

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LEVREK BALIĞI (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) VİTELLOJEN GENLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Özlem YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LEVREK BALIĞI (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) VİTELLOJEN GENLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Özlem YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniveristesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2009.03.0121.008 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

2013

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEVREK BALIĞI (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) VİTELLOJEN GENLERİNİN
KARAKTERİZASYONU

Özlem YILMAZ

DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 19/03/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sadi KÖKSOY (Danışman)

Prof. Dr. Uğur YAVUZER

Prof. Dr. Ramazan İKİZ

Yrd. Doç Dr. Mehmet ÖZBAŞ

Yrd. Doç. Dr. Gülşen ULUKÖY

ÖZET

LEVREK BALIĞI (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) VİTELLOJEN GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Özlem YILMAZ

Doktora Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sadi KÖKSOY

Mart 2013, 136 sayfa

Bu çalışmada, levrek (*Dicentrarchus labrax*) balığında üç ayrı vitellojeni kodlayan cDNA dizileri elde edilmiştir. Yumurta sarısı protein alt birimlerinin hepsini taşıyan iki çeşit vitellojen, günümüzde geçerli olan adlandırma kullanılarak VtgAa ve VtgAb olarak tanımlanmıştır. Fosvitinden yoksun, daha kısa bir cDNA ile kodlanan ve kesilmiş bir C-ucu bölgesine sahip olan ‘eksik’ (incomplete) bir diğer vitellojen formu ise VtgC olarak tanımlanmıştır. Levrek vitellojen cDNA dizilerinden elde edilen tahmini peptid dizilerinin, diğer teleost türlere ait dizilerle ve birincil protein yapılarıyla yapılan kıyaslamalar sonucu, bu diziler kesin olarak levrek vitellojenleri; SbsVtgAa, SbsVtgAb ve SbsVtgC olarak tanımlanmışlardır. Her bir vitellojenin dişi ve 17 β -estradiol ile uyarılmış olan erkek kan plazmasındaki ve ovaryumdaki varlığı, kefal (*Mugil cephalus*) lipovitellinlerine karşı geliştirilmiş olan vitellojen formuna özgün antikolar kullanılarak Western blot analizi ile ortaya konmuştur. Bu yöntem yardımıyla, ayrıca üç farklı vitellojenden türemiş yumurta sarısı protein alt birimlerinin büyüme tamamlamış (postvitellojenik) ve ovulasyona uğramış yumurtadaki varlığı da belirlenmiştir. Postvitellojenik ve ovulasyon aşamalarındaki ovaryum ekstraktlarının Western blot analiz sonuçlarının karşılaştırmaları, her üç çeşit vitellojenden türemiş lipovitellinlerin oosit olgunlaşması sırasında kısmi bir proteolize uğradığını göstermiştir. Her üç vitellojen ve bunların türevi yumurta sarısı protein ürünlerinin, oosit büyümesini tamamlamış postvitellojenik dişilere ait karaciğer, plazma ve ovaryumdaki miktarları ve birbirlerine göre oranları, işaretli niceliksel kütle spektrometrisi ile belirlenmiştir. Normalize edilmiş spektra sayılarına dayanarak VtgAa

ve VtgAb'nin levrekte bulunan baskın vitellojen formları oldukları ve VtgAb'nin analiz edilen örnek tipine göre VtgAa'dan 2 ila 5 kat arasında daha yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Karaciğer ve plazmada genel olarak düşük seviyelerde bulunan VtgC ortalama spektra sayısının, ovaryumda diğer dokulara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca ovaryumda VtgC miktarının, VtgAa ve VtgAb'den sırasıyla yalnızca 0.5 ila 3.0 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, diğer acantomorph teleostlarda bilinen çoklu vitellojen sisteminin levrekte de var olduğu belirlenmiştir. Ayrıca burada, söz konusu sistemin önemli bir parçası olan vitellojenlerin her üç formunun da gelişmekte olan oosit ve yumurtalarda, yumurta sarısı protein depolarına önemli katkıları olduğu ortaya konmuştur. Levrekte bu konuda yapılan ilk çalışmanın ürünü olan bu bulgular, su ürünleri sektöründe yetiştiriciliğe uygun türlerin yumurta kalitesi ve başta vitellogenez olmak üzere, oogenez sürecinde gerçekleşen olaylar dizini üzerine yapılacak moleküler ve fonksiyonel çalışmalara temel oluşturacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: Levrek, *Dicentrarchus labrax*, Ovaryum, Oosit, Teleost, Oogenez, Vitellojen, Yumurta sarısı

JURİ: Doç. Dr. Sadi KÖKSOY (Danışman)

Prof. Dr. Uğur YAVUZER

Prof. Dr. Ramazan İKİZ

Yrd. Doç. Dr. Gülşen ULUKÖY

Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZBAŞ

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF VITELLOGENIN GENES in EUROPEAN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*)

Özlem YILMAZ

PhD in Fisheries Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sadi KÖKSOY

March 2013, 136 pages

Complete cDNA sequences encoding three different vitellogenin genes were obtained for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Two cDNAs encoding vitellogenins with a full suite of yolk protein domains were identified as sea bass VtgAa and VtgAb using the current nomenclature for multiple teleost vitellogenins. A shorter cDNA encoded an “incomplete” vitellogenin lacking a phosphotin domain and having an abbreviated C-terminus that was identified as sea bass VtgC. Alignments of the deduced vitellogenin peptide sequences with those from other teleosts, and similar comparisons of primary vitellogenin structures, allowed definitive identification of sea bass VtgAa, VtgAb and VtgC. The existence of each form of vitellogenins in the blood plasma, and of their product lipovitellin-derived yolk proteins in oocytes or eggs, was verified via Western blotting performed using vitellogenin type-specific antisera raised against grey mullet (*Mugil cephalus*) lipovitellins, which also detected all three forms of vitellogenins in plasma from males injected with estradiol-17 β . Comparisons of ovary extracts from postvitellogenic and ovulated females via Western blotting revealed that the lipovitellins derived from all three forms of vitellogenins undergo partial proteolysis during oocyte maturation. The peptide abundance and the proportional ratio of the three vitellogenins or their yolk protein products present in liver, plasma and ovary was evaluated in postvitellogenic females just completing oocyte growth via label free quantitative mass spectrometry. Based on normalized spectral counts, VtgAa and VtgAb are the dominant types of vitellogenin in sea bass, with VtgAb spectra being from 2- to 5-fold more abundant than VtgAa spectra

depending on the sample type. The VtgC spectra were generally very limited, except in ovary, where they were only 0.5- to 3.0-fold lower in abundance than for VtgAa and VtgAb, respectively. This first report on the multiple vitellogenin system of *D. labrax* shows that all three forms of vitellogenin described for acanthomorph teleosts are produced by this species and that each type of vitellogenin contributes significantly to the store of yolk proteins deposited in growing oocytes and eggs. These findings set the stage for functional studies of the molecular details of vitellogenesis underlying oogenesis and egg quality in this important aquaculture species.

KEYWORDS: Sea bass *Dicentrarchus labrax*, Ovary, Oocyte, Teleost, Oogenesis, Vitellogenin, Yolk

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Sadi KÖKSOY (Supervisor)

Prof. Dr. Uğur YAVUZER

Asst. Prof. Dr. Mehmet ÖZBAŞ

Prof. Dr. Ramazan İKİZ

Asst. Prof. Dr. Gülşen ULUKÖY

ÖNSÖZ

Günümüzde dünya genelinde artan nüfusa bağlı olarak sağlıklı ve ucuz maliyetli protein kaynağı arayışı sürmektedir. Su ürünleri, besleyici ve doyurucu özellikleri ve yüksek doymamış yağ oranı seviyeleri ile insan beslenmesinde vazgeçilmez bir protein kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenle, su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe son yıllarda inanılmaz bir üretim artışı ve teknolojik gelişimler gözlenmektedir. Ancak, mevcut üretim miktarları henüz pazarlardaki yoğun talebi karşılamaya yeterli değildir. Akdeniz’de yoğun olarak üretilen su ürünlerinden bazı balık türlerinin, yaşam döngüleri tamamen çözülmüş olsa da bu türlerin ürün miktarını ve kalitesini önemli oranda etkileyen üreme ve döl gelişimi aşamalarındaki pürüzler henüz giderilebilmiş değildir.

Bu çalışma planlanırken, yüksek yumurta kalitesinin bağlı olduğu oosit, yumurta, embriyo ve larva gelişimi boyunca hayati görevler taşıyan vitellojenlerin yapı ve fonksiyonlarının detaylı olarak incelenmesi hedeflenmiştir. Burada ayrıca, bu proteinlerin yumurta gelişiminin iki farklı evresinde kan plazmasında ve ovaryumdaki varlığı, miktarları ve birbirlerine oranlarının tespiti amaçlanmıştır. Bütün bu hedeflerin gerçekleştirilmesinde, son derece gelişmiş genomik, proteomik, moleküler ve immünobiyokimyasal yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla, Akdeniz Üniversitesi (Antalya), Torre la Sal Su Ürünleri Enstitüsü (Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, IATS (CSIC), Castellon de la Plana, Espana) ve North Carolina State Üniversitesi (North Carolina State University, NCSU, Raleigh, U.S.A.)’nde bulunan farklı laboratuvarların imkanlarından ve iş birliği içerisinde olduğumuz araştırma gruplarının bilimsel ve ekonomik desteğinden faydalanılmıştır. Vitellojenlerin, üreme döngüsü içerisindeki rol ve davranışları üzerine ileride yapılabilecek, bütüncü nitelikte olan, potansiyel çalışmalara zemin oluşturan bulgularımız, su ürünleri yetiştiriciliğine uygun teleost türlerin üreme fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasına ve gonad gelişimi sırasında gerekli yerlerde bilinçli müdahaleler yapılmasına olanak tanıyacaktır. Sonuç olarak bu çalışmalar bütünü, su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe ürün miktarını ve kalitesini olumlu etkileyecek, dünyaya sağlıklı besin kaynağı teminine çözüm getirecek, dolayısıyla ekonomiye katkıda bulunacak gelişmelere temel oluşturacaktır.

Bana bu konuda çalışma olanağı tanıyan ve çalışmanın her aşamasında sonsuz güven, yardım ve desteklerini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Sadi KÖKSOY'a (Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Antalya), yorum ve önerileri ile çalışmanın yönlendirilmesi ve şekillenmesinde önemli katkıları olan tez izleme komitesi ve tez savunması jürisi üyeleri Sayın Prof. Dr. Uğur YAVUZER'e (Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Antalya) ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZBAŞ'a (Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Antalya), tez savunması jürisi diğer üyeleri Sayın Prof. Dr. Ramazan İKİZ'e (Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Antalya) ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülşen ULUKÖY'e (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Muğla), çalışmaya 'Levrek Balığı (*Dicentrarchus Labrax* L. 1758) Vitellojen Genlerinin Karakterizasyonu' projesi kapsamındaki maddi katkılarından dolayı Akdeniz Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, çalışmanın ilk deneme kısmında balık temini, bakımı ve denemenin yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü (AKSAM) müdürü Sayın Doç. Dr. Yılmaz EMRE ve enstitü çalışanlarına, çalışmanın ilk kısmının gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarını kullanmama olanak tanıyan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (SBAUM) yönetimine, çalışmanın projelendirilmesi, ve moleküler biyoloji üzerine teknik eğitimimdeki katkılarından dolayı Sayın Dr. Francisco PRAT'a (Instituto de Ciencias Marinas de Andalucia, CSIC, Cadiz, Espana), örnek ve veri teminindeki yardımlarından dolayı Sayın Dr. Antonio Jose IBÁÑEZ'e (Universidad de Valencia, Session de Microscopia Electronica y Confocal, Valencia, Espana), çalışmanın büyük bir kısmının NCSU'nde gerçekleştirilebilmesi için burs katkılarından dolayı Türkiye Fulbright Komisyonu'na, son olarak da çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde, NCSU laboratuvarları ve her türlü imkanlarını kullanmamda, çalışmanın bir yıllık araştırma giderlerinin tamamının karşılanmasında, moleküler biyoloji, proteomik ve genomik konularda teknik ve entelektüel eğitimimde, verilerin değerlendirilmesi ve tez yazımında, ayrıca A.B.D.'nde bulunduğum süre içerisinde bilimsel ve kişisel her konuda sonsuz desteğini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Craig V. SULLIVAN (William Neal Reynolds Distinguished Professor, North Carolina State University, Biology Department, Raleigh, U.S.A.)'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

| | |
|--|----|
| 3.4. Levrekte Üç Farklı Vitellojen Formunu Kodlayan cDNA Tam Dizilerinin Ortaya Konması | 37 |
| 3.4.1. PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması | 37 |
| 3.4.2. PCR ürünlerinin klonlanması ve sekanslanması | 41 |
| 3.5. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Kan Plazmasında ve Ovaryumda SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemleri ile Saptanması | 51 |
| 3.6. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Postvitellojenik Dişi Karaciğer, Plazma ve Ovaryumundaki Miktarlarının Kütle Spektrometre Analizi ile Saptanması..... | 54 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA | 57 |
| 4.1. Karaciğerde Vitellojen Sentezinin Estradiol ile Tetiklenmesinin Kütle Spektrometre Analizi ile Kontrolü | 57 |
| 4.2. Levrek Vitellojenleri cDNA Nükleotid Dizileri ve Poliadenilasyon Kodonları | 59 |
| 4.2.1. Nükleotid dizileri | 59 |
| 4.2.2. Poliadenilasyon kodonları | 71 |
| 4.3. Levrek Vitellojenleri cDNA Dizilerinden Türetilmiş Birincil Polipeptid Dizileri, Alt Birim Yapıları ve Homoloji Analizleri | 71 |
| 4.4. Levrek Vitellojenleri Sinyal Peptidleri ve Bunların Ayrışma Bölgeleri | 76 |
| 4.5. Levrek Vitellojenleri Türevi Yumurta Sarısı Proteinleri ve Bunların Birincil Enzimatik Ayrışma Bölgeleri | 78 |
| 4.6. Levrek ‘Tam’ Vitellojenlerine Ait Fosvitin Alt Birimleri, Fosforilasyon ve Glikolizasyonu | 82 |
| 4.7. Levrek ‘Tam’ Vitellojenlerine Ait β 'c ve Ct Alt Birimleri | 84 |
| 4.8. Levrek Vitellojenlerinin Amino Asit Kompozisyonları | 86 |
| 4.9. Levrek Vitellojenleri Ağır Zincirli Lipovitellinlerinde Reseptör Bağlanma Bölgeleri | 89 |
| 4.10. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Kan Plazmasında ve Ovaryumda SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemleri ile Saptanması | 92 |
| 4.10.1. Levrek vitellojenlerinin immünoyokimyasal özellikleri | 94 |

| | |
|--|-----|
| 4.10.2. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin kan plazmasında saptanması | 97 |
| 4.10.3. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin ovaryumda saptanması | 100 |
| 4.11. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Postvitellojenik Dişi Karaciğer, Plazma ve Ovaryumundaki Miktarlarının Kütle Spektrometre Analizi ile Saptanması | 105 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER | 118 |
| 6. KAYNAKLAR | 121 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Teleostlarda oosit büyümesi, olgunlaşması ve ovulasyonun temel aşamaları | 8 |
| Şekil 2.2. Vitellojen üretiminin östrojen ile uyarılması, oosit içerisine reseptör-kontrollü endositoz ile alınması ve katepsin D tarafından yumurta sarısı proteinlerine ayrıştırılması | 14 |
| Şekil 2.3. Vitellojenlerin oosit içerisine alınması ve vitellojen türevi yumurta sarısı proteinleri | 16 |
| Şekil 3.1. Karaciğerde vitellojen sentezinin estradiol ile tetiklenmesinin kütle spektrometre analizi ile kontrolü..... | 36 |
| Şekil 3.2. Levrek vitellojen cDNA tam dizilerinin ortaya konmasında kullanılan yöntemler | 40 |
| Şekil 3.3. Levrek vitellojenlerine (SbsVtgAa, SbsVtgAb ve SbsVtgC) ait tam cDNA dizilerinin elde edilmesinde kullanılan strateji | 47 |
| Şekil 3.4. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin kan plazmasında ve ovaryumda SDS-PAGE ve Western blot yöntemleri ile saptanması | 53 |
| Şekil 3.5. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin postvitellojenik dişi karaciğer, plazma ve ovaryumundaki miktarlarının kütle spektrometre analizi ile saptanması | 56 |
| Şekil 4.1. Karaciğerde vitellojen sentezinin estradiol ile tetiklenmesinin kütle spektrometre analizi ile kontrolü | 58 |
| Şekil 4.2. Levrek VtgAa amino asit dizilerinin (SbsVtgAa) beyaz levrek VtgAa amino asit dizileriyle (WpVtgAa) karşılaştırılması | 62 |
| Şekil 4.3. Levrek VtgAb amino asit dizilerinin (SbsVtgAb) beyaz levrek VtgAb amino asit dizileriyle (WpVtgAb) karşılaştırılması | 65 |
| Şekil 4.4. Levrek VtgC amino asit dizilerinin (SbsVtgC) beyaz levrek VtgC amino asit dizileriyle (WpVtgC) karşılaştırılması | 68 |
| Şekil 4.5. Farklı teleost türlerine ait vitellojenler arasında polipeptid dizilerin karşılaştırmasına dayanarak oluşturulmuş Clustal-W ilişki şeması | 74 |
| Şekil 4.6. <i>Moronidae</i> vitellojenlerinde yumurta sarısı proteinleri tahmini ayrışma bölgeleri | 79 |
| Şekil 4.7. Levrekte üç farklı vitellojen formuna ait amino asit kompozisyonları | 88 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.8. Bu çalışmada kullanılan dişi levreklerin kan plazmasındaki 17 β -estradiol seviyeleri ve ovaryum histolojik kesit görüntüleri | 93 |
| Şekil 4.9. Levrek vitellojen formları için yumurta sarısı protein alt birimleri yapısının şematik gösterimi | 96 |
| Şekil 4.10. Levrek vitellojenlerinin dişi ve estradiol ile uyarılmış erkek kan plazmasında SDS-PAGE ve Western blot yöntemleri ile saptanması | 99 |
| Şekil 4.11. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin ovaryumda SDS-PAGE ve Western blot yöntemleri ile saptanması | 104 |
| Şekil 4.12. Postvitellojenik dişi levrek karaciğer, plazma ve ovaryumunda kütle spektrometre analizi ile tespit edilmiş olan VtgAa, VtgAb ve VtgC'ye ait triptik peptidlerin ters Log transformasyonu gerçekleştirilmiş spektra sayıları | 109 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|-----|
| Çizelge 3.1. Bu çalışmada farklı deneysel prosedürlerde kullanılan örnekler | 33 |
| Çizelge 3.2. Bu çalışmada kullanılan primer isimleri ve nükleotid dizileri | 44 |
| Çizelge 3.3. Çizelge 3.2.'de verilen primerler kullanılarak elde edilen cDNA ürünlerinin büyüklükleri ve <i>vfg</i> tam nükleotid dizileri üzerindeki pozisyonları | 48 |
| Çizelge 4.1. Levrek vitellojenlerine ait yumurta sarısı protein temel alt birimleri için nükleotid ve peptid dizi pozisyonları ve büyüklükleri | 61 |
| Çizelge 4.2. Levrek vitellojenlerinin <i>Moronidae</i> familyasından diğer türlerle özdeşlik ve benzerlik karşılaştırması | 73 |
| Çizelge 4.3. Karşılaştırmalı souçlarda kullanılan türlerin taksonomik bilgileri, vitellojen GenBank numaraları ve kaynak bilgileri | 75 |
| Çizelge 4.4. Levrek vitellojenlerine ait sinyal peptid dizilerinin diğer türlerle karşılaştırılması | 77 |
| Çizelge 4.5. Levrek vitellojenleri reseptör bağlanma bölgelerinin diğer teleost türlerindeki bölgelerle karşılaştırması | 91 |
| Çizelge 4.6. Postvitellojenik dişi levrek karaciğer, plazma ve ovaryumunda kütle spektrometre analizi ile tespit edilen triptik peptidler | 106 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|---------|-----------------------|
| °C | santigrat derece |
| µl: | mikrolitre |
| µm: | mikrometre |
| aa: | amino asit |
| bç: | baz çifti |
| dk: | dakika |
| g: | gram |
| kDa: | kilodalton |
| kg: | kilogram |
| L: | litre |
| M: | molar |
| mg: | miligram |
| ml: | mililitre |
| mm: | milimetre |
| mM: | milimolar |
| r.p.m.: | dakikada dönüş sayısı |
| sn: | saniye |
| V: | volt |

Kısaltmalar

| | |
|--------------------|---|
| 17β-E ₂ | 17β-Estradiol |
| β'c: | β'-component |
| AA: | Araşidonik asit |
| Acr: | Akrilamid (Acrylamide) |
| AKSAM: | Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü |
| APS: | Amonyum persülfat (Ammonium persulphate) |
| Aqp1b: | Aquaporin |
| Bar: | <i>Verasper moseri</i> (barfın flounder) |

| | |
|------------|---|
| BPG: | Beyin-Hipofiz-Gonad eksenini (Brain-Pituitary-Gonad) |
| BSA: | Sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin) |
| BME: | β -merkaptöetanol (β -mercaptoethanol) |
| BLAST: | Basic Local Alignment Search Tool |
| Cat: | Katepsin |
| cAMP: | Siklik adenozin monofosfat |
| CBB: | Comassie parlak mavi (Comassie Brilliant Blue) |
| cDNA: | Komplementer deoksiribonükleik asit |
| CFTR, CLC: | Klorid pompası |
| Ct: | Ct-component |
| COOH: | Karboksil grubu |
| CP: | Estradiol ile uyarılmamış kontrol levrek plazması (Control Plasma) |
| CSIC: | Bilimsel Araştırmalar Üst Kurulu (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) |
| dNTPs: | Deoksiribonükleotid trifosfat (Deoxyribonucleotide triphosphates) |
| ECF: | Hücre dışı sıvı (Extracellular Fluid) |
| EGF: | Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor) |
| EIA: | Enzime dayalı immünolojik yöntem (Enzyme Immunoassay) |
| ERE: | Östrojen yanıt elementleri (Estrogen Response Elements) |
| EtBr: | Etidyum bromür (Ethidium Bromide) |
| F: | Forward primer |
| FAA: | Serbest amino asitler (Free Amino Acids) |
| FAO: | Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (Food and Agriculture Organization of the United Nations) |
| FFA: | Serbest yağ asitleri (Free Fatty Acids) |
| FSH: | Folikül uyarıcı hormon (Follicle Stimulating Hormone) |
| Fun: | <i>Fundulus heteroclitus</i> (mummichog) |
| Gamb: | <i>Gambusia affinis</i> (mosquitofish) |
| GJ: | Hücreler arası bağlantılar (Gap Junctions) |

| | |
|---------------------|---|
| GnRH: | Gonadotropin salgısını tetikleyici hormon (Gonadotropin Releasing Hormone) |
| GSL: | Genomik Bilimler Laboratuvarı (Genomic Science Laboratory) |
| GVBD: | Geminal vezikül ayrılması (Geminal Vesicle Breakdown) |
| Had: | <i>Melanogrammus aeglefinus</i> (haddock) |
| I: | Inner primer |
| IATS: | Torre la Sal Su Ürünleri Enstitüsü (Instituto de Acuicultura de Torre la Sal) |
| ICMAN: | Andalucia Deniz Bilimleri Araştırma Entitüsü (Instituto de Ciencias del Mar de Andalucia) |
| IGF: | İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin like Growth Factor) |
| IP: | Estradiol ile uyarılmış levrek kan plazması (Induced Plasma) |
| LC-ESI/MS/MS: | Sıvı kromatografi-Elektropüskürtme İyonizasyon-Kütle Spektrometre Yöntemi (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry) |
| LDLR: | Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (Low Density Lipoprotein Receptor) |
| LH: | Lüteinleştirici hormon (Luteinizing hormone) |
| LPR: | Lipoprotein reseptörü (Lipoprotein Receptor) |
| Lv: | Lipovitellin |
| LvH: | Ağır zincirli lipovitellin (Heavy Chain Lipovitellin) |
| LvL: | Hafif zincirli lipovitellin (Light Chain Lipovitellin) |
| MgCl ₂ : | Magnezyum klorür (Magnesium Chloride) |
| MIH: | Olgunlaşmayı uyarıcı hormon (Maturation Inducing Hormone) |
| mMIHR: | Olgunlaşmayı uyarıcı hormon membran reseptörü (Membrane Receptor of Maturation Inducing Hormone) |
| mRNA: | Mesajcı RNA (Messenger RNA) |
| MVB: | Multiveziküler yapı (Multiple Vesicular Body) |
| N-: | N-bağlı glikolizasyon bölgesi |
| NCSU: | North Carolina State Üniversitesi (North Carolina State University) |
| NCBI: | National Center for Biotechnology Information |

