.** Medaka (*Oryzias latipes*) glukoz 6 fosfat dehidrogenaz gen yapısı.

**Table 1.** Gene structure of Medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* gene.

<p>ccccagatcttttcaaaagcgaacaaagatttttttaaatgttctatttatttgcagaat                  ctgcagagaagagctaaacacacgcccgccttattactgttagaacaacgaatgtgtac                  cagcagccacccatgtggacaatcacacaaggttgggagcggagtcattagtcacaagccc                  tggccacttgaatttacaatgacgtaagcggcttcgactgtgatggatctcgaagcag                  cactgtgagtttctcccaaaccaaaTAAATctctcaattctgcttctgatttcaaacg                  +1 TATA Kutusu                  GGAAGTAGACAGCACAAAATCTGAACAAACGCCCGTTCCTGCTGTCAGTTCAGTCTGC                  ACACACAGGCTGTGTCTGCTGCGAGTCAGTCTTCTCAGCGCTTAAACCGCGGTTTG                  TCTCTTTGGCTgtgagN1768tttagAGAAATGAATCGCCTTCCCGCTTCTCGCTCTG                  -M-N-R-L-P-L-S-R-S-                  AAGTGTITGGAGAAGTGGGAAGGAGCTTACGATGATGAGGAGTCCACCAATCAGATG                  E-V-F-G-E-L-R-K-E-L-Y-D-D-E-E-F-H-Q-S-D-                  TGCATATCTCATCATGAGGAGCATgtgagN3327ttagGGGATCTGGCCAGA                  V-H-I-F-I-I-M-G-A-S- -G-D-L-A-K-                  AAAAGATCTACCAACTCTTGTgtgagN68tgcagGTGGTTGTCAGAGACGGACTCTC                  K-K-I-Y-P-T-L-W -W-L-F-R-D-G-L-L-                  CCCGAATCGACCTTTTTGTCCGCTTGGCCGCTGACTTGACCGTCGACGCCATACGA                  -P-E-S-T-F-E-V-G-F-A-R-S-D-L-T-V-D-A-I-R-                  ACCGGTGCATGCCATACGAAGgtaaaN90cacagGTGGCGGACCGGAAGCAGACCG                  -T-G-C-M-P-Y-M-K- -V-A-D-T-E-A-D-R-                  CTTGTCAGTCTTCTCAGCAGAACTCGTACATCAGTGGAAATATGCAGATGAGAGCTC                  -L-S-V-F-F-S-R-N-S-G-R-K-Y-A-D-E-S-S-                  CTTCTCAAAGCTTAACTCGCACATCTGTCTCTCCCTGGAGAAACAGGCAACCCGCT                  -F-S-K-L-N-S-H-I-L-S-L-P-G-G-N-E-A-N-R-L-                  CTTCTACCTGGCCCTGCCCGCAGCTTACCACGAGCTGACCAAAACCTCAAATGCA                  -F-Y-L-A-L-P-P-T-V-Y-H-D-V-T-K-N-L-K-L-Q                  ATGCATGAGCACCAAGtgcgN268tttagGGGCTGGAACAGGGTCATCTGAGAAAACCG                  -C-M-S-T-K- -G-W-N-R-V-I-V-E-K-P-                  TTTGGACATG ATCTTCAGAGCTCAGAGGAGCTCTCCCTCCATCTGTCTCTTTTTGC                  -T-G-H-D-L-Q-S-S-E-E-L-S-S-H-L-S-S-L-F-A-                  CGAGGACAGATTTACCGCATCGATCATTATCTGGGCAAGAAATGGTGCAGAAATCTCAT                  -E-D-Q-I-Y-R-I-D-H-Y-L-G-K-E-M-V-Q-N-L-M-                  GGTGCTCAGgtgagN346tacagGTTTGGGAACGAATCTTTGGACCAATCTGGAAACAGA                  -V-L-R- -F-G-N-R-I-F-G-P-I-W-N-R-                  GACAGTGTGGCATGCGTGTCTTACTTCAAGAACCCTTTGGCACTCAGGGGCGAGGAG                  D-S-V-A-C-V-V-L-T-T-F-K-E-P-F-G-T-Q-G-R-G-                  GCTACTTTGATGATTTGGTATCATTCgtgagN328atcagAGATGTCATGAGAACCA                  G-Y-F-D-D-F-G-I-I-R- -D-V-M-Q-N-H</p>	<p>CTTGTCCAGATGCTCTGCCTGGTTGCCATGGAGAAACAGCCTCCACAAGCTCAGATGA                  --L--L--Q--M--L--C--L--V--A--M--E--K--P--A--S--T--S--S--D--D                  