| | |
|-------------------|---|
| NH ₂ : | Amino grubu |
| nMIHR: | Olgunlaşmayı tetikleyici hormon nükleer reseptörü (Nuclear Receptor of Maturation Inducing Hormone) |
| NSAF: | Normalized Spectral Abundance Factor |
| N-SC: | Normalize spektra sayıları (Normalized Spectral Counts) |
| O-: | O-bağlı glikolizasyon bölgesi |
| O: | Outer primer |
| ORF: | Kodlanmış bölge (Open Reading Frame) |
| OV: | Ovulasyona uğramış gonad (Ovulated Gonad) |
| qPCR: | kantitatif PCR (Quantitative PCR) |
| qTRAP LC/MS/MS: | Dört kutuplu doğrusal iyon kapanı-sıvı kromatografi- kütle spektrometre yöntemi |
| PAS: | Poliadenilasyon signal bölgesi (Polyadenylation signal) |
| PBST: | Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline Tween) |
| PCR: | Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) |
| PGC: | Kök germ hücreleri (Primordial Germ Cells) |
| PGO: | Birincil oosit (Primary Growth Oocyte) |
| PI3-K: | Fosfatidilinositol 3-kinaz |
| PKA: | Protein kinaz A |
| PKC: | Protein kinaz C |
| Pv: | Fosvitin (Phosvitin) |
| PV: | Postvitellojenik (Postvitellogenic) |
| PVDF: | Poliviniliden diflorid (Polyvinylidene difluoride) |
| R: | Reverse primer |
| RACE PCR: | cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends PCR) |
| RNA: | Ribonükleik asit (Ribonucleic acid) |
| RNaz: | RNA ayrıştırıcı enzim (RNA degrading enzyme) |
| rRNA: | Ribozomal RNA |
| Rsb: | <i>Pagrus major</i> (mercan; red seabream) |
| SBAUM: | Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi |

| | |
|---------------|---|
| Sbs: | Levrek (sea bass) |
| SDS: | Sodyum dodesil sülfat (Sodium Dodecyl Sulphate) |
| SDS-PAGE: | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulphate Gel Electrophoresis) |
| Stb: | Çizgili levrek (striped bass) |
| TEMED: | Tetrametiletilediamin (Tetramethylethylenediamine) |
| TGF: | Transformasyona neden olan büyüme faktörü (Transforming Growth Factor) |
| Tm: | Ayrılma sıcaklığı (Melting Temperature) |
| UTR: | Kodlanmamış bölge (Untranslated Region) |
| vH1, vATPaz: | Vakuolar ATPaz proton pompası (Vacuolar ATPase Proton Pump) |
| VLDL: | Çok düşük yoğunluklu lipovitellinler (Very Low Density Lipoproteins) |
| <i>vtg</i> : | Vitellogen (gen) |
| Vtg: | Vitellogen (protein) |
| <i>vtgr</i> : | Vitellogen reseptör geni |
| VtgR: | Vitellogen reseptörü (protein) |
| VWFD: | Von Willerbrand Faktör D |
| xPR: | Xenopus progesteron reseptörü (Xenopus Progesterone Receptor) |
| WAT: | Beyaz adipöz doku (White Adipose Tissue) |
| WGD: | Tüm genom duplikasyonu (Whole Genome Duplication) |
| Wp: | Beyaz levrek (white perch) |
| YGP: | Plazma yumurta sarısı glikoproteinleri (Plasma Yolk Glycoproteins) |
| YP: | Yumurta sarısı proteinleri (Yolk Proteins) |

1. GİRİŞ

Omurgalılarda yumurta sarısı proteinleri (YP) öncül maddesi olan vitellojen (Vtg), 17β -Estradiol (17β -E₂) uyarısı altında hepatositlerde sentezlenen ve oositlere taşınmak üzere kan dolaşım sistemine salgılanan, yüksek moleküler ağırlığa sahip dimerik yapıda bir glikofosfolipoproteindir (Wallace 1985, Mommsen ve Walsh 1988, Specker ve Sullivan 1994, Patiño ve Sullivan 2002, Babin vd 2007, Lubzens vd 2010). Oosit içerisine reseptör kontrollü endositoz yoluyla alınan Vtg'ler, proteolitik enzimlerce canlı türüne ve Vtg tipine göre aralarında lipovitellin (Lv), fosvitin (Pv), β '-component (β 'c), C-ucu peptid (Ct) ve çeşitli Lv-Pv komplekslerinin bulunduğu YP ürünlerine ayrıştırılırlar (Matsubara vd 2003, Romano vd 2004, Hiramatsu vd 2002d, 2005, 2006, Finn vd 2007ab, Reading ve Sullivan 2011). Bir ağır (LvH) ve bir de hafif (LvL) zincirden oluşan Lv, Vtg'den türemiş YP'ler arasında en büyük alt birim olarak yüksek oranda lipid barındırmaktadır. Lipovitellinler hayati önem arz eden diğer birçok görevinin yanısıra bu lipidleri (teleostlarda genellikle fosfolipid olarak) oosite iletmek gibi bir işleve de sahiptir (Romano vd 2004). Yüksek miktarlarda ve çoğunluğu fosforile olan serin rezidüleri taşıyan kısa Pv alt birimi ise bu fosforilasyon sayesinde Vtg molekülününün lipid yüklenmesi sırasında stabilizasyonunu sağlamakla sorumludur. Fosvitin ayrıca, yoğun hidrofobik yapısına rağmen Vtg'nin kan dolaşımındaki çözünürlüğünü artırır (Finn vd 2007b) ve de kalsiyum gibi metabolik fonksiyonlara sahip iyonları bağlayarak oosit içerisine taşır. Bunların dışında, β 'c ve Ct alt birimleri yüksek oranda korunmuş olan tekrarlanmış sistein rezidü motifine sahip olup, insanda Von Willerbrand Faktör D (Von Willerbrand Factor; VWFD) olarak bilinen büyük bir proteinin ayrışma ürünleri olarak ortaya çıkarlar. Bu homolojiye ve VWFD alt biriminin Vtg üzerindeki konumuna dayanarak, bu birimin Vtg'nin kandaki çözünebilirliğine ve dimerik yapının stabilizasyonuna yardımcı olduğu, Vtg'nin hücresel düzeyde tanınması ve reseptöre bağlanmasında rol aldığı, ayrıca Vtg ve YP alt birimlerini zamansız proteolizlerden koruduğu öne sürülmüştür (Finn vd 2007b).

Sadece tek bir Vtg teleost formunun temel YP'lerine ayrıştırıldığı savunan 'Tekli Vtg model' son yıllardaki gen klonlama ve diğer immünobiyokimyasal analizlerin kullanıldığı pek çok çalışmayla güncelliğini yitirmiştir. Söz konusu çalışmalar, balıklarda birden fazla Vtg formunun oosit, embriyo ve larva gelişimi

sırasında büyük öneme sahip yeni bir ‘Çoklu Vtg model’in varlığı öne sürülmüştür (Reith vd 2001, Hiramatsu vd 2002de, 2005, Matsubara vd 2003, Sawaguchi vd 2005a, 2006, Amano vd 2007ab, Finn ve Kristoffersen 2007, Kolarevic vd 2008, Kristoffersen vd 2009, Reading vd 2009). Günümüzde kullanılan Vtg sınıflandırma ve adlandırması omurgalı evrimsel gelişimi boyunca gerçekleşen tüm genom duplikasyonu (Whole Genome Duplication; WGD) ve soya özgü gen duplikasyonu (Lineage Specific Gene Duplication) temeline dayanarak çoklu Vtg formlarını kapsayacak şekilde Finn ve Kristoffersen (2007) tarafından geliştirilmiştir. Bu sisteme göre omurgalı Vtg’lerinin atası, taşemenlerde (lamprey; *Petromyzontiformes*) bulunan VtgABCD, mersin balıklarında (chondrosotean), amfibilerde ve kuşlarda bulunan VtgAB ve VtgCD’yi meydana getirmektedir. Bunun sonucunda VtgAB, teleostlarda ortak olan VtgA’yı ve günümüzde soyu tükenmiş olan VtgB’yi, VtgCD ise farklı filogenetik soydan gelen teleostlarda ortak olan VtgC ve günümüzde soyu tükenmiş olan VtgD’yi oluşturmaktadır. Son olarak VtgA, acantomorph teleostlarda yaygın olarak bulunan ve farklı fonksiyonları olduğu varsayılan iki paralog form VtgAa ve VtgAb’yi oluşturmaktadır (Matsubara vd 2003, Hiramatsu vd 2006, Finn ve Kristoffersen 2007, Reading ve Sullivan 2011). Teleost Vtg’leri, yapılarını oluşturan beş temel YP alt birimini (ağır zincirli lipovitellin (LvH), fosvitin (Pv), hafif zincirli lipovitellin (LvL), β ’component (β ’c) ve Ct-component (Ct)) taşıyıp taşıyamalarına göre genel olarak ‘tam’ (complete) veya ‘eksik’ (incomplete) formlar olarak sınıflandırılırlar. Çoğu deniz balığı dahil olmak üzere acanthomorph teleostlarda iki ‘tam’ Vtg formu olan VtgAa ve VtgAb, bütün YP alt birimlerini bulundururken hemen her türde bulunan ve ‘eksik’ bir Vtg formu olan VtgC, Pv alt biriminden yoksundur. Fosvitinsiz Vtg olarak da bilinen VtgC ayrıca kesilmiş bir C-ucuna sahip olup temelde sadece LvH-LvL kompleksi halinde bulunur (Patiño ve Sullivan 2002, Hiramatsu vd 2002cd, 2005, 2006, Finn 2007b, Reading ve Sullivan 2011).

Vitellojen yan ürünleri olan YP’leri daha sonraki aşamalarda oosit olgunlaşması ve/veya embriyo ve larva beslenmesinde hayati görevleri yerine getirmek üzere ooplazma içerisinde depolanırlar. Yüzebilme yeteneğine sahip (pelajik) yumurtalar bırakan deniz balıklarında olduğu gibi salmonidlerde de Vtg’ler oosit içerisine alındıktan sonra ooplazmada şekillenen multiveziküler yapılara katılırlar. Burada

bulunan lizozomal endopeptidazlardan katepsinler, bu moleküllerin hücre içerisinde YP'lerine ayrıştırılmalarından sorumludurlar (Hiramatsu vd 2002c, Carnevali vd 1999ab, 2006). Büyük Vtg molekülleri, oosit içerisinde büyüme dönemi boyunca YP'lerine ayrıştırıldıkları bu birincil bir proteolizin yanı sıra, oosit olgunlaşması döneminde, söz konusu YP alt birimlerinin serbest amino asitler (Free Amino Acids; FAA)'e ayrıştırıldığı ikinci bir proteolize uğrarlar. Bu ikincil proteoliz ürünü FAA'lerin, pleajik yumurtalar bırakan pek çok türde, yumurtanın uygun yüzebilirliği kazanabilmesi için oosit hidrasyonuna yardımcı önemli bir ozmotik etken olduğu bildirilmiştir (Cerdá vd 2007). Bu FAA'ler ayrıca, gelişmekte olan embriyoya besin kaynağı olarak da görev yaparlar (Thorsen ve Fyhn 1996, Matsubara vd 1999, 2003, Finn vd 2002ab, Ohkubo vd 2006, Finn ve Krisofferson, 2007, Finn ve Fyhn 2010). Pelajik yumurtalar bırakan deniz teleostlarında VtgAa ve VtgAb'den türeyen LvHAb dışındaki bütün YP alt birimlerinin, oosit olgunlaşması sırasında FAA'lere ayrıştığı bilinmektedir. Buna karşın LvHAb yapısının, oosit olgunlaşması boyunca büyük oranda bozulmamış halde kaldığı ve geç larval dönemde besin kaynağı olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Matsubara vd 1999, 2003, Finn vd 2002b, Finn 2007ab, Kolarevic vd 2008). Ayrıca farklı sınıflardan birçok teleost üzerine yapılmış diğer çalışmalarda, VtgC'nin oosit büyümesi ve olgunlaşması aşamalarında proteolitik olarak YP alt birimlerine ayrışmadığı veya bu ayrışmanın çok düşük seviyelerde olduğu, VtgC lipoproteinlerinin ise ozmotik olarak aktif FAA havuzuna katılmadan bütün halde kalarak, geç larval dönemde besin kaynağı olarak kullanıldığı belirlenmiştir (Shimizu vd 2002, Okhubo vd 2003, Sawaguchi vd 2005ab, 2006, Reading vd 2009, Reading ve Sullivan 2011).

Deniz levreği (*Dicentrarchus labrax* [*Morone labrax*], Linnaeus 1758), Akdeniz ve Atlantik kıyılarında dağılım gösteren *Perciformes* takımı, *Moronidae* familyası ve *Dicentrarchus* cinsine ait, balıkçılık ve su ürünleri endüstrisinde yüksek ekonomik öneme sahip, Avrupa pazarlarında aranan bir deniz balığıdır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) raporlarına göre 2010 yılında dünya genelinde yetiştiricilik yoluyla elde edilen toplam levrek üretimi yıllık 120.000 ton'un üzerinde olup, bu üretimde Türkiye'nin payı 50.796, Yunanistan'ın payı 31.100, İspanya'nın payı 11.490

ve İtalya'nın payı ise 6.450 tondur. Levrek cinsi olgunluk yaşı erkekler için 2, dişiler için 3 olup aynı yaştaki dişiler erkeklere göre daha iridir (Carrillo vd 1993, Rodriguez vd 2001, Piferrer vd 2004). Dişiler grup-senkroni ovaryum gelişimine sahiptir. Gonadal gelişim döneminde ovaryum iki veya daha fazla farklı gelişim evrelerine sahip oosit grupları taşır (Carrillo vd 1989, Mayer vd 1990, Alvariño vd 1992, Asturiano vd 2002). Genç dişiler Akdeniz bölgesinde Ocak-Mart ayları arasında kg vücut ağırlığı başına 1.2-1.4 mm çapında $492-955 \times 10^3$ pelajik yumurta bırakma yeteneğine sahiptir (Carrillo vd 1995). Ancak kültür şartları altında üretilen yumurtaların kalitesi yüksek miktarda iyi kalitede larva üretimini sınırlandırmakta ve diğer deniz balıklarında olduğu gibi levrekte de daha yüksek miktarlarda üretime engel teşkil etmektedir (Bromage vd 1995, Carillo vd 1995). Bu sorunlar yıllar boyunca yumurta kalitesi üzerine birçok çalışma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur (Brooks vd 1997, Cerdá vd 2008, Bobe ve Labbé 2010).

Düşük kaliteli yumurta veren anaçlarda çoklu vitellojen sisteminin işleyişinde aksamalar olduğu varsayılmaktadır. Akvakültür uygulamalarında yumurta kalitesini, üreme kontrolünü ve üretim sonuçlarını en yüksek düzeylerde tutabilmek için vitellogenez dahil olmak üzere oogenezi sürecine ait temel moleküler olayların doğru şekilde anlaşılması ve yorumlanması gerekmektedir. Levrek vitellojenleri ve vitellogenezi, anaç bakımı ve yumurta kalitesine yönelik önceden yapılmış bazı çalışmalar (Mañanos vd 1994ab, 1997, Navas vd 1998, Carnevali vd 2001) bulunsa da bu çalışmaların hiçbiri levrekte çoklu vitellojen sistemine odaklanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız; 1) levrekte bulunan Vtg'leri kodlayan tam cDNA dizilerinin eldesi, 2) bu cDNA'lar tarafından kodlanan birincil Vtg peptidlerin sınıflandırma ve karakterizasyonu, 3) her bir Vtg'nin oogenezin farklı aşamalarında örneklenmiş dişi kanında ve bunlardan türemiş YP alt birimlerinin aynı dişilerde oositlerdeki varlığının tespiti, 4) her bir Vtg'nin sentezi, oositlere taşınması ve buradaki birikim oranları üzerine fikir edinebilmek amacıyla karaciğer, plazma ve ovaryum içerisindeki miktarları ile birbirlerine olan oranlarının belirlenmesini hedeflemiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Teleost Balıklarda Oogenez

En geniş anlamıyla oogenez, kök germ hücreleri (Primordial Germ Cells; PGC)'nin döllenme yeteneğine sahip bir ovum oluşturan kadarki gelişim sürecidir. Bu süreç, embriyogenez sırasında blastomerde PGC formasyonu ve bu hücrelerin genital bölgeye göçü ve ile başlar. Cinsiyet farklılaşmasının hemen sonrasında ovaryumda bulunan oogonia bir dizi mitotik bölünme geçirip sayıca çoğaldıktan sonra, birincil oosit (Primary Growth Oocyte; PGO)'e dönüşmek üzere mayoz bölünmeye girer (Şekil 2.1A). Bu süreç içerisinde PGO etrafında onu çevreleyen bir follikül oluşumu balıklarda olduğu kadar diğer omurgalılarda da yaygındır. Vitellojenik büyüme olarak da bilinen oosit büyümesi birinci mayoz bölünmenin profaz I aşamasında bir duraksamaya maruz kalmasıyla başlar. Bu dönemde yumurta boyutlarında yumurta sarısı öncül maddeleri vitellojenlerin katılımı nedeniyle ciddi artışlar meydana gelir (Şekil 2.1B). Bunun sonrasında daha önceden duraksamaya maruz kalmış mayozun devamı ile oosit olgunlaşması (Şekil 2.1C) ve ovulasyon olarak bilinen ovumun follikülden atılması (Şekil 2.1D) işlemi gerçekleşir.

2.1.1. Oosit büyümesi

Oosit gelişimi sırasında mayoz başlangıcını takiben follikül formasyonu (follikülogenez) gerçekleşir ve bariz oosit büyümesi başlar. Bu nedenle oosit büyümesini sadece bağımsız oositin büyümesi olarak değil follikül ile beraber şekillenmiş bütün bir yapının senkronize gelişimi olarak düşünüp değerlendirmek gerekir. Follikülün temel yapısı kromozomal gelişimin pakiten veya diploten evrelerinden birinde prefollikül hücreleri (muhtemel granuloza öncül hücreleri) ve bunlara ilişik bazal membranın oositi tamamen sarması ile oturmuş olur. Granuloza hücreleri oosit etrafında tek katlı bir tabaka, teka hücreleri ise bazal membranın dışında heterojen bir katman oluştururlar (Şekil 2.1B, Şekil 2.2). Bu yapı folliküler büyüme boyunca değişim göstermez (Tokarz 1978, Wallace ve Selman 1990). Folliküler büyüme genellikle previtellojenik ve vitellojenik olmak üzere iki aşamada gerçekleşir.

2.1.1.1. Previtellojenik büyüme

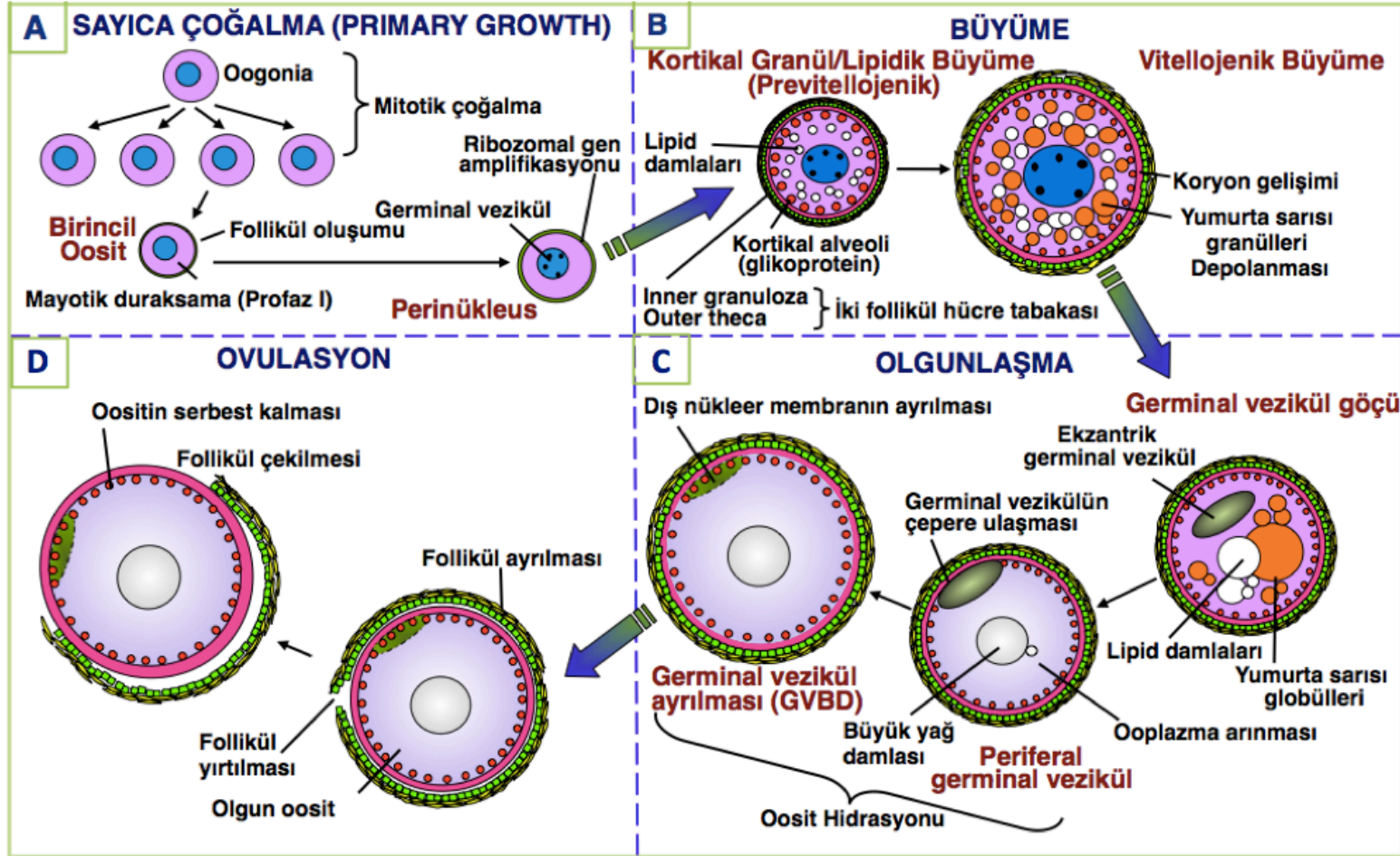
Oogenez boyunca gerçekleşen iki mayoz duraksamasının ilki kromozal gelişimin Profaz I evresinde previtellojenik büyüme hazırlık sırasında meydana gelir. Bu süreçte follikül çapı türe göre on katından fazla artış gösterebilir. Oosit nükleusu dış yüzeyinde bulunan nükleollerde ribozomal RNA (rRNA) ve diğer RNA'ların üretiminde ciddi bir artış gözlenir (Şekil 2.1A) (Lubzens vd 2010). Olgun bir oositin bünyesinde bulunan RNA'nın çoğunun bu aşamada üretildiği sanılmaktadır (Wallace ve Selman 1990). Özellikle Vtg reseptörleri ve Vtg ayrıştırma enzimlerine ait bazı özgün mRNA'lar previtellojenik büyüme sırasında en yüksek seviyelere ulaşmakta ve sonraki aşamalarda düşüşler göstermektedir.

Oosit büyümesinin 'kortikal aveoli' veya 'lipidik büyüme' olarak da bilinen bu aşamasında ooplazmada lipid damlaları halinde depolanan lipid birikimi ve de kortikal alveoli (kortikal granül) formasyonu gerçekleşir. Previtellojenik büyüme sürecinin ortalarında ve sonlarına doğru büyük miktarlarda polisialoglikoproteinler sentezlenir (Wallace ve Selman 1990) ve bu glikoproteinler oosit çeperinde yeni oluşmuş alveollerin yapısına katılırlar. İlk meydana geldikleri yer oosit çeperi olduğundan kortikal alveoller olarak adlandırılan bu yapılar, büyüklükleri ve sayıları arttıkça oosit içerisinde daha derinlere doğru hareket eder, vitellojenik büyümenin son aşamalarına doğru merkeze yakın bölgede yoğunlaşırlar (Şekil 2.1B). Ancak YP birikimi artınca kortikal alveoller yeniden yüzeye doğru yönelim gösterirler (Patiño ve Sullivan 2002). Döllenme anında kortikal etkileşimler sırasında kortikal alveollerin içerik maddeleri yumurta sertleşmesine yardımcı olmak üzere perivitellin boşluğa bırakılırlar. Bu olay ilerleyen aşamalarda oosit iç ve dış ortamı arasında içeriye su girişine yani hidrasyona olanak tanıyacak şekilde asit baz dengesini kurmaya yardımcı olmaktadır.

Oositlerde lipid birikimi de genellikle previtellojenik büyüme aşamasında gerçekleşir (Selman ve Wallace 1989). Bu lipidlerin kökeni hakkında net bir bilgi mevcut olmasa da kanda dolaşan ve vasküler endotelde ovaryum lipoprotein reseptörlerine bağlanan, burada lipoprotein lipaz aracılığıyla serbest yağ asitleri (Free Fatty Acids; FFA)'ne ayrıştırılan (Patiño ve Sullivan 2002) çok düşük yoğunluklu

lipoproteinler (Very Low Density Lipoproteins; VLDL)'den türedikleri sanılmaktadır (Prat vd 1998). Buna göre VLDL ürünü bu serbest yağ asitleri, ilerleyen aşamalarda oositlere alınarak ooplazmada yağ damlacıklarında depolanmak üzere yeniden yumurta sarısı lipidlerine esterleştirilmektedir (şekil 2.1B)

Bu dönemde önemli diğer yapısal değişimler follikül duvarında gerçekleşir. Yüzeyde mikropil açıklığı yapılanır ve gittikçe derinleşerek granuloza hücrelerine doğru uzanır. Yapısal değişimler üzerine geçmişte yapılmış çalışmalar previtellojenik büyüme aşamasının sonlarına doğru oosit ile granuloza hücreleri arasındaki mikropilin koryon zarı tabanından başlayarak şekillendiğini ortaya koymuştur (Patiņo ve Sullivan 2002). Follikülün büyümesiyle beraber mikropil etrafını saran koryon zarı da kalınlaşır. Böylece mikropil granuloza hücreleriyle teması gözenekler yardımıyla sürdürecek şekilde uzar. Koryonu oluşturan proteinlerin (koryonojenler, zona pellucida proteinleri) en azından bir kısmının sentezi ovaryum kökenli östrojenlerin kontrolü altındadır. Söz konusu östrojenlerin üretimi ise hipofizden salgılanan follikül uyarıcı hormon (Follicle Stimulating Hormone; FSH) ve lüteinleştirici hormon (Luteinizing Hormone; LH) gibi gonadotropinlerin uyarıcı etkisi altında gerçekleşir. Previtellojenik büyümeye dair diğer bazı mekanizmalar araştırılmayı bekleyen konular arasındadır.



Şekil 2.1. Teleostlarda oosit büyümesi, olgunlaşması ve ovulasyonun temel aşamaları.

2.1.1.2. Vitellojenik büyüme ve vitellogenenez

Vitellojenik büyüme aşamasında oositte, Vtg alınması ve ooplazmada Vtg türevi YP birikimi ile beraber bu aşamada da devam eden lipid birikiminden dolayı hacimce ciddi bir artış gözlenir.

Vitellojenik büyümenin follikül duvarında farklılaşan, hücreler arası kanalların oluşumuyla aynı zamana denk geldiği göze çarpmaktadır (Tyler ve Sumpter 1996). Vitellojenik büyümenin başlangıcında granuloza hücreleri ve mikropili oluşturan hücreler arasındaki heterojenik bağlantılar (heterolog GJ) ve de vitellojenik büyüme boyunca granuloza-granuloza hücrelerinin kendi aralarındaki homolog bağlantı yapıları (homolog GJ) en önemli madde iletim yollarını oluştururlar (Patiño ve Sullivan 2002). Hücreler arasındaki bu boşluk bağlantıları, bahsi geçen follikül hücre çiftleri arasında doğrudan bir sitoplazma akışkanlığına olanak tanır. Dolayısıyla bu süreç içerisinde büyüme ve de pek çok hücresel yapının farklılaşmasının koordinasyonunda önemli rol oynarlar. Heterolog GJ'ların belirmeye başlamalarının vitellojenik büyümenin başlangıcına denk gelmesi bu iki olayın birbiriyle yakından ilişkili olduğunu ortaya koysa da bu ilişkinin detayları henüz bilinmemektedir.

Vitellojenik büyüme aşamasında çevresel ve içsel uyarıların etkisiyle beyin-hipofiz-gonad (Brain-Pituitary-Gonad; BPG) ekseninde hipotalamustan Gonadotropin üretimi ve salgılanmasını tetikleyici hormon (Gonadotropin Releasing Hormone; GnRH) salgısının etkisiyle hipofizden FSH salgısı tetiklenmiş olur. Bu hormonun kandaki seviyesinin artışı takiben gonadlardaki follikül hücrelerinden (granuloza ve teka hücreleri) vitellojenlerin hepatositlerden sentezini ve salgılanmasını tetikleyen 17β -E₂ üretimi ve salgısı meydana gelir (Şekil 2.2).

Kuşlar ve amfibilerde Vtg büyük molekülü bir lipoprotein olan Lv, küçük molekülü bir fosfoprotein olan Pv (Hiramatsu vd 2002a) ve de yine Vtg türevi olan yumurta sarısı plazma glikoproteinleri (Yolk Plasma Glycoproteins; YGP) (Yamamura vd 1995) gibi başlıca YP'lerine ayrışır. Teleostlarda YGP yerine lipid ve fosfor içermeyen β -component adı verilen küçük molekülü, Vtg türevi olan bir diğer YP

bulunmaktadır (Hiramatsu vd 2002a). Tek bir çeşit teleost Vtg'den üç ayrı YP (Lv, Pv, ve β'c)'nin türediği tekli Vtg modeli (Hiramatsu vd 2002e, 2005) artık güncelliğini yitirmiş durumdadır.

Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*; Trichet vd 2000) ve zebra balığı (*Danio rerio*; Wang vd 2000)'nda çoklu Vtg sistemi ortaya konmuştur. Bu bulgular daha önce öne sürülen 'tekli Vtg model'in reddine ve bu ana kadar ortaya konmuş her bir Vtg ve bunların türevleri olan YP'lerinin işlevleri üzerine çalışmalara öncülük etmiştir (Hiramatsu vd 2002de). Bunu takip eden gelişmeler teleost oogenizinde geçici ikili Vtg model (Dual Vtg System)'in rol aldığını göstermiştir. Bu ikili Vtg sistem ayrıca *Fundulus heteroclitus* (LaFleur vd 1995b, 2005), sivrisinek balığı (*Gambusia affinis* (Sawaguchi vd 2005ab), mercan (*Pagrus major*, Sawaguchi vd 2006), kefal (*Mugil cephalus*, Amano vd 2007ab, 2008ab), Atlantik pisi balığı (*Hippoglossus hippoglossus*, Finn 2007a) ve taraklı çırçır (*Ctenolabrus rupestris*, Kolarevic vd 2008) gibi acanthopterygianlar ve bir paracanthopterygian olan mezgit (*Melanogrammus aeglefinus*, Reith vd 2001) gibi türlerde de ortaya konmuştur. Ancak ikili Vtg sistem Protacanthoptergii ve Ostariophysii gibi gelişmiş takımlarda bulunmamaktadır (Reading vd 2009).

Son yıllarda klonlama ve immünoyokimyasal analizler gibi oldukça gelişmiş teknikler kullanılarak, balıklarda bir çoklu Vtg sisteminin varlığı ve bu sistemin teleost gelişimine hayati katkılar sağladığı ortaya konmuştur (Hiramatsu vd 2005, 2006, Patiño ve Sullivan 2002, Matsubara vd 2003). Gelişmiş teleost taksonlarında (Paracanthopterygii ve Acanthopterygii) transkripsiyon aşamasında genellikle üç çeşit Vtg eksprese olmaktadır (Hiramatsu vd 2002e, 2005). Günümüzde beyaz levrek (*Morone americana*) (Hiramatsu vd 2002e, Reading vd 2009), *G. affinis* (Sawaguchi vd 2005ab), mercan (Sawaguchi vd 2006), kefal (Amano vd 2007ab), ile *Xenotoca eiseni* ve çizgili levrek (*Morone saxatilis*, V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış) olmak üzere altı adet teleosta ait Vtg proteinleri ve bu proteinlere ait bütün cDNA dizileri karakterize edilmiş durumdadır. Bunun yanında diğer birçok türde bir veya birkaç *vtg* geni ve bunların translasyonu olan protein ürünleri (Vtg) ortaya konmuştur (LaFleur vd 1995b, 2005,

Matsubara vd 1999, 2003, Reith vd 2001, Ohkubo vd 2004, Davis vd 2007, Finn 2007a, Kolarevic vd 2008, Reading vd 2009).

Bu Vtg'lerden ikisi olan ve taşıdıkları büyük molekülle temel YP alt birimlerine göre 'tam' Vtg olarak adlandırılan VtgAa ve VtgAb'nin temel yapısında; NH₂, LvH, Pv, LvL, β'c, Ct, COOH (Patiño ve Sullivan 2002) bulunmaktadır. Bunlar temel yapılarındaki benzerliklere rağmen, taşıdıkları farklı Lv alt üniteleri (LvH ve LvL)'nin oosit olgunlaşması boyunca farklı proteoliz yollarından geçmeleri ve bu proteoliz sonucunda, verdikleri ürünleriyle birbirinden ayrılırlar (Matsubara vd 1999, Reith vd 2001, Sawaguchi vd 2006). Ayrıca bu Vtg formları birbirinden farklı olarak oosit yüzeyinde en az iki farklı reseptöre bağlanırlar (Reading vd 2008, Reading ve Sullivan 2011).

Son yıllarda bu olayların dayandığı temelleri daha doğru anlayabilmek için omurgalı Vtg genlerine ait transkriptler, genomik varyantları ve filogenetik çıkarımlar üzerine çalışmalar yapılmış ve VtgAb'nin VtgAa ile aynı kökene sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Finn ve Kristoffersen 2007). VtgAa post-R3 soya özgü duplikasyona uğrayarak yumurtanın bentik veya pelajik karakteri almasında oldukça etkili VtgAa ve VtgAb paralog gen salkımlarını oluşturur. VtgAa paraloglarının birbirinden farklı fonksiyonlar kazanmaları eksprese olan proteinin (VtgAa veya VtgAb) ve ondan türeyen YP'lerinin oosit gelişimi boyunca farklı yollarla farklı alt birimlere ayrıştırılmaları ve farklı aşamalarda farklı görevler üstlenmeleriyle açıklanmaktadır. Burada 'gen (protein)' şeklinde gösterilmiş olan yeni Vtg adlandırması Finn ve Kristoffersen, (2007) tarafından sırasıyla önceki çalışmalarda belirtilmiş olan *vtga* (VtgA) ve *vtgb* (VtgB) yerine *vtgAa* (VtgAa) ve *vtgAb* (VtgAb) olarak yeniden yapılmıştır (Finn 2007a). Burada *vtgAa* ve *vtgAb* genleri, VtgAa ve VtgAb ise bu genlerin transkripsiyon ürünü olan proteinleri ifade etmektedir. Üçüncü çeşit Vtg (VtgC) ise Lv dışında kalan YP alt birimlerinden yoksun olup, 'eksik veya fosvitinsiz' Vtg olarak adlandırılır (Hiramatsu vd 2005, 2006) ve herhangi bir reseptöre bağlanmaz (Reading vd 2008, Reading ve Sullivan 2011). Bu Vtg formunun bazı türlerde oosit içerisinde YP gruplarına ayrıştırılmadığı bilirse de fizyolojik fonksiyonlarına dair net bilgi mevcut değildir (Hiramatsu vd 2005, Reading vd 2009).

2.1.1.2.1. Reseptör kontrollü endositoz

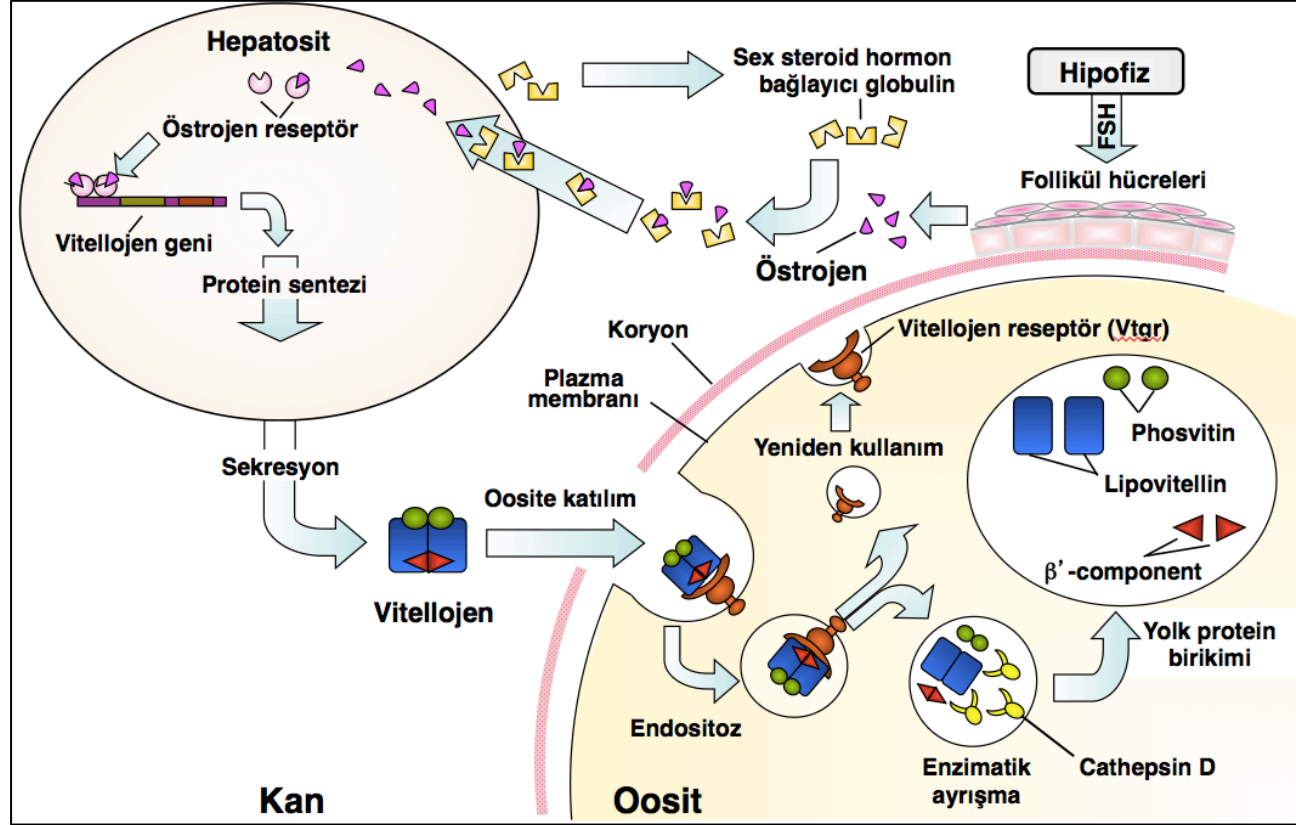
Hipofizden salgılanan FSH etkisiyle ovaryen follikül hücrelerinden karaciğerdeki vitellojen sentezini tetikleyecek 17β -E₂ salgısı başlar. Bu östrojen hepatositlere kan yoluyla seks steroid bağlayıcı globüline bağlı olarak taşınır ve hücre içerisine alındıktan sonra serbest kalır. Serbest östrojen hepatosit içerisinde östrojen reseptörlerine bağlanır ve östrojen-reseptör kompleksi de Vtg protein sentezini ve salgısını uyarmak üzere hedef *vtg* geni üzerinde östrojen yanıt elementleri (Estrogen Response Elements; ERE)'ne bağlanır. Hepatositlerde sentezlenen Vtg ovaryuma kan yoluyla taşınır ve oosit etrafındaki follikül duvarı ve koryonu geçerek oosit içerisine alınmak üzere yüzeyde kendine özgün Vtg reseptörleri (VtgR)'ne bağlanır (Selman ve Wallace, 1989). Vtg-VtgR kompleksleri oosit içerisine klatriin ile kaplanmış periferik sitoplazma içerisine derinleşerek şekillenen özelleşmiş veziküller içerisinde kontrollü endositoz ile alınırlar. Klatriin kaplı veziküller hücre içerisine alındıktan sonra klatriin ve VtgR serbest kalarak yeniden kullanılmak üzere hücre çeperine geri dönerlerken, veziküller periferik ooplazma içerisindeki lizozomlarla birleşerek, çoklu veziküler yapıları meydana getirirler (Patiño ve Sullivan 2002). Vtg'nin YP alt birimlerine (lipovitellin, fosvitin, β '-component ve C-ucu peptid) proteolitik ayrışması bu multiveziküler yapılar içerisinde katepsin D tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.3) (Wallace 1985, Tyler vd 1999). Vtg türevi bu alt birimler ooplazma içerisinde ya yumurta sarısı granülleri (yumurta sarısı globülü veya plateletleri) halinde veya sıvı halde depolanır.

Tavuklarda, amfibilerden *Xenopus laevis*'te ve Gökkuşuğu alabalığında *vtgr* (vitellojen reseptörü geni)'ünü kodlayan cDNA'ların karakterizasyonu bu genin düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör (Low Density Lipoprotein Receptor; LDLR) gen süperfamiliyasına ait olduğunu göstermiştir (Bujo vd 1995, Okabayashi vd 1996, Prat vd 1998, Davail vd 1998). Kuşlarda bu reseptörün çift işlevli olduğu ve aynı anda hem Vtg hem de VLDL bağladığı belirtilmiştir (Patiño ve Sullivan 2002). Ancak, teleost VtgR'ünün sadece Vtg bağladığı görülmektedir (Tyler ve Lubberink 1996). Son yıllarda Vtg'in büyük bir kısmını oluşturan ağır zincirli lipovitellin bölgesinin

reseptörün Vtg'i tanımada etken bölgeyi taşıdığı kanıtlanmıştır (Hiramatsu vd 2002a, Hiramatsu vd 2004, Reading vd 2009).

Gökkuşığı alabalığında VtgR'ü cDNA'sından farklı olarak lipoprotein reseptör (Lipoprotein Receptor; LPR) cDNA'sı fazladan O-bağlı şeker ucunu kodlayan 105 baz çifti taşımaktadır. Bu reseptöre ait mRNA hem ovaryumda hem de somatik dokularda eksprese olduğundan dolayı bu cDNA ile kodlanan reseptör alabalık somatik LPR olarak adlandırılmıştır (Prat vd 1998, Davail vd 1998). Bunun yanında *vtgr* mRNA ekspresyonunun sadece ovaryumda gerçekleştiği bilinmektedir (Prat vd 1998, Perazzolo vd 1999). Somatik LPR, ovaryum ve diğer dokulardaki VLDL ve/veya VLDL-benzeri proteinleri bağlamaktadır (Prat vd 1998). *X. laevis* ve tavuklarda (Bujo vd 1995, Okabayashi vd 1996) olduğu gibi alabalık VtgR, daha büyük yapıda olan somatik LPR'nin splice varyantı olabilir. Teleost follikülünde VtgR bağlayıcı aktivite ilk olarak previtellojenik büyümeden vitellojenik büyümeye geçiş aşamasında fark edilmiştir (Patiño ve Sullivan 2002). Gökkuşığı alabalığı ovaryen *vtgr* mRNA ekspresyonunun previtellojenik aşamada ve vitellogenezin başlangıç aşamasında en yüksek seviyelere ulaştığı bildirilmiştir (Prat vd 1998, Perazzolo vd 1999).

Vitellojen reseptörü geninin erken aşamalarda artan ekspresyonu ve vitellojenik büyüme süresince transkripsiyonunda gözlenen ciddi düşüşler, VtgR'nün büyüme süresince Vtg alımının sürdürülebilmesi için tekrar kullanılmak üzere yeniden oosit yüzeyine dönüş yaptığını göstermektedir. Alabalıkta Vtg alımı FSH ile uyarılırken LH'nın benzer etkilerine rastlanmamıştır (Tyler vd 1999). Teleostlarda *vtgr* gen ekspresyonunun hormonal kontrolü hakkında yeterli bilgi mevcut olmasa da kertenkelede IVtgR benzeri aktivitenin FSH ile tetiklendiği bilinmektedir (Romano ve Limatola 2000). Vitellojenik büyümenin östrojenik olmayan hormonlar ve büyüme faktörleri ile kontrolü de mümkündür (Tyler ve Sumpter 1996). Östrojenik olmayan hormonların ovaryum follikül gelişimi üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

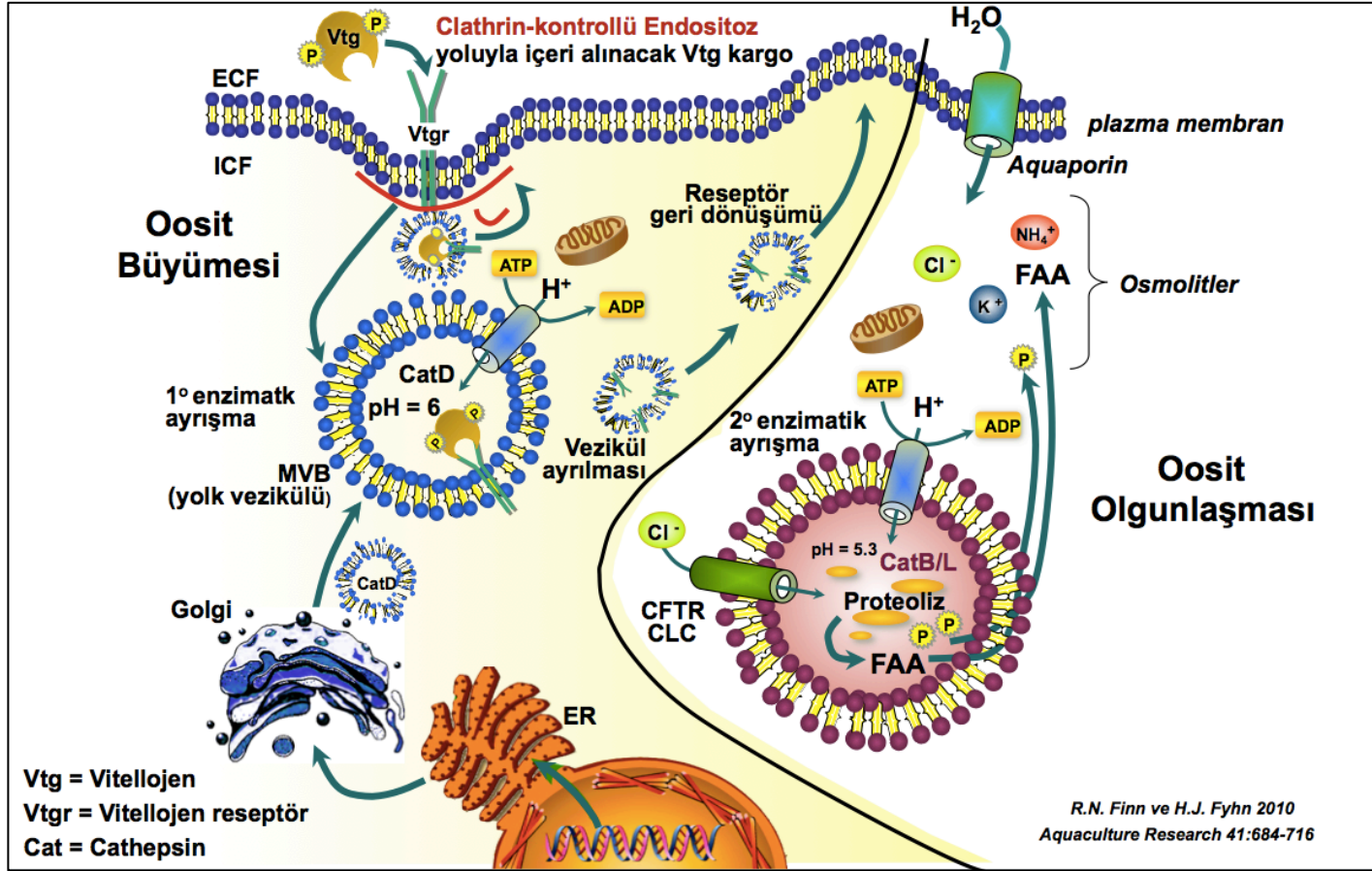


Şekil 2.2. Vitellogenin üretiminin östrojen ile uyarılması, oosit içerisine reseptör-kontrollü endositoz ile alınması ve katepsin D tarafından yumurta sarısı proteinlerine ayrıştırılması (Hiramatsu vd 2005'den modifiye edilmiştir).