TGTGAGAGATGAAAAGgtacaN83catagTAAAGGTTGTAAGTGCATTGCTCCAGTGA                  --V--R--D--E--K- -V--K--V--L--K--G--S--T--Q--A--T--F--A--                  CCATGCTGATGTGGTGTGGTCAATATATGGGGAATCCAGACGGTGAAGGAGAAGCCA                  T--M--S--D--V--V--L--G--Q--Y--M--G--N--P--D--G--E--G--E--A--                  AACTGGGTATCTCGATGACCCACAGTACCTAAAGGATCCACTCAGGCTACGTTTGCCA                  K--L--G--Y--L--D--D--P--T--V--P--K--G--S--T--Q--A--T--F--A--                  CTGCTGTGCTTATGTGCACAACGACGCTGGGATgtaaaN65cttagGTGTTCCGTTTC                  T--A--V--L--Y--V--H--N--E--R--W--D-- -G--V--P--F--                  ATCTTCGCTGTGGAAAAGCCCTGAATGAGAGAAAGCCGAGGTGCGGCTGCAGTTCAGC                  -I--L--R--C--G--K--A--L--N--E--R--K--A--E--V--R--L--Q--F--T--                  GATGTCCAGGAGACATTTTTGGAAACAGTGTGAGAGGAAATGAGCTTGTGCTCGAGTG                  -D--V--P--L--D--H--I--F--G--N--Q--C--P--K--P--I--L--V--K--Y--V--                  CAGCCAAATGAGCCATCTACGCCAAATGATGAGCAAGAAACCTGGCGTTACTTCAGC                  -Q--P--N--E--A--I--Y--A--K--M--S--K--R--V--P--G--F--Y--E--S--                  CCGGAAGACGGAGCTGGACCTCACATACAGAGCAGATACAAAgtaaN103caagG                  -P--E--E--T--E--L--D--L--T--Y--K--S--R--Y--K--                  ATGTGAAGCTTCCAGACGCTACGACCGCTCATCCTGGATGCTCTGTGGGAGTCAGA                  -D--V--K--L--P--D--A--Y--E--R--L--I--L--D--V--F--C--G--S--Q--                  TGCATTTCTGCCAGgtcagN112tgcagTGAATGAGAGGAAAGCAGTTCGCGGATATT                  M--H--F--V--R--S- -D--E--L--R--E--A--W--R--I--F--                  CACTCTCTCTCATCAAAATAGACAAAGAAAGCCAAAACCAATCTCTTACAAATATGG                  --T--P--L--D--H--Q--I--D--K--E--K--P--K--P--I--L--V--K--Y--G                  AAGCCAGGCGCCGAGAGCAGATGAGCTGTGACAGAGTGGATTTGCTATGAAAG                  -S--R--G--P--A--E--A--D--E--L--V--Q--K--R--V--P--G--F--Y--E--S--                  CACTTATAAGTGGGTCAACCTCACAAACTTTAAattgtaaatagattagaaagtggagg                  --T--Y--K--W--V--N--P--H--K--L--*--                  gggggggggggtagtcagtagcataaagtgcagtagcattgcaaaatctgggctctct                  tggagatggaaactgtttccactgtgtgagccatcaagcagcaaaaaagatgacttaaac                  acaactctgagaaactcagctcactgtagctcctcactgcaaacattgttcaac                  ggcatttgacatgaaaaatgacgtttttcatccattcctggaacttttaagggaaatgt                  gtggagtgatccaaaaaaacccaggaatattatttggtaaatataaatgggtg                  gaattctattttccagggattaaagtggttaggagtaggaaagtaggtgacaaaaacagc                  tttgtcatgattaggaaggaacaaacaaagaatgaaagagtaggaactgggatgtacca                  gtagaactgagaacctgagtagcaacaagagctcctcactgcaaacattgcaaac                  tggcaatgtctttttctttccattcctagagccgagaactgttagtttgcgaaagttaaca                  tgaacttatttttaaaataaatccgaaatagcttaactgttctctgggaatattac                  gattgtataaacctttctttggagcatttttttagtttagactttctttccaaatgat                  ataaagatgactttctattttTATAAAgcca</p>
---	---