2.1.1.2.2. Yumurta sarısı proteinleri oluşumu ve katepsinler

Teleost *vgt* genini kodlayan nükleotid dizileri, Vtg proteini moleküler yapısının NH₂-LvH-Pv-LvL-β^c-Ct-COOH gibi bir alt birim sıralamasından ibaret olduğunu ortaya koymuştur (Matsubara vd 1999, Hiramatsu vd 2002ab). Bu temel yapıyı oluşturan alt birimlerden lipovitellin ve fosvitinin vitellojen türevi iki temel YP olduğu bilinmektedir (Wallace 1985). Bunlardan büyük moleküler yapıya sahip olan ve LvH ile LvL olmak üzere iki ayrı polipeptitten oluşan Lv yaklaşık % 20 lipid içermekte olup, embriyonik gelişimin en önemli besinsel desteği olan amino asitler ve lipidlerin temel kaynağını oluşturmaktadır. Pv yaklaşık % 50 oranında çoğunlukla yapısına kovalent bağlarla fosfat, iyonik bağlarla ise kalsiyum bağlayan serin moleküllerinden oluşmaktadır. Bu nedenle Pv Vtg'ye lipid yüklemesine kolaylık sağlamasının yanı sıra proteinin kanda çözünürlük kazanmasına da yardımcı olur (Finn 2007b). Ayrıca Pv gelişmekte olan embriyoya kemik gelişimi ve metabolik fonksiyonlar sırasında ihtiyaç duyduğu mineral desteğini oluşturur.

Son yıllarda tavuklarda Vtg'nin Ct alt biriminden türediği bildirilen YGP tavuklarda, *X. laevis*'de ve gökkuşuğu alabalığı gibi canlılar arasında oldukça korunmuş olan ve tekrarlanmış bir dizi sisteinden oluşan bir yapıya sahiptir (Yamamura vd 1995, Patiño ve Sullivan 2002). Bir diğer Vtg türevi protein β^c olup ilk olarak *Verasper moseri* ve beyaz levrek (Hiramatsu vd 2002a) türlerinde ortaya konmuştur. Bu YP genellikle teleostların çoğunda bulunmaktadır. Safaştırılmasında kullanılan kromatografik fraksiyonun adından dolayı bu şekilde adlandırılmıştır (Patiño ve Sullivan 2002). Yapısında lipid veya fosfor bulundurmaz. Embriyonik gelişim sırasında beslenmede veya fizyolojik olaylardaki görevleri net olarak bilinmese de Vtg stabilizasyonu ve dimerizasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (Reading vd 2009, Hiramatsu vd 2002a). Teleost Lv ve Pv tavuklarda ve *X. laevis*'de homolog yapılar göstermekte olsa da β^c-component'in YGP'ler veya diğer yumurta sarısı bileşenleriyle benzerlik ilişkileri henüz bilinmemektedir.



Şekil 2.3. Vitellojenlerin oosit içerisine alınması ve vitellojen türevi yumurta sarısı proteinlerine ayrıştırılması (Finn ve Fyhn 2010'den modifiye edilmiştir).

Vitellogenik büyüme boyunca (Şekil 2.3) Vtg oosit dışında hücre dışı sıvı (Extracellular Fluid; ECF) içerisinde VtgR'üne bağlanır. Vtg-VtgR kompleksi buradan hücre içerisine klattrin-kontrollü endositoz ile alınır. Vtg-VtgR komplekslerini içeren veziküller katepsin D enzimi içeren lizozomlarla birleşerek multiveziküler yapılar (Mutli-Vesicular Bodies; MVB)'ı meydana getirirler. Katepsin D (CatD) zimogeni, genç endozomun ATP bağımlı bir transmembran proteini olan vakuolar proton pompaları (vH1) (Şekil 2.3) yardımıyla asidifikasyonu sonrasında aktive olur ve Vtg'lerin YP'lerini oluşturacak birincil proteolizini gerçekleştirir. Oosit olgunlaşması sırasında (Şekil 2.3) YP'lerinin ikinci proteolizi yumurta sarısı veziküllerinin yine vH1 yardımıyla daha ileri düzeyde asidifikasyonluyla aktive olan katepsinler, CatB veya CatL, sayesinde gerçekleşir. Bunun yanısıra klorid (Cl⁻) kanalları (örn. CFTR veya CLC)'nın da bu aşamadaki asidifikasyonda etkili olduğu bilinmektedir. YP'lerinin bu ikincil proteolizi inorganik iyonlarla beraber ozmotik olarak oosit hidrasyonunu tetikleyen FAA ve fosfat havuzlarını meydana getirir. Oosit içerisine su girişi oosit membranı içerisinde geçici süreliğine şekillenmiş özelleşmiş su kanalları (aquaporin: Aqp1b) yoluyla gerçekleşir.

Tavuklar (Retzek vd 1992), salmonidler (Sire vd 1994) ve çipura (*Sparus aurata*, Carnevali vd 1999b) üzerine yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçlar, Vtg'nin Lv, Pv, β 'c, ve Ct peptid gibi YP'lere (Hiramatsu vd 2002ab) oosit içerisinde ayrıştırılmasının lizozomlarda bulunan katepsin D enzimi tarafından gerçekleştirildiğine dair kanıtlar ortaya koymaktadır (Carnevali vd 1999a). Katepsin D karaciğer, akciğer, dalak ve plasenta gibi fagositik birçok dokuda bulunan, aspartik proteazlar sınıfından lizozomal bir enzim olup, temel fonksiyonu hücre içerisine endositozla alınan proteinlerin lizozom kontrollü parçalanmasıdır (Şekil 2.2) (Hiramatsu vd 2002c). Olgun gökkuşuğu alabalığı oositi üzerine yapılan immünohistokimyasal bir çalışmada, proteolitik bir enzim olan katepsin D'nin vitellogenenezden önce farklılaşmaya başlayan MVB içerisinde bulunduğunu ve endositozla hücre içine alınan Vtg ile bu yapılar içerisinde bir araya geldiğini ortaya koymuştur (Sire vd 1994). Proteolitik aktivite memeli ve kuş (Carnevali vd 2001) embriyosuna ait tam şekillenmemiş yumurta sarısı kesesinde de gözlenmiştir. Bu enzimlerin aktivitesinin sistein ve aspartik proteinaz inhibitörleriyle muameleleri

yumurta sarısı proteolizinin bloke olması ve embriyoların anormal gelişimi veya ölümüyle sonuçlanmaktadır.

Çipura ovaryumundan katepsin D ve L olmak üzere iki çeşit lizozomal enzim izole edilmiştir (Carnevali vd 1999b). Oogenez boyunca bu enzimlerin aktiviteleri üzerine yapılmış çalışmalardan edinilen bilgiler bu türlerde Vtg'den YP formasyonunda etkili tek enzimin katepsin D olduğunu göstermiştir. Ayrıca salmon ovaryumundan YP formasyonundan sorumlu katepsin D benzeri olan ve pepstatine duyarlı bir proteaz daha izole edilmiştir (Hiramatsu vd 2002c). Gökkuşluğu alabalığında katepsin D gen transkripsiyonuna ait en yüksek seviyelere previtellogenik büyüme aşamasında rastlanmıştır (Patiño ve Sullivan 2002).

Olgunlaşma aşamasındaki oositte YP'leri üç ayrı inaktif proenzim (katepsinler) ile birlikte yumurta sarısı granüllerinde bulunmaktadır (Carnevali vd 2006, 2008, Raldua vd 2006). Oosit olgunlaşması sırasında yumurta sarısı granüllerini çevreleyen membran içerisinde bir proton pompası (vakuolar ATPaz), klorid kanalları ile beraber hareket ederek bir veya birden fazla katepsinin aktive olmasını tetikleyen luminal pH'nın düşmesine (~5.0-5.5) neden olur (Carnevali vd 1999b, 2006, 2008 Raldua vd 2006). Katepsinlerden bir sistein proteaz olan katepsin L, çipurada olgunlaşma aşamasında YP'lerinin proteolizinden (Carnevali vd 1999, Carnevali vd 2006) sorumlu iken *V.moseri*'de bu işlemde katepsin B sorumludur (Matsubara vd 2003, Şekil 2.3).

F. heteroclitus oositinde katepsin B, F ve L her gelişim aşamasında bulunurken katepsin F sadece vitellogenesis aşamasında yumurta sarısı granüllerinde bulunmakta ve olgunlaşma aşamasında kaybolmaktadır (Raldua vd 2006). Katepsin F'nin bu süreçte katepsin B ve/veya katepsin L'nin olgunlaşmayı aktive etmesinde tetikleyici bir rolü olduğu sanılmaktadır. Buradan yola çıkarak katepsin B ve katepsin L'nin oosit olgunlaşması süresince gösterdikleri proteolitik aktivitelerin türe özgü olduğu söylenebilir. Bu nedenle Vtg türevi YP'lerinin proteolizi oldukça karmaşık aktivasyon aşamaları gerektirebilir.

Vtg'lerin ilk olarak Wallace ve Selman (1985) tarafından ortaya konan ikincil proteolizi deniz teleostlarında oosit olgunlaşması sürecinde meydana gelen benzersiz bir olaydır. Proteoliz etkinlik düzeyi yumurtlanacak yumurtaların bentik veya pelajik oluşlarına ve Vtg genlerinin ekspresyonundaki farklılıklara bağlıdır (Matsubara vd 1999, Sawaguchi vd 2006, LaFleur vd 2005). Bentik yumurtalarda YP'leri ya ayrıştırılmaz ya da kısmen hidrolize olurken pelajik yumurtalarda YP'leri yoğun bir proteolize uğrar ve serbest amino asitlerden oluşan FAA havuzunu meydana getirirler (Matsubara vd 1999, Finn vd 2002ab, Hiramatsu vd 2005). Bu FAA'ler olgunlaşma sürecinde geçici olarak özelleşmiş yapılar olan porlardan (aquaporin) oosite su girişine olanak tanıyan temel ozmolitlerdir (Fabra vd 2005, 2006). Böylelikle FAA'ler sayesinde henüz aktif su içme mekanizması gelişmemiş olan deniz teleostları embriyosunda hayati işlevleri bulunan su rezervi sağlanmış olur (Şekil 2.3) (Finn vd 2002a, Finn 2007a).

V. moseri'de VtgAa, VtgAb ve bunların ürünleri olan YP'leri, oosit hidrasyonu ve embriyoya özgün besinlerin iletimi konularında farklı rollere sahiptirler (Matsubara vd 1999). Vtg'lerin proteolizi sonucu ortaya çıkan YP'leri, türe bağlı olarak yumurta sarısı globülleri veya plateletleri halinde ooplazmada depolanmaktadır (Wallace ve Selman 1990). Demersal yumurtalar bırakan tatlı su teleostlarında Vtg türevi YP'leri ovumun kuru ağırlığının % 80-90'ını hatta bazı türlerde daha da fazlasını oluşturur (Wallace 1985, Tyler vd 1999).

Oosit olgunlaşması sırasında her ikisi de kapsamlı bir proteolize uğrayan β 'c ve Pv'nin yanı sıra LvHAa'nın neredeyse tamamı FAA'lere ayrışır. Lv'ler, Pv'ler ve β 'c'lerden ayrılan FAA'lerin oosit hidrasyonunda ozmotik etmenler olarak görev yaptıkları ve aynı zamanda erken embriyonik gelişimi destekleyici difüze olabilen besin havuzunu oluşturduğu düşünülmektedir. Bu sırada LvHAa'nın proteolize uğramadan bozulmamış halde kalan küçük bir apoprotein parçası larvaya lipid taşınmasında görev almakta ve larva tarafından sinsitiyal (syncytial) tabakaları oluşturmak üzere kullanılmaktadır. Ayrıca dimerik yapıdaki LvHAb'nin kısmi ayrışmaya maruz kalarak monomerlere ayrıldığı ve larvaya besin kaynağı olarak görev

yapmak üzere yapısal bütünlüğünü koruduğu bilinmektedir (Ohkubo ve Matsubara, 2002).

Oosit olgunlaşması boyunca VtgAa türevi YP'leri, ~% 87 oranında FAA ayrıştırırken VtgAb'nin LvHAb kısmı ~% 67 oranında ayrışmadan kalır. Bu sonuçlar VtgAa ve VtgAb arasındaki oranın postvitellojenik oosite FAA verimi dolayısıyla oosit olgunlaşması ve yumurta yüzebilirliği ile açılma oranını önemli derecede etkilediğini ortaya koymaktadır. VtgAa ve VtgAb kökenli YP'lerinin proteolizi konusunda mezigit (Reith vd 2001), mercan (Sawaguchi vd 2006) ve Atlantik pisi balığı (Finn 2007a) üzerine yapılan çalışmalardan benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu bulgular ikili VtgAa/VtgAb sistemin pelajik yumurtalara sahip deniz teleostları arasında sıkı muhafaza edildiğini ortaya koymaktadır (Amano vd 2008b).

2.1.1.2.3. Lipid depolanması

Salmonlar ve bariz bir yağ damlacığından yoksun demersal yumurtalara sahip diğer türlerde Vtg, büyümekte olan oosite en önemli lipid kaynağıdır (Wallace 1985, Tyler vd 1999). Teleost Vtg yaklaşık % 20 oranında lipid içerir ve bunun % 60-80'i çoklu doymamış yağ asitlerince zengin fosfatidilkolin veya fosfatidiletanolamin gibi polar lipidler grubuna giren fosfolipidlerden oluşur (Patiño ve Sullivan 2002). Bu polar lipidler bütün organizmaların en önemli membran komponentleridir. Özellikle perciform balıklar gibi pelajik yumurtalar bırakan diğer teleostlarda, gelişimini tamamlamış yumurta ooplazma hacminin neredeyse yarısını kaplayan yağ damlacıkları bulundurur (Şekil 2.1B). Bu yağ damlacıkları oosit olgunlaşması sırasında birleşerek bir veya iki büyük yağ globülünü oluştururlar (Şekil 2.1C). Vtg ile alakalı lipidlerin aksine yağ damlacıkları başta trigliseridler, mumlar ve doymamış yağ asitlerince zengin olup özellikle balıklarda öncelikli olarak metabolik enerji kaynağı olarak kullanılırlar (Weigand 1996). Bu durumda Vtg yapısında bulunan başlıca lipidleri büyümekte olan oosite taşıyarak embriyonik doku gelişimine katkıda bulunurken, başka kanallar aracılığıyla oosite taşınan ve yağ damlacıkları halinde depolanan nötral lipidler embriyogenez boyunca ihtiyaç duyulan enerjinin kaynağını oluşturmaktadır. Yumurtasında yoğun olarak lipid bulunduran pek çok teleost türde bu ikili lipid

kaynağının birbirinden ayrı yollarla kontrol edildiğini destekleyen bilgiler mevcuttur. Bu türlerde Vtg normalde fosfatidilkolin taşımakta ve vitellojenik dışilerin kanında ise belirlenebilir seviyelerde mum esterlerine rastlanamasa da olgun oositlerde bulunan iri yağ damlacıklarının mum esterleri içerdikleri bilinmektedir (Patiño ve Sullivan 2002).

Bazı türlerde büyümekte olan oositte lipid birikimi YP birikiminden bağımsız gerçekleşir. Vtg kökenli olmayan lipid öncül maddelerinin kanda taşınması veya oosit içerisine alınması mekanizmaları ile bu işlemlerin kontrolleri henüz araştırılmaya açık konulardır. Teleostlar memelilere kıyasla kanda dolaşım halinde olan ve Vtg dışında kalan oldukça geniş bir lipoprotein spektrumuna sahiptir (Patiño ve Sullivan 2002). Bu lipoproteinlerin reseptörler yardımıyla hücre içerisine alındığı ve muhtemelen lipolizle ayrılarak oositte lipid sentezine kaynak oluşturacak olan FFA'ni oluşturduğu düşünülmektedir (LeeMen vd 1999). Daha önce de belirtildiği üzere salmon ovariumunda VLDL bağlama yeteneğine sahip olan VtgR'den farklı bir somatik lipoprotein reseptörü ekspresyonuna rastlanmıştır (Prat vd 1998).

2.1.1.2.4. Koryon formasyonu

Vitellojenik büyüme sonunda oluşumu tamamlandığında koryon zarı genellikle ince bir iç ve de kalın bir dış tabaka bulundurur (Şekil 2.1B). Polisakkaridlerce zengin granüler yapıda olan dış tabaka altta bulunur ve elektrik yükü oldukça fazladır. Damarlı lifli yapıda olan iç tabaka ise koryonojen adı verilen koryon öncül proteinlerinden türemiş 3-4 alt birimden oluşmaktadır (LaFleur vd 1995a). Koryonojenlerin sentezi, karaciğer (*Oryzias latipes*; Murata vd 1995, 1997, Sugiyama vd 1998), ovarium (sazan [*Cyprinus carpio*]: Chang vd 1996, 1997, zebra balığı; Wang ve Gong 1999, Mold vd 2001, *O. latipes*; Kanamori 2000) veya her iki dokuda birden (gökkuşuğu alabalığı; Hyllner vd 2001) gerçekleşebilir. Bu bölgeler tekli koryonojenler için çalışılmış olup, *O. latipes*'da koryon formasyonu ile alakalı üçü oositte üçü de karaciğerden sentezlenen en az 6 çeşit koryonojen proteini olduğu bildirilmiştir (Murata vd 1995, 1997, Sugiyama vd 1998, Kanamori 2000). Gökkuşuğu alabalığında koryonojenleri kodlayan genlerden birinin ifadesinin hem oositte hem de karaciğerde diğer ikisinin ise sadece karaciğerde gerçekleştiği bilinmektedir (Hyllner vd 2001). Bu bilgiler

teleostlarda koryon formasyonunun tahmin edilenden çok daha karmaşık bir işlem olduğunu ortaya koymaktadır. Karaciğerden koryonojen sentezinin 17β -E₂ tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (Patiño ve Sullivan 2002). Salmonlarda koryonojen üretimi için gerekli 17β -E₂ seviyeleri Vtg üretimi için gerekli olan seviyelerden daha düşüktür (Patiño ve Sullivan 2002). Bu sonuçlar üreme döngüsü içerisinde koryonojen üretimi ve koryon oluşumunun vitellogenoz başlangıcı ve vitellojenik oosit büyümesi aşamalarına denk gelmesi ile doğrulanmaktadır. Türe bağlı olarak koryon oluşumu 17β -E₂ üretimi, dolayısıyla da FSH veya LH ile kontrol edilebilmektedir (Patiño ve Sullivan 2002).

2.1.2. Oosit olgunlaşması

Çoğu teleostta kandaki LH seviyeleri ovaryen follikülün vitellojenik büyümesinin tamamlanmasına yakın dönemde artışa geçer (Patiño ve Sullivan 2002). Lüteinleştirici hormon folliküler granuloza hücrelerinde bulunan reseptörlere tutunarak olgunlaşmayı tetikleyici hormon (Maturation Inducing Hormone; MIH) üretimi ve MIH'a bağımlı mayoz devamı ile sitoplazmik olgunlaşma gibi süreçleri uyarır. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanması ve ilk kutup cisimciğinin atılması üzerine olgun oositte mayoz yeniden ama bu sefer Metafaz II aşamasında duraksamaya uğrar. Bu aşamada germinal vezikül (nükleus) periferal bölgeye göç eder ve ardından nükleus dış çeperi eriyerek, germinal vezikülün ayrılmasına (Germinal Vesicle Breakdown; GVBD) yol açar. Bu sırada ayrıca oositte ooplazma içerisinde dağınık halde bulunan yumurta sarısı globüllerinin birleşmesinden kaynaklı bir arınma ve YP'lerinin seçici proteolizi, lipid damlalarının birleşerek yağ damlalarını oluşturması ve ooplazma hidrasyonu (oosit hacmini en az 3-5 kat artıran hidrasyon) ile karakterize olan bir sitoplazmik olgunlaşma evresi gerçekleşir.

2.1.2.1. Oosit olgunlaşmasına hazırlık

Olgunlaşma yetisi kazanımı follikül ile çevrelenmiş oositin MIH ile tetiklendiğinde duraksamış olan mayozu devam edebilecek duruma gelmesidir. Deniz alası gibi *Sciaenidae* teleostlarının ovaryum follikülünde LH'a bağımlı olgunlaşmaya

hazırlık aşaması, eksiksiz bir protein kinaz A (Protein Kinase A; PKA) metabolik yolu ve *de novo* protein sentezinin yanı sıra yüksek GJ proteini konneksin (connexin) mRNA seviyeleri, yoğun heterolog ve homolog GJ teması ve de yüksek oosit membran MIH reseptörleri (membrane MIH Receptors; mMIHR) (Patiño ve Sullivan 2002) aktivitesi gerektirmektedir. Bu dönemde çipurada homolog ve heterolog GJ temasında (Patiño ve Kagawa 1999), çizgili levrekte (King vd 1997) ve sarıkuyrukta (*Seriola quinqueradiata*, Rahman vd 2002) MIH reseptör aktivitesinde artışlar gözlenmiştir. Bu aşamada artan GJ etkileşiminin rolü henüz bilinmemektedir. Ancak heterolog GJ'nin granuloza hücrelerinden mMIHR üretimini ve aktivasyonunu tetikleyici role sahip olan cAMP transferinde görev aldığı sanılmaktadır (Patiño ve Sullivan 2002). Artan oosit mMIHR aktivitesi muhtemelen olgunlaşma yetisi kazanımı ile bağlantılıdır. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (Insulin Like Growth Factor; IGF) ve aktivinler teleost ovaryum follikülünde LH'a bağımlı olgunlaşma yetisi kazanımının ve homolog-heterolog GJ etkileşiminin güçlü birer tetikleyicisidir (Patiño ve Sullivan 2002). Bu gözlemler IGF'lerin LH'un fonksiyonel ve hücresele düzeyde bazı etkilerini taklit ettiğini ortaya koymaktadır. Ancak IGF'lerin LH'a bağımlı olgunlaşma yetisi kazanımı ile doğrudan alakası henüz tespit edilememiştir.

2.1.2.2. Follikülde olgunlaşmayı tetikleyici hormon üretimi

Oosit büyümesi tamamlandığında kandaki LH seviyesi artar ve LH folliküldeki reseptörüne bağlanarak oosit olgunlaşması sürecini başlatacak etmen olan MIH salgısını uyarır (Nagahama 1997). Çoğu teleost balıkta MIH, di-veya trihidroksi türevi bir progesteron ($17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one veya $17\alpha,20\beta$ -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one)'dur. MIH salgısıyla beraber oosit, duraksamaya giren mayoz bölünmeye kaldığı evreden itibaren devam eder. Bu aşamada GVBD ve sitoplazmik olgunlaşma gerçekleşir (Patiño ve Sullivan 2002). MIH uyarısı altında gerçekleşen sitoplazmik olgunlaşma süresince oositte, ooplazma içerisinde yağ damlacıkları ve yumurta sarısı granülleri birleşmesi ve bundan dolayı da ooplazma berraklaşması, oosit hidrasyonu gibi döllenme ve embriyonik gelişim için hayati önem taşıyan bir dizi değişim meydana gelir (Matsubara vd 1999, Romano vd 2004, Şekil 2.1C). Deniz ve acı su teleostlarına ait oositlerde sitoplazmik olgunlaşmanın en bariz göstergesi

vitellojenlerden meydana gelen YP'lerinin ikinci bir proteolize uğramasıdır (Matsubara vd 2003, Polzonetti-Magni vd 2004, Romano vd 2004, Şekil 2.3). Son yıllarda bu ikinci proteolizin *Morone* cinsinin *Morone chrysops* ve *M. americana* üyelerinde MIH kontrolü altında olduğu bildirilmiştir (Hiramatsu vd 2002c).