\*Medaka balığı (*Oryzias latipes*) glukoz 6 dehidrogenaz (*g6pd*) geni. Ekzonları büyük harflerle, transkripsiyonun başlama noktası +1 ile, intronlar ile 5’ utr ve 3’utr bölgeleri küçük harfle gösterilmiştir. TATA kutusu (TAAAT) ve poli adenilasyon sinyali (AATAAA) büyük harflerle ve san boyanmış olarak gösterilmiştir. Stop kodunu (TAA) asterisk ile gösterilmiştir.

Medaka (*O. latipes*) *g6pd* protein sekansı ile, plati balığı (*Xiphophorus maculatus*), zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), şişen balık (*Tetraodon nigoviridis*) ve insan (*Homo sapiens*) *g6pd* protein sekansları kullanılarak BLOSUM62 matris algoritmasında adı geçen organizmaların % benzerlik-özdeşlik oranları hesaplanmıştır (Gromiha, 2010).

Medaka *g6pd* geni ile plati balığı, zebra balığı, balon balığı, şişen balık ve insan *G6PD* gen ortolojisini görmek için, protein sekansları Bioedit programı kullanılarak dizilenmiş ve benzerlik-özdeşlik oranları yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçta medakanın, plati

balığı ile %91-96, zebra balığı ile %91-95, fugu ile %89-95, tetraodon ile %84-90 ve insan ile %77-88 benzerlik-özdeşlik oranı gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 2). Ensemble genom veri tabanı kullanılarak, Medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin 7. kromozom üzerinde, 5’ bandının 19,213,373-19,223,770 bölgesinde bulunduğu tespit edilmiş ve 7. kromozom üzerindeki diğer genler ve buldukları konum belirlenmiştir. Daha sonra bu genlerin medaka ile zebra balığı ve insanda da bulunduğu bölgeler tespit edilerek, bu bölgelere göre korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir (Şekil 1).

**Tablo 2.** Medaka (Me) ile Plati balığı (Pb), Zebra balığı (Zb), Balon balığı (Fu), Tetraodon (Te) ve insan (In) *G6PD* genleri arasındaki benzerlik-özdeşlik oranları.

**Table 2.** Identity and similarity rate between Medaka (Me) and Platyfish (Pb), Zebrafish (Zb), Fugu (Fu), Tetraodon (Te) and Human (In) *g6pd/G6PD* gene.

Me G6pd 1	--MNRLLPLSRSEVFGELR-----KELYDDEEFHQSDVHIFIMGASGDLAK	Me G6pd 285	DEKVKVLKCIAPVTMSDVLGQYMGNDGEGEAKLGYLDDPTVPKGSTQATFATAVLVYH
Pb G6pd 1	--T-----Q-----K-----	Pb G6pd 284	.....T..S.....V...E...D.....
Zb G6pd 1	--S-----Q-----H..TA-----	Zb G6pd 284	.....E...L.....V.D.....K.....K
Fu G6pd 1	--ANI-----HE.K.....V-----	Fu G6pd 285	.....V..AS.....V.D.E...D.Q.....V.....
Te G6pd 1	LCVIMII.VFCAP.R.NGQHLVSLGGVWGAA...RE.K...H...V.....	Te G6pd 301	.....T.AS.....V.D.E.....V.....
In G6PD 1	-MAEQVA...TQ.C.I.....E..FGDA.....T-----	In G6PD 286	.....SE.QANN.....V.....TK.....R...T...AV...E
Me G6pd 45	KKIYPTLWLFRRDGLLESTFFVGFARSDLTVDALRTGCMFPMKVADTEADRLSVFFSRN	Me G6pd 345	NERWDGVVFFILRCGKALNERKAEVRLQFTDVPDIFGNQCQRNELVVRVQPNEAIYAKMM
Pb G6pd 44	.....E.Y.....A..F...TEM..E...A..A..	Pb G6pd 344	.....D.K.....
Zb G6pd 44	.....Q.Y.....IA...V.N..E..AA..	Zb G6pd 344	.....SS..R.....
Fu G6pd 45	.....Q.Y.....A.....S...L..TE..S...A..	Fu G6pd 345	.....R...Y.....
Te G6pd 61	.....Q.Y.....A.....AS...L..TES.S...A..G..	Te G6pd 361	.....N.....
In G6PD 46	.....I.....N..I..Y...R...AD..KQSE.FF.ATPE.KLK.ED..A..	In G6PD 346	.....H..A...HQ..K...I...V.T...
Me G6pd 105	SYISGYADESSFSKLNHLSLPGNEANRLFYLAPPTVYHDVTKNLKQCMSTKGWN	Me G6pd 405	SKKPGVYFSPEETELDLTYKSRKDVKLPDAYERLILDVFCGSMHFVR-SDELREAWRI
Pb G6pd 104	.....EDA...A.M.A..P.....I.QH.....	Pb G6pd 404	.....Y.ANV.YQFVC.....
Zb G6pd 104	.....VE...D..T.L...A.....S.....I.H.....	Zb G6pd 404	.....H...R.....
Fu G6pd 105	.....N.TAGG...E..A..M...ASD...I..S..E.I.HF...A..	Fu G6pd 405	.....T.....
Te G6pd 121	.....N.SA..A..E.A...ASG.....I..S...I.HC...A...T	Te G6pd 421	.....T.....
In G6PD 106	...VA.Q.D.AA.YQR...MNA.HL.SQ.....EA...IHES...QI...	In G6PD 406	T...MF.N...S...GN...N.....
Me G6pd 165	RVIVKPPGHDLSSEELSHLSSLFADQIYRIDHYLGKEMVQNLMLRPGNRFPGPIW	Me G6pd 464	FTPLLHQIDKEKPKPIPYKYGSRGFAEDELVQVGVFRYEGTYKWNPHKL
Pb G6pd 164	.....T.....S.....	Pb G6pd 464	.....I.....S...D..K.....
Zb G6pd 164	.....R.....T.E.....	Zb G6pd 463	.....ES..TP..K.....K.....
Fu G6pd 165	.....T.....T.....	Fu G6pd 464	.....E.....K.....R.....
Te G6pd 181	.....T.....T.....	Te G6pd 480	.....R.E...S...T...K.....R.....
In G6PD 166	.....I.....R...DR..N.I...R.....A.....	In G6PD 465	.....EL.....I...T...MK...Q.....
Me G6pd 225	NRDSVACVLTTFKEPFGTQGRGGYFDFGLIRDVMQNHLLQMLCLVAMEKPASTSSDDVR		
Pb G6pd 224	.....		
Zb G6pd 224	.....S.....		
Fu G6pd 225	.....N.....M.....N.....		
Te G6pd 241	.....N.....M.....N.....		
In G6PD 226	.....NI..I.....E.....E.....N.....		

Özdeşlik Benzerlik

(%) (%)

Me G6pd 464 100 100

Pb G6pd 464 91 96

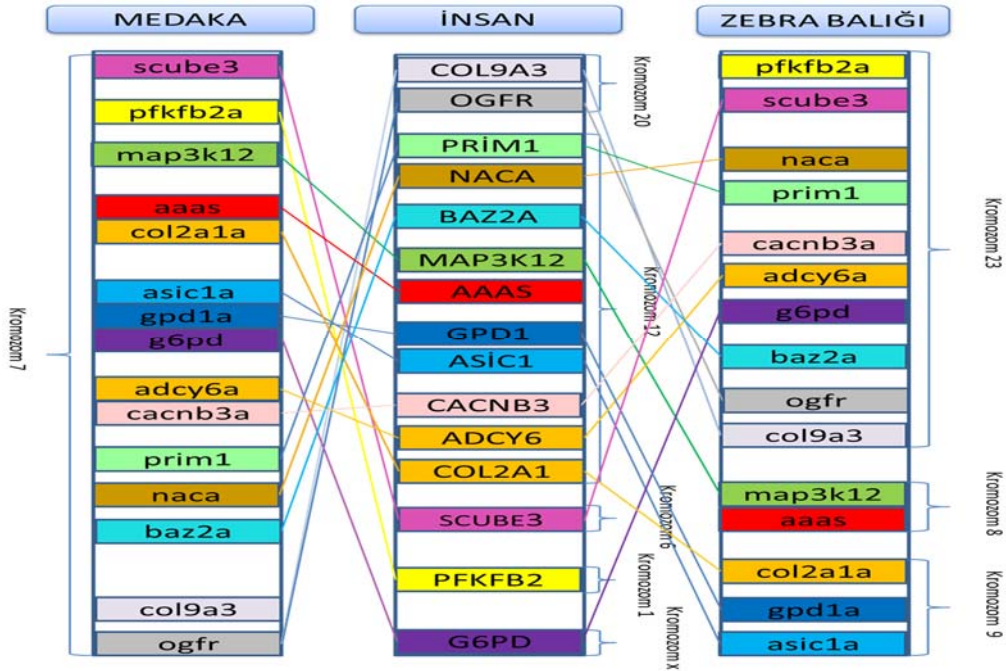
Zb G6pd 463 91 95

Fu G6pd 464 89 95

Te G6pd 480 84 90

In G6PD 465 77 88

\*Şekildeki noktalar benzerliği, kısa çizgiler ise belirlenemeyen aminoasitleri ifade etmektedir.