2.1.2.3. Mayoz devamı

Araştırmacılar balık ve amfibi oosit olgunlaşması sırasında mayoz devamının MIH'in oosit yüzeyinde mMIHR'e bağlanması ile tetiklendiği konusunda hemfikir durumdadır. Ancak mMIHR yapısı ve transdüksiyon mekanizması hakkında kesin bilgi mevcut değildir.

Xenopus oositlerinde yapılan son çalışmalardan elde edilen sonuçlar mMIHR'ün yeni bir reseptör protein olduğu düşüncesi ile çelişmektedir. Bilinen *Xenopus* progesteron reseptörü (*xenopus* Progesteron Receptor; xPR)'nün yüksek ekspresyonu oositte progesterona bağlı mayoz devamını teşvik etmektedir (Tian vd 2000). Ayrıca progesteronla muamelenin oosit xPR'nün mayoz devamından önce doğrudan fosfatidilinositol 3-kinaz (Phosphatidylinositol 3-kinase; PI3-K)'a bağlanmasına, PI3-K inhibitörleri ile muamelesinin ise progesteron kontrollü olgunlaşmanın durmasına neden olduğu bildirilmiştir (Bagowski vd 2001, Patiño ve Sullivan 2002). Bu nedenle *Xenopus* oositlerinde MIH'a bağımlı mayoz devamı, fosfolipid uyarım metabolik yollarıyla ilişkili klasik bir PR'ünün membrana bağlı formunu da gerektiriyor olabilir (Bagowski vd 2001, Patiño ve Sullivan 2002). Fosfatidilinositol 3-kinaz inhibitörleri ayrıca çizgili levrekte MIH ile tetiklenmiş mayoz devamını da baskılamaktadır (Weber ve Sullivan 2001). Bu da membran fosfolipidlerindeki değişikliklerin teleost oositlerinde MIH aracılığıyla olgunlaşmanın uyarılması mekanizmasının bir parçası olduğunu göstermektedir.

MIH genelde teleost ovaryum follikülünde LH kontrollü mayoz devamı için gerekli ve tek başına yeterli bir kontrol mekanizması olarak bilinse de diğer bazı faktörlerin de bu süreci kontrol ve yönlendirmede etkili olduğu bilinmektedir. IGF-I, aktivinler, epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor; EGF),

transformasyona neden olan büyüme faktörü α (Transforming Growth Factor; TGF α) ve benzeri mekanizmaların olgunlaşma yetisi kazanmış teleost follikülünde mayoz devamını tetiklediği bilinmektedir (Patiño ve Sullivan 2002).

Bir nörotransmitter olan serotoninin *F. heteroclitus* ovaryum follikülünde MIH kontrollü mayoz devamını olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir (Cerdá vd 1998). Araşidonik asit (Arachidonic acid; AA) ve metabolik ürünlerinin levrek ovaryum follikülünde mayoz devamına etki eden biyokimyasal metabolik yolun henüz tanımlanamamış bir adımını kontrol ettiği sanılmaktadır (Sorbera vd 2001). Ancak ne AA, ne de metabolik ürünleri *Micropogonias undulatus* follikülünde MIH'a bağımlı olgunlaşmayı önemli düzeylerde etkilememektedir (Patiño vd 2003).

Heterolog GJ'ların hormon kontrollü mayoz devamındaki rolü genellikle tartışma konusudur. Teleostlar arasında heterolog GJ ayrılması *F. heteroclitus* follikülünde mayoz devamını uyarmak için yeterli olabilmektedir (Cerdá vd 1993). Ancak fonksiyonel GJ kanallarının çizgili levrek (Weber ve Sullivan 2000, 2001) ve *X. laevis* (Patiño ve Purkiss 1993) oositlerinde mayoz devamı için önemi çok daha yüksektir. *M. undulatus* için de fonksiyonel heterolog GJ kanalları ovaryum follikülün büyük bir bölümünde mayoz devamının başlangıcından sonra da bulunmaya devam etmektedir (Yoshizaki vd 2001).

2.1.2.4. Sitoplazma olgunlaşması

Mayoz devamı (nükleer olgunlaşma) süresince yukarıda bahsi geçen olaylar zinciri devam ederken aynı zamanda oositin sitoplazmasında dölleme ve embriyonik gelişim için gerekli olacak bir dizi değişim gerçekleşir. Memeli oositinde bu değişikliklerin tamamı sitoplazmik olgunlaşma olarak adlandırılır (Patiño ve Sullivan 2002). Teleostlarda yumurta kalitesi konusu çevresel etmenler ve beslenme açısından detaylı olarak ele alınmış olsa da bu türlerde olgunlaşmayla alakalı bu ooplazmik değişimlerin yumurta kalitesini nasıl etkilediği konusunda çok az bilgi mevcuttur. Son çalışmalar oosit hidrasyonu ve embriyonik gelişim için gerekli besinlerin ayrıştırılması mekanizmalarına ışık tutmaya başlamıştır. Deniz ve acısu balıklarına ait oositlerde

vitellojenik büyüme aşaması boyunca gerçekleşen Vtg'nin YP'lerine ayrıştığı birincil proteolizi takiben mayoz devamı boyunca ciddi bir hidrasyon ile beraber ikinci bir proteoliz gerçekleşir (Şekil 2.2, Şekil 2.3) (Wallace ve Begovac 1985, Wallace ve Selman 1985). Olgunlaşma süreci ile alakalı bu ikincil proteolitik aşama ilk olarak *F. heteroclitus*'ta keşfedilmiştir (Wallace ve Begovac 1985, Wallace ve Selman 1985). Proteolize uğramamış YP'leri ile FAA'ler arasında olgunlaşma dönemine özgü geçici ters bir ilişki mevcuttur. FAA'ler difüze edilebilir substratlar olduklarından embriyogenez boyunca protein sentezi için gerekli enerji kaynağını oluştururlar (Finn vd 1995ab, Amano vd 2008b).

Salmon oositlerinde bu balıkların embriyolarının YP kullanımları sırasında benzer proteolitik olaylar gözlenmiştir (Hiramatsu vd 2002c). Oosit hidrasyonunun olgunlaşmayla beraber gerçekleştiği balıklarda yumurta sarısı proteinleri proteolizinden ortaya çıkan FAA'lerin oosit içerisine su alımında etkili ozmotik basınç kontrolünde rol aldığı düşünülmektedir (Patiño ve Sullivan 2002).

Oosit hidrasyonu teleostlarda mayozun yeniden devam etmesiyle başlayan ve oositi hiperozmotik yumurtlama ortamına hazırlayan oosit gelişimi ve dolayısıyla üremenin en önemli aşamalarındandır. Dış çevreden veya anne vücudundan kaynaklı uyarıların etkisi altında BPG ekseninin bu uyarılara uygun yanıtları sayesinde, bu sürece özgü geçici olarak oosit plazma zarında oluşan aquaporinler yardımıyla anne ooplazmasından oosite doğru suyun ozmotik akışı olur (Şekil 2.2, Şekil 2.3). Bu sayede embriyo gelişimi süresince ortaya çıkabilecek alternatif ozmotik mekanizmalardan yararlanabilecek duruma gelene kadar yaşamını sürdürebileceği bir su kaynağına sahip olmuş olacaktır (Finn 2007a).

Daha önce bahsedildiği üzere, katepsin B ve L'nin sitoplazmik olgunlaşma döneminde YP'lerinin ayrıştırılmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Carnevali vd 1999b). Ancak, farklı enzimlerin farklı YP'lerinin ayrıştırılmasındaki seçiciliği üzerine henüz çok az çalışma vardır. Sitoplazmik olgunlaşma süresince gerçekleşen YP proteolizinin endokrin kontrolü tam olarak anlaşılmış değildir. MIH'a bağımlı sitoplazmik olgunlaşma işleminin iki temel aşamada gerçekleştiği bilinmektedir.

Bunlardan ilki proteolizden bağımsız olarak gerçekleşen ooplazma berraklaşması, diğeri ise proteolize bağımlı olarak gerçekleşen oosit hidrasyonudur. *Morone* türlerinde yapılan bir çalışmanın sonuçları YP'lerinin proteolizi aşamalarının MIH'a bağımlı gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Hiramatsu vd 2002c). Ooplazma hidrasyonu ve berraklaşmasının bir dizi teleostta daha MIH'a bağımlı gerçekleştiği ortaya konmuştur (Yoshizaki vd 2001).

2.2. Ovulasyon

Oogenezin bu son aşamasında teleost ovaryum follikülünde gerçekleşecek olaylar dizisini tetikleyecek MIH üretimi gerçekleşir. Ancak mayoz devamından farklı olarak ovulasyon, nükleer MIHR (nMIHR) tarafından kontrol edilen MIH'a bağımlı bir transkripsiyonel aktivasyon gerektirir (Patiño ve Sullivan 2002, Patiño vd 2003). Balıklarda bu durum LH etkisi altında üretilen folliküler progesteronun klasik PR'üne bağlanmasıyla ovulasyonun tetiklendiği farelerdeki duruma benzemektedir. Teleost follikülüne ait nMIHR henüz detaylı olarak incelenmemiştir ancak fare follikülündeki PR'e granuloza ve hatta teka hücrelerinde de rastlanmıştır (Patiño ve Sullivan 2002). Mayoz devamı çeşitli uyarıcılar tarafından tetiklenebilse de ovulasyon daha spesifik bir olay olup, genellikle protein kinaz C (Protein Kinase C; PKC) aktivitesi ve amino asit metabolizmasında artışı tetikleyen uyarıcıların kontrolü altındadır.

Hormona bağımlı ovulasyon PKC aktivasyonu gerektirir (Patiño ve Sullivan 2002). *Micropogonias undulatus*'ta MIH bağımlı PKC aktivasyonu transkripsiyonel aktivasyonun hemen ardından gerçekleşir (Patiño vd 2003). Genel literatürde birçok çalışma amino asit metabolizmasına ait siklooksijenaz ve lipoksijenaz metabolik yollarının ovulasyonda oynadığı rolü incelemiştir. Bu iki metabolik yolun fonksiyonlarının birbiriyle ilişkileri üzerine ortak bir fikir olmamasına rağmen (Patiño ve Sullivan 2002) *M. undulatus*'ta yapılan son çalışmalar her iki metabolik yolun da MIH'a bağımlı ovulasyon için aynı derecede önem sahip taşıdığını ortaya koymuştur (Patiño vd 2003).

Ovulasyon, folliküler parçalanma ve olgun ovumun kendisini çevreleyen yapılardan koparak ayrılması işlemlerini içerir (Şekil 2.1D). Ancak teleostlarda ovulasyonu uyarıcı faktörler (amino asit metabolitleri gibi) ile bu işlemler arasındaki bağlantı mekanizmaları hakkında henüz net bir bilgi mevcut değildir. Bazı türlerde ovulasyon çeşitli feromonların neden olduğu davranışların da etkisiyle erkeklerde spermiasyonla senkronize olarak aynı zamanda meydana gelir (Kobayashi vd 2002). Çoğu teleostta ovum somatik hücrelerden tamamen arınarak etrafını çevreleyen koryon ile dış ortama (ovaryum sıvısı veya eksternal su ortamı içerisine) bırakılır. Sperm koryondan ovum içerisine mikropil denilen bir veya birkaç açıklıktan geçerek ulaşır. Spermin yumurta yüzeyi ile teması (döllenme) kortikal alveoli içeriğinin perivitellin boşluğa bırakıldığı kortikal bir reaksiyona neden olur. Bu aşamada ozmotik olarak aktif polisialoglikoproteinler hidrasyona neden olurken metalloproteazlar koryon proteinlerini daha küçük alt ünitelere hidrolize ederler. Bu alt üniteler daha sonra polimerize olarak çözünme yeteneği olmayan koryon proteinlerini oluştururlar (Patiño ve Sullivan 2002). Sertleşen koryon döllenme zarfı olarak da bilinir. Döllenme ayrıca ikinci mayoz bölünmenin devamını ve ikinci polar hücrenin atılımını da tetikler. *Poecilia reticulata* gibi bazı vivipar türlerde döllenme follikülde gerçekleşir ve embriyonun ovulasyonu doğuma kadar ertelenir (Venkatesh vd 1992).

2.3. Yumurta Kalitesi Sorunları ve Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Kalitesi düşük yumurta, mortalitesi yüksek embriyo ve larva veren anaçlarda, muhtemelen Vtg'nin karaciğerde sentezi, oosite taşınması ve reseptör kontrollü endositoz ile hücre içerisine alınması ve burada proteolitik enzimlerce YP'lerine ayrıştırılması mekanizmalarında aksaklıklar meydana gelmektedir. Düşük kalitede yumurtaların yüzebilirliği düşük olmakla beraber, Vtg türevi YP'lerinin proteolizi sonucu ortaya çıkan FAA'ler, fosfolipid ve lipoproteinlere bağımlı olarak beslenen embriyo ve larvaların hayatta kalma oranları düşük olmaktadır (Rees ve Harrell 1990, Sullivan vd 1997). Oosit hidrasyonu ve yüzebilirlik kazanımı, sitoplazmik olgunlaşmaya olanak tanıyacak temel moleküler mekanizmaların doğru işlevi dolayısıyla gelişmekte olan döllere ihtiyaç duyacakları besin havuzunun sağlanması ile ilgili bir süreçtir.

Pelajik yumurtalar bırakan deniz teleostlarından levrek ve çipurada düşük yumurta kalitesi genellikle katepsin geni transkripsiyon ve translasyonlarındaki aksamalar ve bu durumdan olumsuz etkilenen katepsin aktiviteleri ile ilişkilendirilmektedir (Carnevali vd 1999a, 2001, 2006, 2008). Bu bulgular, Vtg'nin YP'lere ayrışmasında etkili katepsin enzim aktivitelerindeki aksamaların oositte sitoplazmik olgunlaşmayı olumsuz etkilediğini, dolayısıyla da yumurta kalitesini ve yüzebilirliğini düşürdüğünü ortaya koymaktadır. Bu türlere ait yüzme yeteneğine sahip yumurtalar iyi kalitede, batma eğilimi gösterenler ise düşük kalitede yumurtalardır. Yumurtanın yüzebilirliğinin oosit olgunlaşması sırasında Vtg türevi YP'lerinin proteolizine bağlı olduğu, yüzme yeteneğine sahip yumurtalarda katepsin L, batan yumurtalara ise katepsin D seviye ve aktivitelerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Katepsin enzim aktivitesindeki problemler, sitoplazmik olgunlaşmadaki aksamalar, dolayısıyla da yumurta yüzebilirliği ve düşük yumurta kalitesiyle ilişkilidir. İlgili neden sonuç ilişkileri henüz araştırmaya açık konulardır.

Benzer problemlerin bir diğer nedeni üç farklı Vtg'nin oositte olması gereken doğru oranlarda birikiminin gerçekleşmemesi olabilir. *Verasper moseri*'de yapılan bir çalışma, LvAa:LvAb:LvC oranlarının büyümesi tamamlanmış oositte sıkı bir kontrol altında olduğunu (Sawaguchi vd 2008) ve bu oranlardaki herhangi bir dengesizliğin yumurta yüzebilirliğini, embriyonik ve larval gelişimi olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. Vitellojenlerden türeyen YP'lerin oosit büyümesi sırasında, yumurta sarısı globülleri şeklinde depolanması ve katepsin enzimlerinin aktivitesindeki artış senkronizedir. Ancak lizozomal proteazlardan katepsin sistemi sanıldığından daha karmaşık olup, bir dizi enzim aktivitesi akışından ibarettir (Carnevali vd 2006). Katepsin aktivitesi ve substrat seçiciliği, uygun pH ve MIH uyarısı altında aktive olan, YP'lerinin asidifikasyonu için gerekli vakuolar H⁺ pompası (vATPaz) ile kontrol edilmektedir. Ayrıca katepsinlerin YP'lerinin proteolizindeki özgünlüğü türler arasında farklılıklar gösterebilmektedir (Matsubara vd 2003). Diğer yandan yumurtada Vtg veya katepsin seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmazken, olgunlaşması sırasında oosit hidrasyonunda aksamalar görülmesi enzim aktivitesinin, GnRH-LH-MIH metabolik yolu (BPG eksen) tarafından aktivasyonunda sorunlar olduğunun belirtisidir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneysel Balıklar ve Doku Örnekleri

Vitellogenlere ait cDNA dizilerinin, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ürünlerinin doğrudan sekanslanması yoluyla elde edilmesinde kullanılan karaciğer doku örnekleri, ortalama 2223.50 ± 448.17 g ağırlık, 37.67 ± 1.86 cm boya sahip 3 yaş grubuna ait olgun erkek bireylerden alınmıştır. Balıklar, Antalya Beymelek Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü (AKSAM) yetiştiricilik ünitesinde 10 m^3 hacime sahip silindirik fiberglas tanklarda $18 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de deniz suyu sirkülasyonu altında tutulmuş ve günde iki defa doyuncaya kadar ticari anaç yemleriyle beslenmişlerdir. Karaciğerden vitellogen sentezi, 7 günlük aralıklarla 0, 7 ve 14'ncü günlerde kilogram ağırlık başına 5 mg dozunda gerçekleştirilen üç ayrı intraperitoneal $17\beta\text{-E}_2$ (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis) enjeksiyonu ile tetiklenmiştir. Kullanım öncesinde E_2 , 5 mg ml^{-1} oranında propilen glikol solüsyonu içinde çözdürülmüş, $20 \text{ }\mu\text{m}$ göz açıklığına sahip poliviniliden diflorid (Polyvinylidene difluoride; PVDF) filtreden geçirildikten sonra $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Balıklar her enjeksiyon ve örnekleme öncesi 15 mg L^{-1} karanfil yağı kullanılarak uyuşturulmuştur. Enjeksiyonlar sırasında iç organların hasar görmesini önlemek amacıyla karın boşluğuna doğru açıyla girilmesine özen gösterilmiştir. Son E_2 enjeksiyonundan bir hafta sonra balıklar karaciğer doku örnekleme için disekte edilmiş alınan doku ince parçalara ayrılmış ve RNA'nın RNaz enzimlerince indirgenmesini önlemek amacıyla doğrudan Ambion® RNAlater (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) içerisinde ($1 \text{ g doku } 5 \text{ ml}^{-1}$ RNAlater) $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Bu örnekler; 1) PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması yoluyla Vtg dizilerinin eldesi için cDNA sentezinde RNA kaynağı olarak (Bkz. 3.4. Levrekte Üç Farklı Vitellogen Formunu Kodlayan cDNA Tam Dizilerinin Ortaya Konması), 2) erkeklerde karaciğerden Vtg sentezinin E_2 ile tetiklenmesinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin kütle spektrometrisi analizi ile kontrolü amacıyla karaciğer ekstraktı olarak (Bkz. 3.2. Karaciğerde Vitellogen Sentezinin Estradiol ile Tetiklenmesinin Kütle Spektrometre Analizi ile Kontrolü) kullanılmıştır. Ayrıca negatif kontrol olarak kullanılmak üzere $17\beta\text{-E}_2$ ile uyarılmamış bir erkek bireye

ait karaciğer doku örneği daha 0'ncı günde alınmış diğer doku örnekleriyle aynı şekilde muamele edilmiş ve aynı şartlarda saklanmıştır.

İspanya'da Torre la Sal Su Ürünleri Enstitüsü (Instituto de Acuicultura de Torre la Sal; IATS (CSIC), Castellón, Spain) yetiştiricilik ünitesinde üretilen dişi levrek bireyler cinsi olgunluğa eriştikleri birinci üreme sezonu postvitellojenik (PV) ve ovulasyon (OV) gonadal gelişim aşamalarında kan, karaciğer ve ovaryum temini için F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından örneklenmiştir. Bu araştırmacılar gonad gelişim aşamalarını Mayer ve diğerleri (1988)'e göre belirlemişlerdir. Örneklenen plazma ve doku örnekleri tarafımıza kuru buz içerisinde iletilmiş sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis; SDS-PAGE), Western blot (*Bkz. 3.5. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Kan Plazmasında ve Ovaryumda SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemleri ile Saptanması*) ve kütle spektrometrisi (*Bkz. 3.6. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Postvitellojenik Dişi Karaciğer, Plazma ve Ovaryumundaki Miktarlarının Kütle Spektrometre Analizi ile Saptanması*) analizlerinde kullanılabileceği kadar -70 °C'de saklanmıştır. Söz konusu doku örneklerinin yanısıra IATS'dan ayrıca F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından örneklenen bu dişilere ait estradiol seviyeleri ve ovaryum histolojik kesit resimleri gibi bazı veriler de bu çalışmada kullanılmak üzere laboratuvarımıza iletilmiştir. Bu araştırmacıların bildirdiğine göre estradiol seviyeleri Rocha ve diğerleri (2009)'nin belirttiği üzere geleneksel enzim immünolojik yöntemi (Enzyme Immunoassay; EIA) kullanılarak ölçülmüş, ovaryum histolojik kesit resimleri elde edilmek üzere dokular önce % 4 formaldehit:% 1 glutraldehit (McDowell ve Trump 1976) içerisinde fikse edilmiş, metakrilat polimer rezin içerisine gömülmüş ve 3 µm'luk kalınlıklarda kesilerek Bennett ve diğerleri (1976) tarafından belirtildiği üzere boyanmıştır.

Yine IATS (CSIC) yetiştiricilik ünitesi stoklarından sekiz yetişkin erkek birey, kontrol gruplarını oluşturmak üzere F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından örneklenmiştir. Bunlardan, pozitif kontrol grubu olarak ilk dört erkek levreğe her iki güne bir zeytin yağı içerisinde çözündürülmüş E₂ (1.5 mg kg⁻¹ dozunda), negatif kontrol grubu olarak diğer dört erkek levreğe sadece 800 µl zeytin yağı enjeksiyonları uygulanmıştır. Son

enjeksiyondan iki gün sonra bu balıklardan alınan plazma ve karaciğer örnekleri tarafımıza kuru buz içerisinde iletilmiş Western blot analizlerinde kontrol grupları olarak kullanılabilecek kadar -70 °C’de saklanmıştır (Bkz. 3.5. *Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Kan Plazmasında ve Ovaryumda SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemleri ile Saptanması*). Estradiol içeren zeytin yağı enjekte edilmiş erkeklere ait karaciğer örnekleri, levrek Vtg’lerinin moleküler klonlanmasında cDNA üretiminde RNA kaynağı olarak kullanılmak üzere RNAlater içerisinde muhafaza edilmiştir (Bkz. 3.4. *Levrek Üç Farklı Vitellojen Formunu Kodlayan cDNA Tam Dizilerinin Ortaya Konması*). Bu çalışmada kullanılan balıklar, cinsiyetleri ve orijini, bu örneklerin kullanıldıkları deneysel prosedürler ve bu deneylerin gerçekleştirildiği laboratuvarlar Çizelge 3.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Bu çalışmada farklı deneysel prosedürlerde kullanılmış örnekler.

| DENEYSEL PROSEDÜR | CİNSİYET | KAYNAK | LAB | EKIP |
|--|---|--------------------|---|--|
| Karaciğerde Vitellojen Sentezinin Estradiol ile Tetiklenmesinin Kütle Spektrometre Analizi ile Kontrolü | Erkek (C ⁵ , E ⁶) | AKSAM ¹ | AKSAM/ ² SBAUM/ ⁴ NCSU | ¹¹ OY OY ⁹ CVS lab |
| Levrekte Üç Farklı Vitellojen Formunu Kodlayan cDNA Tam Dizilerinin Ortaya Konması (Doğrudan sekanslama) | Erkek (E) | AKSAM | SBAUM | OY |
| Levrekte Üç Farklı Vitellojen Formunu Kodlayan cDNA Tam Dizilerinin Ortaya Konması (Klonlama) | Erkek (E) | IATS ³ | IATS/NCSU | ¹⁰ FP lab CVS lab |
| Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Kan Plazmasında ve Ovaryumda SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemleri ile Saptanması | Erkek (C, E) Dişi (PV ⁷ , OV ⁸) | IATS | NCSU | OY |
| Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Postvitellojenik Dişi Karaciğer, Plazma ve Ovaryumundaki Miktarlarının Kütle Spektrometre Analizi ile Saptanması | Dişi (PV) | IATS | NCSU | OY |

¹AKSAM (Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü, Antalya)

²SBAUM (Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Antalya)

³IATS (Torre la Sal Su Ürünleri Enstitüsü, Castellón de la Plana, İspanya)

⁴NCSU (North Carolina State Üniversitesi, Raleigh, A.B.D.)