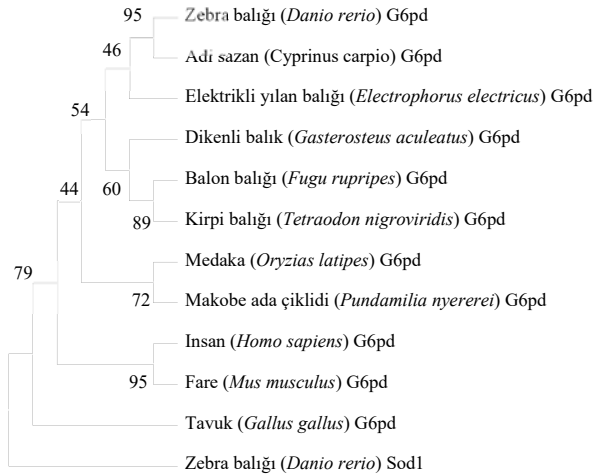


**Şekil 1.** Medaka *g6pd* geni korunmuş gen sentezi.  
**Figure 1.** Conserved gene synteny of Medaka *g6pd* gene.

Oluşturulan korunmuş gen sentezi incelendiğinde, medaka *g6pd* geninin teleost tüm genom duplikasyonu sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Medaka *g6pd* geni ile diğer teleost balıkların ve insanın *g6pd/G6PD* genleri arasındaki korunmuş genlerin medakada 7. kromozomda bulunan *ogfr*, *col9a3*, *ncoa3*,

*prkcbp11*, *prim1*, *baz2a*, *cacnb3a*, *adcya6a*, *gpd1a*, *asic1a*, *scube3*, *col2a1a*, *naca*, *prkfb2a* ve *map3k12* olduğu tespit edilirken; tüm bu genlerin korunmuş olarak insanda (1, 6, 12 ve 12. kromozomlar üzerinde) ve zebra balığında (8, 9 ve 23. kromozomlarda) da bulunduğu görülmüştür. Dolayısıyla medaka *g6pd* geninin korunmuşluk oranın

oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 1). Kemikli balıklarda gerçekleşen tüm genom duplikasyonu sonucunda gen kopyalarının oluştuğu bilinmekle beraber, *g6pd* geninin tek kopya olduğu, bu durumun ise teleost balık genlerinde görülen bir olay olan duplikasyon sonrası gen kopyalarından birinin kaybolduğu düşünülmekte ve korunmuş gen sentezide bu tezimizi desteklemektedir. Medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* geni (ENSORLT00000015543.2) ile omurgalı canlılar olan, zebra balığı (*Danio rerio*), (XP\_021329263.1), balon balığı (*Fugu rupripes*) (XP\_003963491.2), kirpi balığı (*Tetraodon nigroviridis*) (ENSTNIT00000015770.1), makobe ada çiklidi (*Pundamilia nyererei*) (XP\_005732684.1), insan (*Homo sapiens*) (NP\_001035810.1), adi sazan (*Cyprinus carpio*) (XP\_018961996.1), dikenli balık (*Gasterosteus aculeatus*) (ENSGACT00000004022.1), fare (*Mus musculus*) (NP\_032088.1), tavuk (*Gallus gallus*) (XP\_024999465.1), elektrikli yılan balığı (*Electrophorus electricus*) (XP\_026875034.1) *g6pd* genleri arasındaki filogenetik ilişki Mega programı ve maksimum olasılık metodu (Felsenstein, 1989) ile belirlenmiştir. Zebra balığı (*Danio rerio*) *sod1* geni: NP\_571369.1 dış grup olarak kullanılmıştır. Medakanın diğer teleost balıklar ile birlikte kümelenme gösterdiği, insan, tavuk, fare gibi medakanın ortoloğu olan canlıların ise farklı bir bölgede kümelenmediği görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Medaka *g6pd* geni ile diğer teleost balıklar ve medakanın ortologları arasındaki filogenetik ilişki (maksimum olasılık metodu).