⁵C (Negatif kontrol); ⁶E (Pozitif kontrol); ⁷PV (Postvitellojenik ovaryum); ⁸OV (Ovulasyona uğramış ovaryum)

⁹CVS lab (C.V. SULLIVAN ve B.J. READING)

¹⁰FP lab (F. PRAT ve A. IBANEZ)

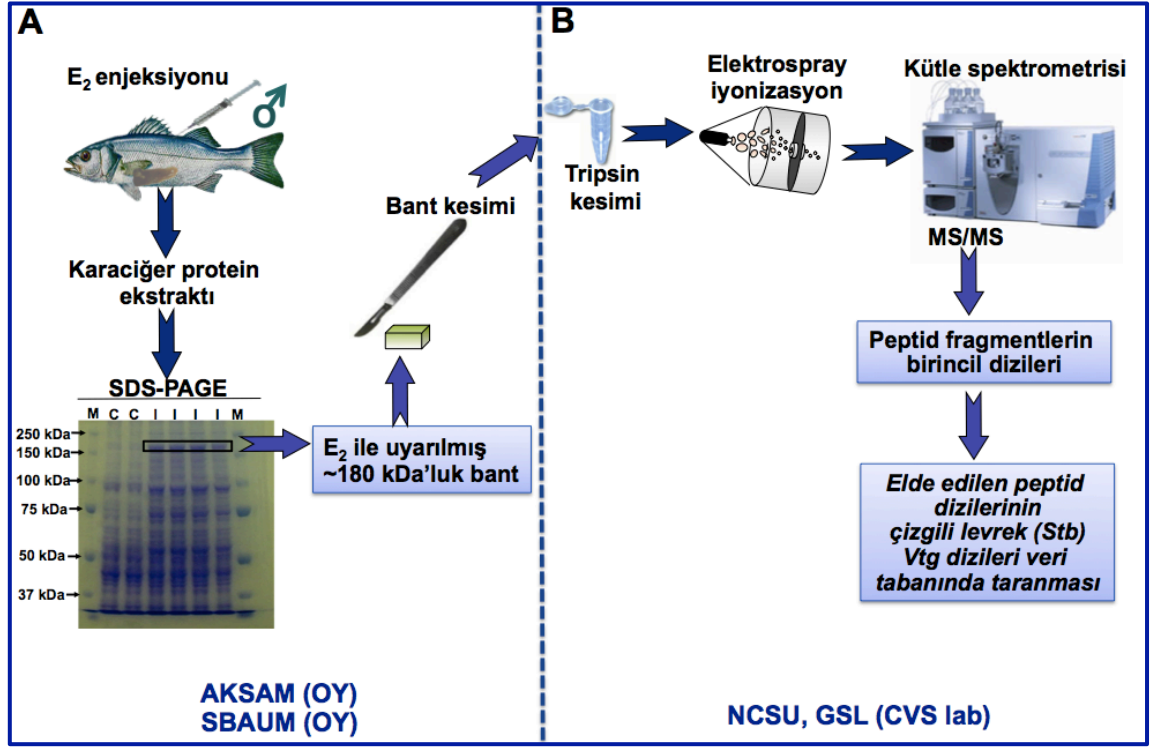
¹¹OY (O. YILMAZ)

3.2. Karaciğerde Vitellojen Sentezinin Estradiol ile Tetiklenmesinin Kütle Spektrometre Analizi ile Kontrolü

Bu çalışmanın PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması aşamasında cDNA üretiminde RNA kaynağını oluşturan karaciğer dokuları, vitellojen üretimini tetiklemek amacıyla, AKSAM yetiştiricilik ünitelerinde E₂ ile uyarılmış erkek bireylerden elde edilmiştir (Çizelge 3.1A, Şekil 3.1A). Karaciğerde istenilen uyarının gerçekleşip gerçekleşmediğini anlayabilmek için doku ekstraktları % 7'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis; SDS-PAGE) üzerinde ayrıştırılmıştır. Dokulardan protein izolasyonu, ReadyPrep Protein Extraction Kit (Bio-Rad)'in üretici firma tarafından önerilen protokole göre kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve E₂ uygulanmış bireylere ait karaciğer ekstraktlarının protein konantrasyonları Bradford yöntemi (Bradford 1976) ile ölçüldükten sonra örnekler (12-20 µg protein ml⁻¹) β-merkaptoetanol (β-mercaptoethanol; BME, 50 µl ml⁻¹) içeren Laemmlı tampon ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılmış kaynar suda 5 dk bekletildikten sonra her kuyucuğa 50 µg protein gelecek şekilde jele yüklenmiştir. Yükleme jeli (Stacking gel) laboratuvar şartlarında, % 4 Acr, 0.5 M Tris-HCl buffer (pH: 6.8) içerisinde % 0.1 SDS, % 0.1 APS ve % 0.1 TEMED karıştırılarak hazırlanmıştır. Ayrıcı jel (Resolving gel) ise 1.5 M Tris-HCl buffer (pH: 8.8) içerisinde % 7 akrilamid (Acrylamide; Acr, Sigma-Aldrich) % 0.1 SDS (Sigma-Aldrich), % 0.1 amonyum persülfat (Ammonium Persulphate; APS, Sigma-Aldrich) ve % 0.1 tetrametiletilediamin (Tetramethylethylenediamine; TEMED, Sigma-Aldrich) karıştırılarak hazırlanmıştır. Elektroforez, 0.01 M Tris-glisin tampon çözelti (Laemmlı 1970) içerisinde yükleme jeli için 80 V, ayrıcı jel için ise 120 V'ta 2 saat boyunca yürütülmüştür. Bu süre sonunda jel metanol:asetik asit:distile su (2:1:7 v/v) solüsyonu içerisinde Comassie parlak mavi (Comassie Brilliant Blue R-250; CBB, Amhersham Biotech) ile gece boyunca boyanmış ertesi gün metanol:asetik asit:distile su (5:1:4 v/v) yıkama solüsyonu ile her 20 dk'da solüsyon değiştirmek suretiyle temiz bir görüntü elde edilene kadar yıkanmıştır (Şekil 3.1A).

SBAUM'nde gerçekleştirilen bu işlemler sonucunda, protein bantlarının moleküler büyüklükleri, Precision Plus Protein All Blue Standarts (Bio-Rad) standart

protein karışımı referans alınarak görsel olarak tespit edilmiştir. Vitellojenlere karşılık geldiği tahmin edilen ~180 kDa büyüklüğünde bir protein bandı jelden kesilerek ardışık kütle spektrometre (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry; LC-ESI/MS/MS) analizi için NCSU Genomik Bilimler Laboratuvarı (NCSU Genomic Sciences Laboratory; NCSU GSL, Raleigh, NC)'na gönderilmiştir. Burada, sıvı kromatografi ayrıştırması, elektropüskürtme iyonizasyonu ve LC-ESI/MS/MS sonucunda elde edilen peptid spektra taramalarında çizgili levrek vitellojenleri (GenBank StbvtgAa; HQ846509.1, StbvtgAb; HQ846510.1, StbvtgC; HQ846511.1. V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış)'ni de içeren bir protein veri tabanı kullanılmıştır (Şekil 3.1B).



Şekil 3.1. Karaciğerde vitellojen sentezinin estradiol ile tetiklenmesinin kütle spektrometre analizi ile kontrolü. A. Balıkların estradiol ile uyarılması ve karaciğer örnekleme. B. Jelden kesilen protein bandının tripsin kesimi ve kütle spektrometre analizi. AKSAM: Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü, SBAUM: Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi, NCSU: North Carolina State Üniversitesi, CVS lab: C.V. SULLIVAN ve B.J. READING, OY: O. YILMAZ.

3.3. Paralog Terminoloji

Bu çalışmada acantomorph teleostlara ait vitellojenlerin (VtgAa, VtgAb, ve VtgC) adlandırılmasında kullanılan terminoloji, Finn ve Kristoffersen (2007) tarafından önerilen ve tüm genom duplikasyonu (WGD) ile soya özgü gen duplikasyonuna dayanan yeni bir sınıflandırmaya göre yapılmıştır. Bu yeni sınıflandırmaya göre literatürde ortak bir dil kullanımını kolaylaştırmak açısından her üç vitellojen için önceden kullanılmış “gen (protein)” şeklinde verilen *vtg1(I)* veya *vga* (Vtg1(I) veya VtgA) adlandırmaları, yeni sınıflandırmaya göre *vtgAa* (VtgAa) olarak ve *vtg2(II)* veya *vgb* (Vtg2(II) veya VtgB) adlandırmaları da yeni sınıflandırmada *vtgAb* (VtgAb) olarak düzeltilmiştir (Finn 2007). Fosvitinsiz *vtg* tipi ise bütün teleostlar arasında R2 WGD (Finn ve Kristoffersen 2007) ürünü olarak *vtgC* (VtgC) şeklinde adlandırılmıştır. Diğer türler üzerine yapılan önceki çalışmalardan elde edilen bulgularla yapılan karşılaştırmalarda kullanılan vitellojen dizilerinin gen ve protein isimleri, ilgili yayında yazar tarafından kullanıldıkları şekilde belirtilmiştir.

3.4. Levrekte Üç Farklı Vitellojen Formunu Kodlayan cDNA Tam Dizilerinin Ortaya Konması

Üç farklı levrek (Sbs) vitellojenine (SbsVtgAa, SbsVtgAb, ve SbsVtgC) ait cDNA tam dizileri Şekil 3.3'te belirtilen iki ayrı stratejinin (PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması ve klonlama ile elde edilen ürünlerin sekanslanması) kombinasyonu ile elde edilmiştir. Çalışmanın her aşamasında kullanılan PCR ve 5'/3' RACE PCR primerleri (kit primerleri hariç), nükleotid dizileri, levrek *vtg* tam nükleotid dizileri üzerindeki pozisyonları, protein dizileri üzerinde karşılık geldikleri YP alt birimleri, kullanım amaçları (doğrudan sekanslama (D) veya klonlama (C) ve beklenen ürün büyüklüğü (bç) Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

3.4.1. PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması

Çalışmamızın bu bölümünde Sawaguchi ve diğerleri (2006) ile Reading ve diğerleri (2009) tarafından tasarlanmış dejenere veya konsensüs primerlerin yanı sıra,

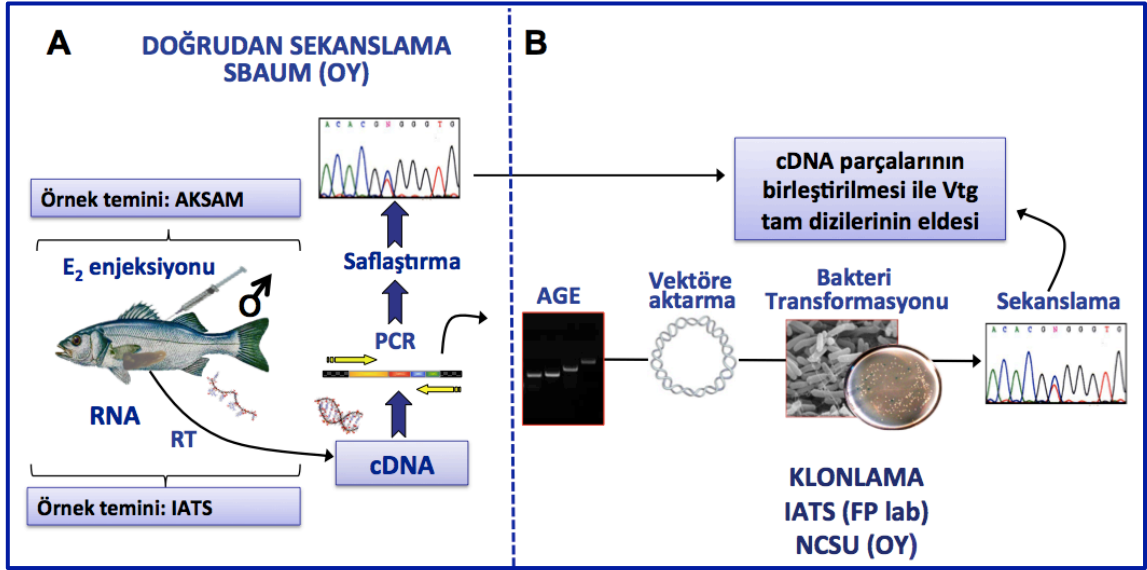
çizgili levrek *vtg* cDNA dizilerinin ortaya konmasında kullanılmak üzere kefal (Amano vd 2007a), mercan (Sawaguchi vd 2006) ve beyaz levrek (Reading vd 2009) *vtgAa*, *vtgAb* ve *vtgC* nükleotid dizilerinin karşılaştırmasına dayanarak C.V. SULLIVAN laboratuvarında tasarlanmış (V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış) primerler kullanılmıştır. Bu primerler tarafından tasarlandıkları yazar isimlerinin ilk harfleriyle (SS, VNW, BJR) adlandırılmış olup, sahip oldukları nükleotid dizileri ve bu çalışmadan elde edilen levrek *vtg* cDNA tam dizileri üzerindeki pozisyonları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Bundan sonraki aşamada yine çizgili levrek için tasarlanmış *vtg* genine ve türe özgü primerler kullanılmış, bunlar SB (striped bass) harfleriyle adlandırılmıştır. Söz konusu primerlerin isimleri, nükleotid dizileri ve levrek *vtg* cDNA dizileri üzerindeki pozisyonları Çizelge 3.2.'de görüldüğü gibidir. Levrek *vtg* cDNA dizilerine ait 5' ve 3' uçlarının ortaya konmasında, cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends PCR; RACE PCR) kullanılmıştır. Burada, yine çizgili levrek için tasarlanmış *vtg* genine ve türe özgü dejenere 'outer' (3' RACE A [O], 5' RACE A [O], 3' RACE B [O], 5' RACE B [O], 3' RACE C [O], 5' RACE C [O]) ve sgene özgü 'inner' primerler (3' RACE A [I], 5' RACE A [I], 3' RACE B [I], 5' RACE B [I], 3' RACE C [I], 5' RACE C [I]), 5'/3' RACE Kit (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) primerleriyle eşleştirilerek kullanılmış, elde edilen PCR ürünü ampikonlar yine doğrudan sekanslamaya tabi tutulmuştur. Doğrudan sekanslama stratejisinin en son aşamasında ise yukarıda sözü edilen uygulamalardan elde edilen levrek *vtg* cDNA'larına ait kısmi dizilere dayanarak tasarlanan, cDNA dizisine ve türe özgü bir primer seti (VTGA DL1 [F], VTGA DL1 [R], VTGA DL2 [F], VTGA DL2 [R], VTGA DL3 [3'RACE], VTGB DL1 [F], VTGB DL1 [R], VTGB DL2 [F], VTGB DL2 [R], VTGC DL1 [F], VTGC DL1 [R]) kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Bu aşamada kalıp olarak kullanılmak üzere E₂ ile uyarılmış erkek levrek karaciğer doku örnekleri kullanılmıştır. Bu bireylerde estradiol ile vitellojen sentezinin tetiklenmesi işlemi AKSAM yetiştiricilik ünitelerinde, diğer deneysel işlemler ve analizler ise SBAUM'nde O. YILMAZ tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2A). Buna göre, örneklenen karaciğer dokularından total RNA izolasyonu, RNeasy Mini Kit (Qiagen) ve cDNA sentezi ise Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche

Applied Science, Madison, WI) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonlarının MgCl₂ konsantrasyonları optimize edildikten sonra 20 µl hacime sahip her bir reaksiyon 1.75 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (her biri 10 mM), 1 mM primer, 0.05 u enzim karışımı (Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science)), ve ~10 ng cDNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR protokolü;

| | | | | |
|----------|------------------|-------|-------|----------|
| | İlk denatürasyon | 94 °C | 2 dk | |
| 30 Döngü | Denatürasyon | 94 °C | 30 sn | 30 Döngü |
| | Eşleşme | 48 °C | 30 sn | |
| | Uzama | 68 °C | 1 dk | |
| | Final uzama | 72 °C | 15 dk | |

şeklinde uygulanmış eşleşme sıcaklıkları her bir primer setinin ayrılma sıcaklıkları (Melting Temperature; T_m)'na ve uzama sıcaklıkları ise her bir ürün ampikonun beklenen büyüklüğüne (bç) göre ayarlanmıştır. Her bir *vfg* cDNA dizisine ait 5' ve 3' uçlarının eldesinde 5'/3' RACE Kit (Roche Applied Science) ve kalıp olarak aynı kaynaktan karaciğer cDNA'sı kullanılmış, PCR reaksiyonları üretici firmanın tavsiye ettiği protokole belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ve RACE PCR ürünlerinin 5 µl'si % 1 agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş beklenen büyüklüğe sahip bantlar jelden kesilerek High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science) kullanılarak saflaştırıldıktan sonra Macrogen (Macrogen, Seul, Kore)'e dizi analizi için gönderilmiştir (Şekil 3.2A).



Şekil 3.2. Levrek vitellojen cDNA tam dizilerinin ortaya konmasında kullanılan yöntemler. A. PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması B. PCR ürünlerinin klonlanması ve sekanslanması. AKSAM: Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü, SBAUM: Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi, IATS: Torre la Sal Su Ürünleri Enstitüsü, NCSU: North Carolina State Üniversitesi, FP lab: F. PRAT ve A. IBANEZ, OY: O. YILMAZ.

3.4.2. PCR ürünlerinin klonlanması ve sekanslanması

Levrek Vtg cDNA dizilerinin ortaya konmasında uyguladığımız diğer bir yöntem de PCR ürünlerinin klonlanarak sekanslanması olmuştur. Bu uygulamanın birinci bölümü, IATS'nde FP laboratuvarında F. PRAT ve A. IBAÑEZ (yayınlanmamış) tarafından diğer türlere ait *vtgAa* ve *vtgAb* dizilerinin karşılaştırılmasıyla belirlenmiş olan korunmuş bölgelerden tasarlanan FP A1 [F], FP A1 [R], FP B1 [F] ve FP B1 [R] primerleri kullanılmıştır. Bu araştırmacıların bildirdiğine göre söz konusu primerler tasarlanırken VtgAa için; *F. heteroclitus vtg1* (U07055), *Rivulus marmoratus vtg* (AY279214), *O. latipes vtg1* (AB064320), *Sillago japonica vtg* (AB081299), *M. aeglefinus vtgA* (AF284034), *Achantogobius flavimanus vg-530* (AB088473) ve VtgAb için; *F. heteroclitus vtg2* (U70826), *O. latipes vtg2* (AB074891), *O. aureus vtg1* (AF017250), *M. aeglefinus vtgB* (AF284034), ve de *O. mykiss vtg1* (X92804) karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada RNA izolasyonu, cDNA sentezi, Vtg cDNA parçalarının 'touchdown' PCR yoluyla çoğaltılması ve Ibañez ve diğerleri (2008)'nin belirttiği şekilde klonlanması F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından gerçekleştirilmiş, pozitif klonların sekanslanması ile elde edilen kısmi *vtgAa* ve *vtgAb* dizileri tarafımıza gönderilmiştir (Şekil 3.2B).

Klonlama uygulamasının ikinci aşamasında, doğrudan sekanslama yoluyla ve klonlamanın birinci aşamasından elde edilen kısmi dizilere dayanarak tarafımızdan tasarlanmış ve 'sea bass' kısaltması olan 'Sbs' ile adlandırılmış olan *D. labrax*'a özgü primerler kullanılmıştır. Burada RNA kaynağı olarak, Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi IATS'nden temin edilmiş F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından E₂ ile uyarılmış erkek bireylere ait karaciğer dokuları kullanılmıştır. Bu dokulardan total RNA izolasyonu, cDNA üretimi, PCR, agaroz jel elektroforezi, vektöre klonlama, bakteri transformasyonu, ve pozitif klonlardan DNA izolasyonu işlemleri O. YILMAZ tarafından NCSU laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2B). Burada, total RNA izolasyonunda Trizol Reagent (Invitrogen™ Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), üretici firmanın önerdiği protokole göre kullanılmıştır. Total RNA'dan cDNA sentezi, Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen™) yardımıyla yine üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Levrek *vtg* cDNA

dizileri ve bunlara ait 5' ile 3' uçları, yukarıda sözü edilen gene özgü primerler kullanılarak çoğaltılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonları, Platinum PCR SuperMix (Invitrogen™) ve üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak gerçekleştirilmiş ve karaciğer dokularından elde edilen cDNA bu reaksiyonlarda kalıp olarak kullanılmıştır. Levrek *vtg* cDNA dizilerine ait 5' ve 3' cDNA uçlarının çoğaltılmasında 5'- ve 3'-RACE PCR reaksiyonları, Choice® RLM-RACE Kit (Ambion®) yardımıyla üretici firmanın önerdiği protokole göre hazırlanmıştır. Yukarıda sözü edilen trizol ile izole edilmiş hepatik RNA, RACE PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılacak olan cDNA'nın sentezlenmesinde başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Elde edilen ampliconlar ve DNA büyüklüklerini belirlemek için kullanılan standart (Sigma Aldrich), 1µg µl⁻¹ etidyum bromür (EtBr) içeren % 1.2'lik agaroz jel elektroforezinde 120 V'ta 45 dk yürütülmüş ve sonrasında jel UV transilluminatör altında görüntülenmiştir. İstenilen büyüklüklere sahip *vtg* ampliconları, jelden kesilerek GeneClean II kit (BIO 101 Systems, Vista Ca) yardımıyla izole edilmiş ve TA Cloning® Kit Dual Promoter with One Shot™ competent Top 10F' cells (Invitrogen™) kullanılarak pCR®II vektör'e yerleştirildikten sonra *E. coli* bakteri transformasyonunda kullanılmıştır. Yaklaşık 4-6 arasında pozitif transformant bakteri kolonisi kültüre alınmış, plazmid DNA Qiagen Miniprep DNA Purification System (Qiagen Inc., Valencia, CA) aracılığıyla izole edilmiş ve sekanslanmak üzere University of Chicago Cancer Research Cancer DNA Sequencing Facility (Chicago, IL)'ya gönderilmiştir (Şekil 3.2B).

Doğrudan sekanslama ve klonlama uygulamalarından parçalar halinde elde edilen PCR ve RACE PCR ürünü cDNA dizileri birleştirilerek bütün hale getirilirken, her bir *vtg*'ye ait kısmi cDNA parçalarının (Şekil 3.3) örtüşen kısımları, MacVector™ (Oxford Molecular Ltd., Cambridge, UK) ClustalW (v1.83) algoritması (Thompson vd 1994) ve karşılaştırmalı analizler kullanılarak belirlenmiştir. Her bir *vtg*'ye ait tam cDNA dizileri birleştirilmeden önce, PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanmasıyla elde edilen kısmi diziler (Şekil 3.3) her iki uçta da bulunan güvenilir kısımlardan, klonlanan PCR ampliconlarının sekanslanmasıyla elde edilmiş kısmi diziler (Şekil 3.3) ise vektör dizilerinden arındırılmıştır. Bu kısmi dizileri taşıyan her bir parçanın,

güvenilmez diziler ve vektör dizilerinden arındırılmış haliyle, *vtg* cDNA tam dizileri (5' ve 3' UTR bölgeleri dahil) üzerindeki pozisyonları, büyüklükleri (bç) ve protein dizileri üzerinde karşılık geldikleri YP alt birimleri Çizelge 3.3.'te verilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen *vtg* tam cDNA dizileri güncel yayınlarda geçen akraba türlere ait diziler, ve/veya National Center for Biotechnology Information (NCBI)'da Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) network servisi (Altschul vd 1990)'nde yer alan *vtg* gen dizileriyle MacVector™ ClustalW algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır (Thompson vd 1994).

Birleştirilmiş *vtg* tam cDNA dizilerinin karakteristik ve fonksiyonel özelliklerinin ortaya konmasında aşağıda adı geçen biyoinformatik yazılımlar ve internet üzerinden erişilebilen algoritmalar kullanılmıştır. Buna göre,

- 1) Protein dizilerinin amino asit kompozisyonlarının belirlenmesinde;
ExPasy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>),
- 2) Sinyal peptid ve potansiyel ayrışma bölgelerinin tahmininde;
Emboss Explorer Pestfind ve Sigcleave algoritmaları
(<http://emboss.bioinformatics.nl/>),
- 3) Nükleotid dizilerine ait poliadenilasyon signal bölgeleri tahmininde;
PolyApred Algorithm (<http://www.imtech.res.in/raghava/polyapred/>),
- 4) O- ve N- glikolizasyon bölgeleri tahmininde;
NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) ve
NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>),
- 5) Fosforilasyon bölgeleri tahmininde;
NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>),
- 6) Peptid dizilerine ait tahmini moleküler ağırlıkların hesaplanmasında;
EnCor Biotechnology Inc. Prot-MW
(<http://www.encorbio.com/protocols/Prot-MW.htm>)

sunucularından faydalanılmıştır. Levrek *Vtg* dizilerinin diğer teleostlara ait diziler ile aralarındaki homoloji analizleri, peptid dizileri üzerinde aynı amino asitlerin taşınması birebir özdeşliği, aynı kimyasal özelliklere sahip amino asitleri bulundurma durumu ise benzerliği ifade edecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Bu çalışmada kullanılan primer isimleri ve nükleotid dizileri. Primer isimleri ‘Primer Adı’, bunların nükleotid dizileri ‘Primer Dizisi’, her bir primerin levrek *vtg*’leri için elde edilen tam cDNA dizileri (5’ ve 3’ UTR dahil) üzerindeki pozisyonları bunlara ait başlangıç ve bitiş nükleotidleri ile ‘Primer Pozisyonu’ kolonlarında verilmiştir. Bu primerlerin kısmen kodladığı *Vtg* YP alt birimleri ‘*Vtg* Alt Birimi’, kullanıldıkları uygulama da ‘Amaç’ kolonunda verilmiştir.

| Primer Adı | Primer Dizisi (5’ - 3’) | Primer Pozisyonu | Vtg Alt Birimi | Amaç |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------|----------------|------|
| Vtg Aa Primerleri | | | | |
| 5’ RACE A [O] | GCC TTG TCG TCT TCA GTG ATG G | 539-518 | LvHAa | D |
| 5’ RACE A [I] | CTG CCA AGG CTG AAG TCA GT | 319-300 | LvHAa | |
| SS A [F] | AGC TYG TRG GAA CCT GAG CTC | 230-249 | LvHAa | D |
| SS A [R] | TAT GCC ACC CCK ATG TCY TT | 617-598 | LvHAa | |
| VNW A1 [F] | CWG ARG CCA TYA AGC WGS TTG AG | 1247-1269 | LvHAa | D |
| VNW A1 [R] | TTG TGG CAG CAT CAT TGA TGT AG | 1987-1965 | LvHAa | |
| VNW A5 [F] | GAC CAR TYT TGA YGA AGC TDA AG | 3212-3234 | LvH/PvAa | D |
| VNW A5 [R] | CTT GGA CCA ACA AGA CCA GT | 3851-3832 | LvLAa | |
| VNW A6 [F] | TTG TCT TGC TAY CAR RTT CTG | 4246-4266 | β’cAa | D |
| VNW A6 [R] | CRG CWK GCA GAA YCC AGG AAT | 4693-4673 | CtAa | |
| SB A7 [F] | CCA TCA CTG AAG ACG ACA AAG C | 518-539 | LvHAa | D |
| SB A7 [R] | GGG GTT TCC ACT ATT TTG CTG TTG | 1304-1281 | LvHAa | |
| SB A8 [F] | TGC TGC TGC CAG TGC TTT CTA C | 1947-1968 | LvHAa | D |
| SB A8 [R] | AGA TGA GGA GGA TGA GGT GCT ATT C | 3282-3258 | PvAa | |
| SB A9 [F] | ACA ACA CCA TAA TCA CAG CCG AG | 3809-3831 | LvLAa | D |
| SB A9 [R] | CAC AGA GAT ACC CTC ACC ATT TGG | 4494-4471 | β’cAa | |
| 3’ RACE A [O] | GTG AGG GTA TCT CTG TGT | 4478-4495 | β’cAa | D |
| 3’ RACE A [I] | GTG GAC TGG ATG AAG GGA CAG A | 4558-4579 | β’cAa | |
| VTGA DL1 [F] | AGC TCA GGC TTT GAT TGC ATC CA | 1203-1225 | LvHAa | D |
| VTGA DL1 [R] | TCA GAA GAG CCT CTT GGA GTC CT | 2095-2073 | LvHAa | |
| VTGA DL2 [F] | TCT TGC AGA CCA TCT CAA GGG AG | 2822-2844 | LvHAa | D |
| VTGA DL2 [R] | GAA TCA AGC CAG CCA GCA TGG A | 3961-3940 | LvLAa | |
| VTGA DL3 [3’RACE] | CAA CGG ACG CTT GAC CAA GAA CG | 4635-4657 | CtAa | D |
| FP A1 [F] | GYW CHR AKG AGC TNA AAT TCA T | 4278-4298 | β’cAa | C |
| FP A1 [R] | CCA RGA DWG RGC RWA GCT GA | 4680-4661 | CtAa | |
| Sbs A 5’RACE [O] | TGT CAA AAG GAT GCG TTC AGC C | 558-537 | LvHAa | C |
| Sbs A 5’RACE [I] | TCT TGA TGT TGA GCT GAA GGA | 454-434 | LvHAa | |
| Sbs A II [F] | TCC TTC AGC TCA ACA TCA AGA | 434-454 | LvHAa | C |
| Sbs A II [R] | TTT GCT GTT GAT TGC CAG AG | 1290-1271 | LvHAa | |
| Sbs A III [F] | TCA AAA TCC TGA GCC CAA AG | 1856-1875 | LvHAa | C |
| Sbs A III [R] | CCA GAC TTT CAA TGG CTT CC | 3127-3108 | LvHAa | |
| Sbs A IV [F] | AGC TCA AGT TCC TCC TCC AGA | 3406-3426 | PvAa | C |
| Sbs A IV [R] | CCC TTC ATC CAG TCC ACA AC | 4574-4555 | β’cAa | |
| Sbs A 3’RACE [O] | GAT ATT GAC CTG TAC CCG AAG | 4360-4380 | β’cAa | C |
| Sbs A 3’RACE [I] | GTT GTG GAC TGG ATG AAG GG | 4555-4574 | β’cAa | |

R=A veya G, N=A veya C veya G veya T, Y=C veya T, S=C veya G, W=A veya T, K=G veya T, M=C veya A

[F]: Forward, [R]: Reverse, [O]: Outer, [I]: Inner

D: PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması

C: PCR ürünlerinin klonlanması ve sekanslanması

LvH: Ağır zincirli lipovitellin

Pv: Fosvitin

LvL: Hafif zincirli lipovitellin

β’c: β’-component

Ct: Ct-component

Devamı Arkada

Çizelge 3.2'nin Devamı

| Primer Adı | Primer Dizisi (5' - 3') | Primer Pozisyonu | Vtg Alt Birimi | Amaç |
|-------------------------|------------------------------------|------------------|----------------|------|
| VtgAb Primerleri | | | | |
| 5' RACE B [O] | TCT CCT GGC AGT GGT TCA TG | 587-568 | LvHAb | D |
| 5' RACE B [I] | AGG CTC TTG CAG CTC GTA GA | 484-465 | LvHAb | |
| SS B [F] | GTT TGA GTA TGC CAA CGG TGT | 340-360 | LvHAb | D |
| SS B [R] | GTA CGA GTG GCC TCT AAG AT | 732-713 | LvHAb | |
| VNW B2 [F] | TAT GCT GAT GTT CTT GAG | 2036-2053 | LvHAb | D |
| VNW B2 [R] | GRA CTC TGG CTC TTR ACA KCA | 2636-2616 | LvHAb | |
| VNW B4 [F] | AGA ACR TVC TSA TGA AAC TYA AG | 3225-3247 | LvH/PvAb | D |
| VNW B4 [R] | TCT TKA SCC ACA ARA CCR GT | 3945-3926 | LvLAB | |
| VNW B5 [F] | CAY TGT GCT ACC AGG TYT TG | 4349-4369 | β'cAb | D |
| VNW B5 [R] | TTC CAG GCA GMA CCC AGG ART | 4799-4779 | CtAb | |
| SB B7 [F] | CAT GAA CCA CTG CCA GGA GA | 568-587 | LvHAb | D |
| SB B7 [R] | GCC TCG TGG ATT TTT AGA AGG G | 2106-2085 | LvHAb | |
| SB B8 [F] | ATA CTG CTC TCA TCC AGG CTT CCC | 2592-2615 | LvHAb | D |
| SB B8 [R] | TCA GAC CAG GAA CCA GGA TTT TC | 3269-3247 | PvAb | |
| SB B9 [F] | TGA GGG CAA ACA ATA CGA GAC ACT G | 3889-3913 | LvLAB | D |
| SB B9 [R] | TAT GGC AGG TTG CTG ATG GG | 4545-4526 | β'cAb | |
| 3' RACE B [O] | ATC GCT CTT TAT GCT CCC AGC C | 4592-4613 | β'cAb | D |
| 3' RACE B [I] | GGA TGA GAG GAC AGA CTT GTG GAC | 4671-4694 | β'cAb | |
| VTGB DL1 [F] | TGA GGA GCT CAT TGT CGC TCT C | 1438-1459 | LvHAb | D |
| VTGB DL1 [R] | TAG CCC TCC ACT CGG AAA GAG C | 2174-2153 | LvHAb | |
| VTGB DL2 [F] | AGG GCT GCC ATT TCT CCA AGT G | 2537-2558 | LvHAb | D |
| VTGB DL2 [R] | GGA GAT GCT TGA ACG GGA GCT G | 3352-3331 | PvAb | |
| FP B1 [F] | CCY GRT CTS ARG AAC RSC AC | 3260-3279 | PvAb | C |
| FP B1 [R] | GGY TCR ACD GAG WAG CAT TT | 4905-4886 | CtAb | |
| Sbs B 5'RACE [O] | TGA TGA CAT AAT GGG TCT TGC ACA CA | 521-496 | LvHAb | C |
| Sbs B 5'RACE [I] | CAG CTG GTG CAA ACA CTC TG | 386-367 | LvHAb | |
| Sbs B II [F] | AGG GGA ATC CTC AAC ATC TTC | 416-436 | LvHAb | C |
| Sbs B II [R] | CTC TAG CAA CAG CCT GGA CA | 1430-1411 | LvHAb | |
| Sbs B III [F] | TGT CCA GGC TGT TGC TAG AG | 1411-1430 | LvHAb | C |
| Sbs B III [R] | AGC TGC AAG GTC TTC CAC | 2788-2771 | LvHAb | |
| Sbs B IV [F] | GCC TTT ATC AGA GAC TCC | 3041-3058 | LvHAb | C |
| Sbs B IV [R] | GGC ATC TCG TTC TTG AA | 4347-4331 | β'cAb | |
| Sbs B 3'RACE [O] | GCT GAA GAG GGA CCA AAC AC | 4408-4427 | β'cAb | C |
| Sbs B 3'RACE [I] | AGA AAT CCC CAT CAG CAA CC | 4519-4538 | β'cAb | |

R=A veya G, N=A veya C veya G veya T, Y=C veya T, S=C veya G, W=A veya T, K=G veya T, M=C veya A

[F]: Forward, [R]: Reverse, [O]: Outer, [I]: Inner

D: PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması

C: PCR ürünlerinin klonlanması ve sekanslanması

LvH: Ağır zincirli lipovitellin

Pv: Fosvitin

LvL: Hafif zincirli lipovitellin

β'c: β'-component

Ct: Ct-component

Devamı Arkada

Çizelge 3.2'nin Devamı

| Primer Adı | Primer Dizisi (5' - 3') | Primer Pozisyonu | Vtg Alt Birimi | Amaç |
|------------------------|------------------------------------|------------------|----------------|------|
| VtgC primerleri | | | | |
| 5' RACE C [O] | CTG ACA TCC ACA ACC TGA GTG A | 573-552 | LvHC | D |
| 5' RACE C [I] | GTG TCA GAA ATC TCA GCA GAG GCA | 399-376 | LvHC | |
| BJR C1 [F] | GGT RAA YTW TGG RCK KGG SAW RCC AA | 127-152 | LvHC | D |
| BJR C1 [R] | CWG GRT YAT CYA RKT TCT GCA KCA T | 935-911 | LvHC | |
| BJR C2 [F] | TCC AAG CYA CMW CCS TSG GKC TCC C | 2391-2415 | LvHC | D |
| BJR C2 [R] | GCK TCC TTG GAM AKM CTY CYC A | 3162-3141 | LvHC | |
| BJR C3 [F] | CAR CAC TTC AGT SCY TTC AA | 740-759 | LvHC | D |
| BJR C3 [R] | TAC ACC AGA GAG CCR TAG GWA AG | 1347-1325 | LvHC | |
| VNW C5 [F] | ATC CAC TTK GMG GTT AAT G | 3074-3092 | LvH/3'UTRC | D |
| VNW C5 [R] | CTT TAC AGG TTA TTT CCA A | 4000-3982 | LvLC | |
| SB C6 [F] | AGC TGG TTG AGA TGG CTA A | 1248-1266 | LvHC | D |
| VNW C6 [R] | TCM TCR TTA AAC CAG TCC ATG C | 1932-1911 | LvHC | |
| SB C7 [F] | CCC CTA AGT TTG GTC CTG TCA G | 1866-1887 | LvHC | D |
| SB C7 [R] | GCA AGA TGT TCA GTC AGT GGT GGA | 2505-2482 | LvHC | |
| 3' RACE C [O] | CGG GCA TTG CTT TCC TTC TC | 3615-3634 | LvLC | D |
| 3' RACE C [I] | CAT CAG TTG TTG CCG CCT CA | 3681-3700 | LvLC | |
| VTGC DL1 [F] | GGA ATG GCT ACA GCT GTG CTC G | 605-626 | LvHC | D |
| VTGC DL1 [R] | TGG AGT ACT GGA TCT GGC AAA GC | 1816-1794 | LvHC | |
| Sbs C 5'RACE [O] | AGC TGT AGC CAT TCC CCT | 619-602 | LvHC | C |
| Sbs C 5'RACE [I] | TCA GCA GAA GCA TGG ATG TC | 387-368 | LvHC | |
| Sbs C II [F] | AGT CTG AGG AAT GGA AAT GAG | 1418-1438 | LvHC | C |
| Sbs C II [R] | TTT GGC ATT GAC AGT GAT CC | 2470-2451 | LvHC | |
| Sbs C III [F] | CAC TGT CAA TGC CAA AGC | 2455-2472 | LvHC | C |
| Sbs C III [R] | GGA AGA CTG TAT ACT CTG GG | 3749-3730 | LvLC | |
| Sbs C 3'RACE [O] | AAC AGC ACA TCT GCC TGG TT | 3508-3527 | LvLC | C |
| Sbs C 3'RACE [I] | GCT TTC CTT CTC GGT TTC | 3623-3640 | LvLC | |

R=A veya G, N=A veya C veya G veya T, Y=C veya T, S=C veya G, W=A veya T, K=G veya T, M=C veya A

[F]: Forward, [R]: Reverse, [O]: Outer, [I]: Inner

D: PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması

C: PCR ürünlerinin klonlanması ve sekanslanması

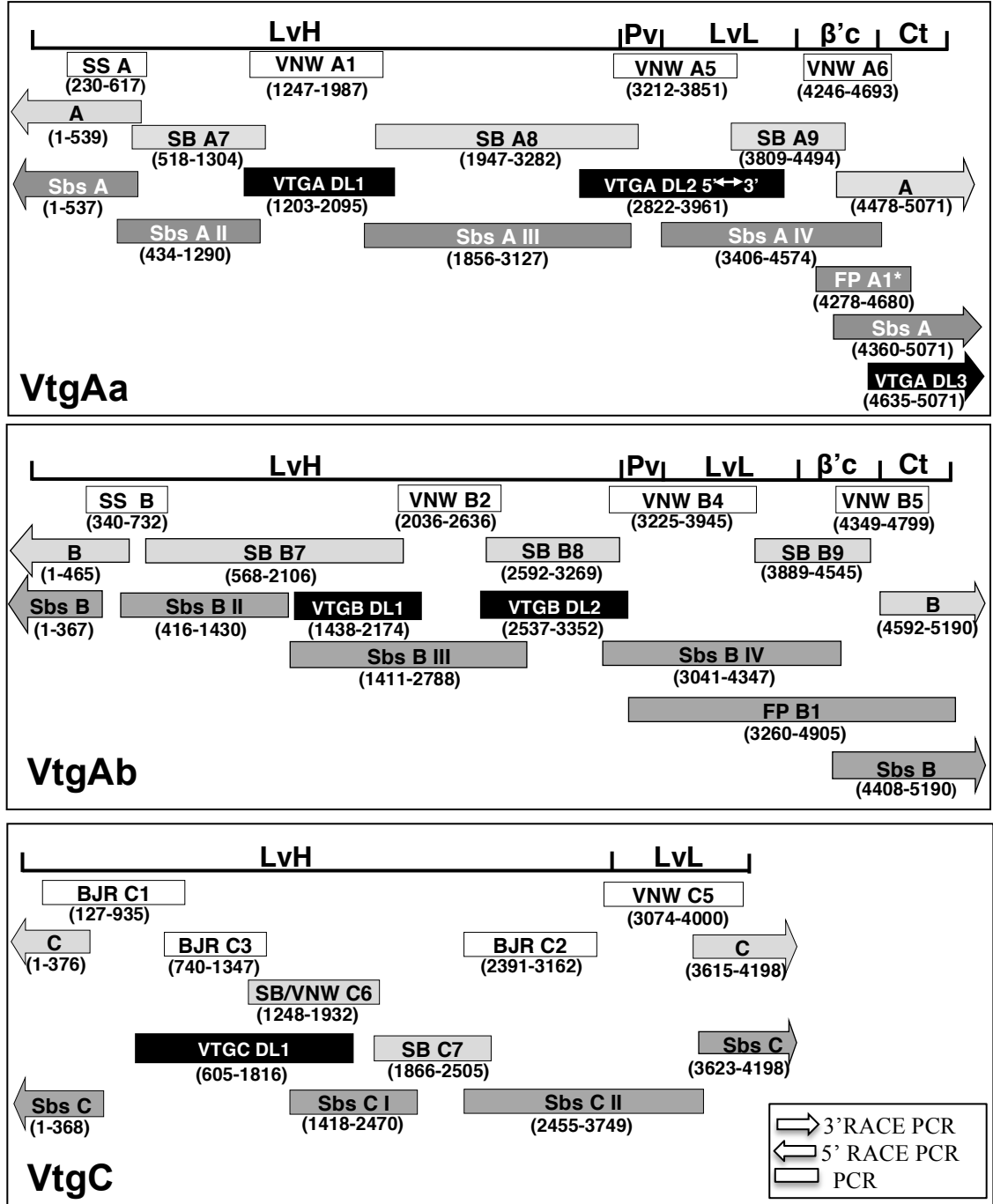
LvH: Ağır zincirli lipovitellin

Pv: Fosvitin

LvL: Hafif zincirli lipovitellin

β'c: β'-component

Ct: Ct-component



Şekil 3.3. Levrek vitellojenlerine ait tam cDNA dizilerinin elde edilmesinde kullanılan strateji. Beyaz dolgulu bloklar (SS, VNW, BJR) dejenere ve/veya konsensüs, açık gri dolgulu bloklar (SB) çizgili levrek için gene özgü, siyah dolgulu bloklar (VTG DL) levrek için gene özgü primerler kullanılarak çoğaltılmış ve doğrudan sekanslanmış kısmi *vtg* cDNA parçalarını ifade etmektedir. Koyu gri dolgulu bloklardan 'Sbs' levrek için tasarlanmış gene özgü primerler, 'FP' ise dejenere primerler kullanılarak çoğaltılmış ve klonlandıktan sonra sekanslanmış dizi parçalarını ifade etmektedir. Bloklar altında parantez içerisinde verilmiş numaralar, bu parçaların tam cDNA dizileri üzerindeki yerlerini göstermektedir. Her bir panel üzerindeki Vtg YP alt birimini temsil eden ayraçlar ve kısmi cDNA parçalarını gösteren bloklar ölçüğe göre çizilmemiştir.

Çizelge 3.3. Çizelge 3.2.'de verilen primerler kullanılarak elde edilen cDNA ürünlerinin büyüklükleri ve *vtg* tam nükleotid dizileri üzerindeki pozisyonları. Primer isimleri 'Primer Adı', *vtg* tam nükleotid dizileri üzerindeki pozisyonları 'Primer Pozisyonu', bu primerlerin kısmen kodladığı *Vtg* YP alt birimi 'Tahmini Ürün *Vtg* Alt Birimi' ve çoğaltılması beklenen cDNA parçasının büyüklüğü 'Tahmini Ürün Büyüklüğü' kolonlarında verilmiştir. Elde edilen ürün cDNA parçalarının *vtg* tam nükleotid dizileri üzerindeki pozisyonları 'Esas Ürün Pozisyonu', karşılık geldikleri *Vtg* YP alt birimleri 'Esas Ürün *Vtg* Alt Birimi', ürün parça büyüklüğü 'Esas Ürün Büyüklüğü' kolonlarında verilmiştir.

| Primer Adı | Primer Pozisyonu | Tahmini Ürün <i>Vtg</i> Alt Birimi | Tahmini Ürün Büyüklüğü (bc) | Esas Ürün Pozisyonu | Esas Ürün <i>Vtg</i> Alt Birimi' | Esas Ürün Büyüklüğü (bc) |
|---|------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------|
| VtgAa Primerleri ve Amplifikasyon Ürünleri | | | | | | |
| 5' RACE A [O] | 539-518 | LvHAa | 539 | 5-381 | LvHAa-5'UTR | 377 |
| 5' RACE A [I] | 319-300 | LvHAa | 319 | 5-319 | LvHAa-5'UTR | 315 |
| SS A [F] | 230-249 | LvHAa | 388 | 280-598 | LvHAa | 319 |
| SS A [R] | 617-598 | LvHAa | | | | |
| VNW A1 [F] | 1247-1269 | LvHAa | 741 | 1291-1968 | LvHAa | 678 |
| VNW A1 [R] | 1987-1965 | LvHAa | | | | |
| VNW A5 [F] | 3212-3234 | LvH/PvAa | 640 | 3260-3836 | PvAa-LvHAa | 577 |
| VNW A5 [R] | 3851-3832 | LvLAa | | | | |
| VNW A6 [F] | 4246-4266 | β'cAa | 448 | 4298-4680 | β'cAa-CtAa | 383 |
| VNW A6 [R] | 4693-4673 | CtAa | | | | |
| SB A7 [F] | 518-539 | LvHAa | 787 | 599-1290 | LvHAa | 692 |
| SB A7 [R] | 1304-1281 | LvHAa | | | | |
| SB A8 [F] | 1947-1968 | LvHAa | 1336 | 2030-2928 | LvHAa | 899 |
| SB A8 [R] | 3282-3258 | PvAa | | | | |
| SB A9 [F] | 3809-3831 | LvLAa | 686 | 3853-4477 | LvLAa-β'cAa | 625 |
| SB A9 [R] | 4494-4471 | β'cAa | | | | |
| 3' RACE A [O] | 4478-4495 | β'cAa | 594 | 4524-5071 | β'cAa- | 548 |
| 3' RACE A [I] | 4558-4579 | β'cAa | 514 | 4558-5071 | 3'UTRAa | 514 |
| VTGA DL1 [F] | 1203-1225 | LvHAa | 893 | 1236-2043 | LvHAa | 808 |
| VTGA DL1 [R] | 2095-2073 | LvHAa | | | | |
| VTGA DL2 [F] | 2822-2844 | LvHAa | 1140 | 2875-3910 | LvHAa-LvLAa | 1036 |
| VTGA DL2 [R] | 3961-3940 | LvLAa | | | | |
| VTGA DL3 (3'RACE) | 4635-4657 | CtAa | 437 | 4723-5071 | CtAa-3'UTR | 349 |
| FP A1 [F] | 4278-4298 | β'cAa | 403 | 4299-4660 | β'cAa-CtAa | 362 |
| FP A1 [R] | 4680-4661 | CtAa | | | | |
| Sbs A 5' RACE [O] | 558-537 | LvHAa | 558 | -----* | ----- | ----- |
| Sbs A 5' RACE [I] | 454-434 | LvHAa | 454 | 1-454 | 5'UTR-LvHAa | 454 |
| Sbs A II [F] | 434-454 | LvHAa | 857 | 434-1290 | LvHAa-LvHAa | 857 |
| Sbs A II [R] | 1290-1271 | LvHAa | | | | |
| Sbs A III [F] | 1856-1875 | LvHAa | 1272 | 1856-3127 | LvHAa-LvHAa | 1272 |
| Sbs A III [R] | 3127-3108 | LvHAa | | | | |
| Sbs A IV [F] | 3406-3426 | PvAa | 1169 | 3406-4574 | PvAa-β'cAa | 1169 |
| Sbs A IV [R] | 4574-4555 | β'cAa | | | | |
| Sbs A 3'RACE [O] | 4360-4380 | β'cAa | 712 | ----- | ----- | ----- |
| Sbs A 3'RACE [I] | 4555-4574 | β'cAa | 517 | 4555-5071 | β'cAa-3'UTR | 517 |

(*): Klonlanan 5' ve 3' RACE ürünlerinden sadece 'inner' [I] primerlerle çoğaltılmış olanlar sekanslanmıştır.