Figure 2. Phylogenetic relationship between Medaka and its orthologs *g6pd* gene (Maximum likelihood method)

## SONUÇ

Balıklardaki stres cevapları, farklı gen gruplarının üretmiş olduğu protein veya enzim gibi gen ifade ürünlerinin etkilerini içeren çok yönlü seviyeleri ortaya çıkarabilir. Dolayısıyla strese tepki gösteren bir model

organizma ile ilgili genetik karakteristiklerin anlaşılması moleküler çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Balıkların stres toleransları birbirinden farklı olabildiği için, stres genlerinin ifadesi balıklar arasında farklılık göstermekte ve dolayısıyla bu genlerin karakterizasyonu ve tanımlanması, akvakültür seçim programlarında, stres toleransının geliştirilmesine yardımcı olmak için kullanılabilir önemli veriler olarak kullanılmaktadır. Ayrıca insan başta olmak üzere pek çok omurgalı için bilimsel çalışmalarda model organizma olarak kullanılan medaka'da antioksidan enzim genlerinden biri olan *g6pd*'nin (Iwama et al., 1999) biyoenformatik çalışmalarının tamamlanması önemli genetik belirteçler sağlayacaktır. Bu nedenle, çalışmada biyoenformatik veri tabanları ve programlar kullanarak medaka (*O. latipes*)'da antioksidan enzim genlerinden olan *g6pd*'nin karakterizasyonu ve tanımlanması yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Aytekin, T. & Kargin, F. (2019). Effect of Copper on G6PD Activity in the Liver, Gill, Kidney and Muscle Tissues of *Oreochromis niloticus*. *Anatolian Environment and Animal Sciences*, 4(2), 60-63.
- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M. & Srivastava, P.K. (2000). Necrotic but not apoptotic heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunology*, 12, 1539-1546.
- Bayır, A. (2002). *Canlı (Gammarus pulex) ve Yaş (sığır dalağı) Yemin Gökkuşluğu Alabalığı (Oncorhynchus mykiss) Yavrularına Belirli Aralıklarla Verilmesinin Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz ve Karbonik Anhidraz Enzim Aktiviteleri ile Büyüme, Yem Değerlendirme ve Yaşama Gücü Üzerine Etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum. 154s.
- Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C., & Schirmer, R.H. (2003). Glutathione-functions and metabolism in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Biological Chemistry*, 384, 551-566.
- Buechter, D.D. (1988). Free radicals and oxygen toxicity. *Pharmaceutical Research*, 5(5), 253-260.
- Bonsignore, A., Fornaini, G., Leocini, G., Fontani, A. & Segni, P. (1966). Characterization of leucocyte glucose 6 phosphate dehydrogenase in Sardinian

- Mutants. *Journal of Clinical Investigation*, **45**, 12-16.
- Bonsignore, A., & De Flora, A. (1972).** Regulatory properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Current Topics in Developmental Biology*, **6**, 21-62.
- Filho, W.D., Torres, M.A., Marcon, J.L., Fraga, C.G. & Boveris, A. (2000).** Comparative antioxidant defences in vertebrates-emphasis on fish and mammals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, **7**, 33-45.
- Gromiha, M.M. (2010).** Protein sequence analysis. In: Protein Bioinformatics: From Sequence to Function. Elsevier Inc., New Delhi, India, 29-62p.
- Halliwell, B. (1991).** Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, **91**, 14-22.
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B. & Ackerman, P.A. (1999).** Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoology*, **39**, 901-909.
- Kan, B., London, I.M. & Levin, D.H. (1988).** Role of reversing factor in the inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 15652-15656.
- 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.
- Lehninger, A.L., Nelson D.L. & Cox, M.M. (2000).** *Principles of Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers Inc. New York, 558-560.
- Lushchak, V.I. (2011).** Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, **101**, 13-30.
- Miclet, E., Stoven, V., Michels, P.A., Opperdoe, F.R. & Lallemand J.Y. (2001).** NMR spectroscopic analysis of the first two steps of the pentose-phosphate pathway elucidates the role of 6-phosphogluconolactonase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 34840-34846.
- Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, M., Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M. & Shima, A. (2000).** A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics*, **154**, 1773-1784.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), 2725-2729.
- 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 Research*, **22**, 4673-4680.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R.-D. & Huang, P. (2008).** Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, **10**(8), 1343-1374.
- Pilz, R.B., Willis, R.C. & Boss, G.R. (1984).** The influence of ribose-5-phosphate availability on purine synthesis of cultured human lymphoblasts and mitogen-stimulated lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 2927-2935.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. & Mills, K.A. (1995).** Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, **30**, 277-290.
- Yamamoto, T. (1951).** Artificial sex-reversal in the genotypic males of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Japanese Journal of Genetics*, **26**, 245.