[F]: Forward, [R]: Reverse, [O]: Outer, [I]: Inner

LvH: Ağır zincirli lipovitellin

Pv: Fosvitin

LvL: Hafif zincirli lipovitellin

β'c: β'-component

Ct: Ct-component

UTR: kodlanmamış bölge

Devamı Arkada

Çizelge 3.3.'ün Devamı

| Primer Adı | Primer Pozisyonu | Tahmini Ürün Vtg Alt Birimi | Tahmini Ürün Büyüklüğü (bc) | Esas Ürün Pozisyonu | Esas Ürün Vtg Alt Birimi' | Esas Ürün Büyüklüğü (bc) |
|---|------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| VtgAb Primerleri ve Amplifikasyon Ürünleri | | | | | | |
| 5' RACE B [O] | 587-568 | LvHAb | 587 | 4-543 | 5'UTR-LvHAb | 540 |
| 5' RACE B [I] | 484-465 | LvHAb | 484 | 4-483 | 5'UTR-LvHAb | 480 |
| SS B [F] | 340-360 | LvHAb | 393 | 351-692 | LvHAb | 342 |
| SS B [R] | 732-713 | LvHAb | | | | |
| VNW B2 [F] | 2036-2053 | LvHAb | 601 | 2086-2617 | LvHAb | 532 |
| VNW B2 [R] | 2636-2616 | LvHAb | | | | |
| VNW B4 [F] | 3225-3247 | LvH/PvAb | 721 | 3314-3933 | LvHAb-PvAb | 620 |
| VNW B4 [R] | 3945-3926 | LvLAb | | | | |
| VNW B5 [F] | 4349-4369 | β'cAb | 451 | 4401-4785 | β'cAb-CtAb | 385 |
| VNW B5 [R] | 4799-4779 | CtAb | | | | |
| SB B7 [F] | 568-587 | LvHAb | 1539 | 610-1547 | LvHAb | 938 |
| SB B7 [R] | 2106-2085 | LvHAb | | | | |
| SB B8 [F] | 2592-2615 | LvHAb | 678 | 2629-3256 | LvHAb-PvAb | 628 |
| SB B8 [R] | 3269-3247 | PvAb | | | | |
| SB B9 [F] | 3889-3913 | LvLAb | 657 | 4264-4540 | LvLAb-β'cAb | 277 |
| SB B9 [R] | 4545-4526 | β'cAb | | | | |
| 3' RACE B [O] | 4592-4613 | β'cAb | 599 | 4633-5190 | β'cAb-3'UTR | 558 |
| 3' RACE B [I] | 4671-4694 | β'cAb | 520 | 4671-5190 | β'cAb-3'UTR | 520 |
| VTGB DL1 [F] | 1438-1459 | LvHAb | 737 | 1456-2116 | LvHAb | 661 |
| VTGB DL1 [R] | 2174-2153 | LvHAb | | | | |
| VTGB DL2 [F] | 2537-2558 | LvHAb | 816 | 2619-3260 | LvHAb-PvAb | 642 |
| VTGB DL2 [R] | 3352-3331 | PvAb | | | | |
| FP B1 [F] | 3260-3279 | PvAb | 1646 | 3280-4885 | PvAb-CtAb | 1605 |
| FP B1 [R] | 4905-4886 | CtAb | | | | |
| Sbs B 5'RACE [O] | 521-496 | LvHAb | 521 | ----- | ----- | ---- |
| Sbs B 5'RACE [I] | 386-367 | LvHAb | 386 | 1-386 | 5'UTR-LvHAb | 386 |
| Sbs B II [F] | 416-436 | LvHAb | 1015 | 416-1430 | LvHAb | 1015 |
| Sbs B II [R] | 1430-1411 | LvHAb | | | | |
| Sbs B III [F] | 1411-1430 | LvHAb | 1378 | 1411-2788 | LvHAb | 1378 |
| Sbs B III [R] | 2788-2771 | LvHAb | | | | |
| Sbs B IV [F] | 3041-3058 | LvHAb | 1307 | 3041-4347 | LvHAb-β'cAb | 1307 |
| Sbs B IV [R] | 4347-4331 | β'cAb | | | | |
| Sbs B 3'RACE [O] | 4408-4427 | β'cAb | 783 | ----- | ----- | ---- |
| Sbs B 3'RACE [I] | 4519-4538 | β'cAb | 672 | 4519-5190 | β'cAb-3'UTR | 672 |

(*): Klonlanan 5' ve 3' RACE ürünlerinden sadece 'inner' [I] primerlerle çoğaltılmış olanlar sekanslanmıştır.

[F]: Forward, [R]: Reverse, [O]: Outer, [I]: Inner

LvH: Ağır zincirli lipovitellin

Pv: Fosvitin

LvL: Hafif zincirli lipovitellin

β'c: β'-component

Ct: Ct-component

UTR: kodlanmamış bölge

Devamı Arkada

Çizelge 3.3.'ün Devamı

| Primer Adı | Primer Pozisyonu | Tahmini Ürün Vtg Alt Birimi | Tahmini Ürün Büyüklüğü (bç) | Esas Ürün Pozisyonu | Esas Ürün Vtg Alt Birimi' | Esas Ürün Büyüklüğü (bç) |
|--|------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| VtgC Primerleri ve Amplifikasyon Ürünleri | | | | | | |
| 5' RACE C [O] | 573-552 | LvHC | 573 | 7-453 | 5'UTR-LvHC | 447 |
| 5' RACE C [I] | 399-376 | LvHC | 399 | 7-399 | 5'UTR-LvHC | 393 |
| BJR C1 [F] | 127-152 | LvHC | 809 | 164-923 | LvHC | 760 |
| BJR C1 [R] | 935-911 | LvHC | | | | |
| BJR C2 [F] | 2391-2415 | LvHC | 772 | 2431-3144 | LvHC | 714 |
| BJR C2 [R] | 3162-3141 | LvHC | | | | |
| BJR C3 [F] | 740-759 | LvHC | 608 | 775-1326 | LvHC | 552 |
| BJR C3 [R] | 1347-1325 | LvHC | | | | |
| VNW C5 [F] | 3074-3092 | LvHC | 927 | 3113-3977 | LvHC-3'UTR | 865 |
| VNW C5 [R] | 4000-3982 | 3'UTR | | | | |
| SB C6 [F] | 1248-1266 | LvHC | 685 | 1284-1916 | LvHC | 633 |
| VNW C6 [R] | 1932-1911 | LvHC | | | | |
| SB C7 [F] | 1866-1887 | LvHC | 640 | 1903-2491 | LvHC | 589 |
| SB C7 [R] | 2505-2482 | LvHC | | | | |
| 3' RACE C [O] | 3615-3634 | LvLC | 584 | 3667-4198 | LvLC-3'UTR | 532 |
| 3' RACE C [I] | 3681-3700 | LvLC | 518 | 3681-4198 | LvLC-3'UTR | 518 |
| VTGC DL1 [F] | 605-626 | LvHC | 1212 | 696-1727 | LvHC | 1032 |
| VTGC DL1 [R] | 1816-1794 | LvHC | | | | |
| Sbs C 5'RACE [O] | 619-602 | LvHC | 619 | ----- | ----- | ----- |
| Sbs C 5'RACE [I] | 387-368 | LvHC | 387 | 1-387 | 5'UTR- LvHC | 387 |
| Sbs C II [F] | 1418-1438 | LvHC | 1053 | 1418-2470 | LvHC | 1053 |
| Sbs C II [R] | 2470-2451 | LvHC | | | | |
| Sbs C III [F] | 2455-2472 | LvHC | 1295 | 2455-3749 | LvHC-LvLC | 1295 |
| Sbs C III [R] | 3749-3730 | LvLC | | | | |
| Sbs C 3'RACE [O] | 3508-3527 | LvLC | 691 | ----- | ----- | ----- |
| Sbs C 3'RACE [I] | 3623-3640 | LvLC | 576 | 3623-4198 | LvLC-3'UTR | 576 |

(*): Klonlanan 5' ve 3' RACE ürünlerinden sadece 'inner' [I] primerlerle çoğaltılmış olanlar sekanslanmıştır.

[F]: Forward, [R]: Reverse, [O]: Outer, [I]: Inner

LvH: Ağır zincirli lipovitellin

Pv: Fosvitin

LvL: Hafif zincirli lipovitellin

β'c: β'-component

Ct: Ct-component

UTR: kodlanmamış bölge

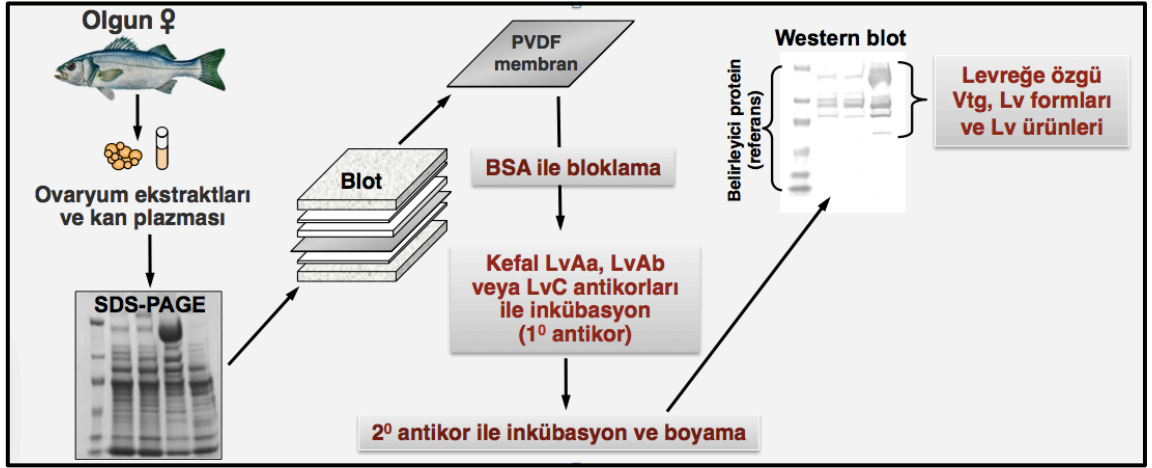
3.5. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Kan Plazmasında ve Ovaryumda SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemleri ile Saptanması

IATS'nde F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından örneklenmiş olan dört olgun dişi levrekten PV ve OV aşamalarında alınmış ovaryum ve plazma örnekleri (Çizelge 3.1), NCSU laboratuvarlarında O. YILMAZ tarafından eşit ağırlık ve hacimlerde (ovaryum için 75 µg plazma için 50 µl) olacak şekilde ortak tüplerde toplanmış ve deiyonize su içerisinde (1:3 v/v) homojenize edilmiştir. Doku homojenizasyonu Polytron PT10/35 (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) kullanılarak gerçekleştirilmiş, homojenatlar SDS-PAGE için üst sıvı alınmak üzere 10 dk boyunca ~10.000 x rpm ve +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Üst sıvı protein konsantrasyonları, NanoDrop™ spektrofotometre (Fisher Scientific) ile ölçülmüş, örnekler jele yüklenmeden önce deiyonize su ile 4 µg µl⁻¹'ye seyreltilmiş ve 1:1 v/v oranında Laemmli örnek tampon çözeltisi (50 µl ml⁻¹ BME ile karıştırılmış) içerisinde 5 dk boyunca kaynatılmıştır. Yaklaşık 20-30 µg protein, hazır halde satın alınmış % 4'lük yükleme jeline sahip % 4-15'lik gradient jel (Tris HCl Ready Gel®; Bio-Rad)'e yüklenmiş 150 V'ta 45 dk boyunca Tris-glisin tampon çözelti (Laemmli 1970) içerisinde ayrıştırılmıştır. Jele ayrıca protein bantları büyüklüklerinin belirlenmesinde referans olarak kullanılmak üzere Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range (Bio-Rad) standart protein karışımı yüklenmiştir (Şekil 3.4). Elektroforez sonunda jel, amaca göre ya protein bantlarının doğrudan görüntülenebilmesi amacıyla CBB ile boyanmış veya özgün proteinlerin saptanması amacıyla Western blot analizine hazırlanmıştır. Boyamada, jel önce 3:5:2 (v/v) oranında metanol:asetik asit:distile su karışımı içerisinde % 0.1 oranında karıştırılmış olan CBB (PhastGel BuleR, Sigma-Aldrich) solüsyonunda bekletilmiş, 3:1:6 (v/v) oranında metanol:asetik asit:distile su karışımında yıkanmış ve görüntülenmiştir.

Western blot analizi için ise jel, Towbin ve diğerleri (1979)'nin belirttiği gibi yarı-kuru yöntemle Bio-Rad Trans-Blot® SD (Bio-Rad) elektroforetik transfer ünitesi kullanılarak PVDF membrana aktarılmıştır (Şekil 3.4). Elektrobloklama öncesi jel ve PVDF membran, transfer tampon çözeltisi (0.025 M Tris-Base, 0.195 M glisin ve % 20 metanol, pH 8.3) içerisinde iyice ıslatılmıştır. Protein transferi 15 V'ta 30 dk boyunca

sürdürülmüş bunun sonrasında membran 2 saat boyunca özgül olmayan reaksiyonları en az düzeyde tutmak amacıyla tween içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline Tween 20; PBST [0.15 M NaCl içeren 0.01 M PBS ve % 5 Tween 20]) içerisinde % 3 albumin (Bovine Serum Albumin; BSA, Sigma-Aldrich) solüsyonu içerisinde bloklanmıştır (Şekil 3.4).

Şekil 3.4'te görüldüğü gibi, sonraki aşamada membranlar kefalden elde edilmiş (Amano vd 2008a) sırasıyla 1:4000, 1:8223 ve 1:5000 oranlarında kullanılmış kefal anti-LvAa, anti-LvAb ve anti-LvC primer antikor solüsyonları içerisinde gece boyunca bekletilmiştir. Antikorlar, % 0.2 Tween 20 karıştırılmış PBST içerisinde % 3 BSA solüsyonu ile seyreltilmiştir. Membranlar daha sonra, 30 dk boyunca PBST ile yıkanmış, % 3 BSA PBST solüsyonunda 1:5000 oranında seyreltilmiş olan sekonder antikor içerisinde (EIA Grade Affinity Purified Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad) 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Membranlar 30 dk boyunca PBST solüsyonunda yıkandıktan sonra Avidin-Biotin Kompleks (Vectastain ABC Kit Rabbit IgG, Vector Laboratories) içerisinde 1 saat boyunca bekletilmiş bunun ardından, DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories) üretici firma tarafından tavsiye edildiği üzere kullanılarak görüntülenmek üzere boyanmıştır. Jel ve blotlar üzerindeki bantların moleküler büyüklükleri kullanılan protein standartları referans alınarak GeneGenius® Scanner (Syngene USA, Frederick, MD) densitometre ve GeneTools Software (Syngene USA, Frederick, MD) kullanılarak hesaplanmıştır.

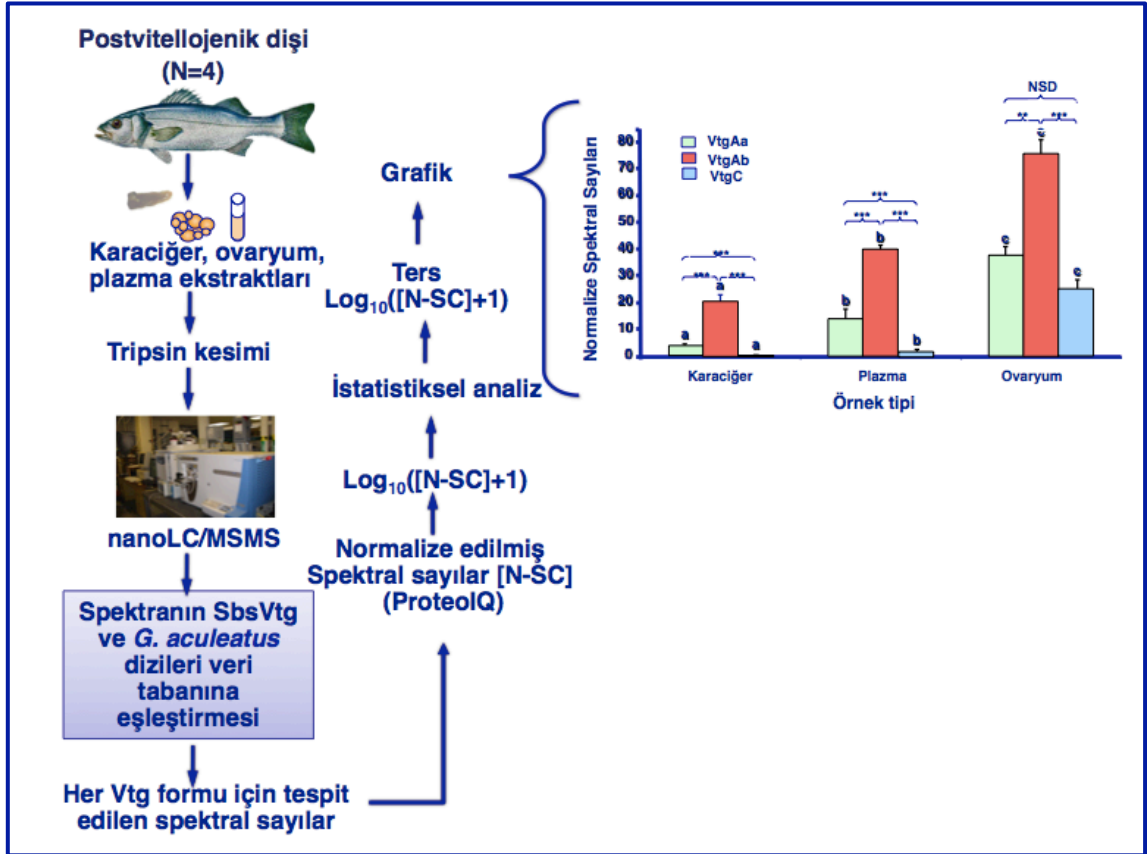


Şekil 3.4. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin kan plazmasında ve ovaryumda SDS PAGE ve Western blot yöntemleri ile saptanması.

3.6. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Postvitellojenik Dişi Karaciğer, Plazma ve Ovaryumundaki Miktarlarının Kütle Spektrometre Analizi ile Saptanması

Kaynakları Çizelge 3.1’de belirtilmiş olan, IATS’nde F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından örneklenmiş dört ayrı postvitellojenik dişiye ait 150-250 mg ağırlığında ovaryum ve karaciğer doku örnekleri, 1:3 (v/v) oranında deiyonize su içerisinde homojenize edilmiştir. Aynı dişilerden alınan 250 µl plazma örnekleri ise 1:1 (v/v) oranında deiyonize su ile seyreltilmiştir. Doku homojenizasyonu ve örneklerin kütle spektrometrisi analizine hazırlanması işlemleri NCSU laboratuvarlarında O. YILMAZ tarafından gerçekleştirilmiştir. Burada, homojenize dokular ~10.000 x g hızda +4 °C’de 10 dk boyunca santrifüj edilmiş, üst sıvı yeni tüplere aktarıldıktan sonra protein konsantrasyonları NanoDrop™ Spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. Homojenatlar 0.5 µg µl⁻¹’e seyreltildikten sonra 10 µl örnek, 15.5 µl amonyum bikarbonat (50 mM) ve 1.5 µl ditiotritol (100 mM) içerisinde 95 °C’de 5 dk bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 20 dk boyunca bekletildikten sonra, denatürasyonu tamamlamak amacıyla 3 µl iyodoasetik asit ve tripsin kesimi için 1 µl (0.1 µg µl⁻¹ oranında) tripsin (Sigma Aldrich) eklendikten sonra 37 °C’de 3 saat boyunca inkübe edilmiş ve son olarak enzimatik reaksiyonu tamamlamak üzere 1 µl daha tripsin eklenerek gece boyunca 37 °C’de bekletilmiştir. Bu süre sonunda, her bir örneğe tripsin aktivitesini durdurmak amacıyla 1.5 µl formik asit eklenmiş ve örnekler ~10.000 x rpm hızda oda sıcaklığında 5 dk boyunca santrifüj edilmiş, üst sıvılar yeni tüplere aktarıldıktan sonra SpeedVac® Vacuum Concentrator (Thermo Scientific) yardımıyla kurutulmuştur (Şekil 3.5). Her bir örnekten 5 µg protein nano sıvı kromatografi ardışık kütle spektrometri (nano Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry; nanoLC-MS/MS) analizi için NCSU GSL’na gönderilmiştir. Burada, her dört balığa ait karaciğer, ovaryum ve plazma örneklerinin üçer adet nanoLC-MS/MS tekrarı gerçekleştirilmiş, veri taramaları levrek VtgAa (Sbs VtgAa; GenBank AFA26669.1), VtgAb (SbsVtgAb; GenBank AFA26670.1) ve VtgC (SbsVtgC; GenBank AFA26671.1) dizilerinin de dahil edildiği *Gasterosteus aculeatus* protein veri tabanı (ENSEMBL) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).

Genomik Bilimler Laboratuvarı'ndan gelen raporlara göre, her bir LC/MS/MS analizinde tespit edilen peptidlerin spektra sayılarına dair verilerin normalizasyonunda işaretlenmemiş MS veri ölçümlerine uygun ProteoIQ programı (NuSep, Bogart, GA) kullanılmıştır. ProteoIQ ayrıca, NCSU laboratuvarlarında O. YILMAZ tarafından, saptanan ortak peptidlerin gruplar halinde sınıflandırılmasında (Zhang vd 2010) ve tanımlanan her bir proteine ait spektra sayılarının her bir tekrardan elde edilen toplam spektra sayılarına ve protein büyüklüklerine (Normalized Spectral Abundance Factors; NSAF) göre normalizasyonunda (Zybaïlov vd 2006, 2007) kullanılmıştır. Daha sonra, dört dişiye ait biyolojik örneklerin (karaciğer, plazma ve ovaryum) üç teknik tekrarının her birinin normalize spektra sayıları (N-SC), ProteoIQ'dan alınarak veri setinde yer alan sıfır değerlerini açıklayabilmek için ($\text{Log}_{10}[y+1]$, $y=N-SC$) transformasyonuna tabi tutulmuştur. Her bir biyolojik örneğe ait tekrarların (her doku tipi için $N=4$) ortalama transforme N-SC değerleri, two-way ANOVA (IBM SPSS Statistics version 19, Armonk, NY) ile analiz edilmiş, F değerlerine göre Vtg formlarının karaciğer, plazma ve ovaryumdaki değerleri arasındaki istatistikî farklılıklarının ortaya konması amacıyla one-way ANOVA ve Tukey's HSD post-hoc ($p<0.05$) analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz sonrasında bu veriler ters $\text{Log}_{10} ([N-SC]+1)$ transformasyonuna tabi tutulmuş ve grafiğe dökülmüştür (Şekil 3.5).



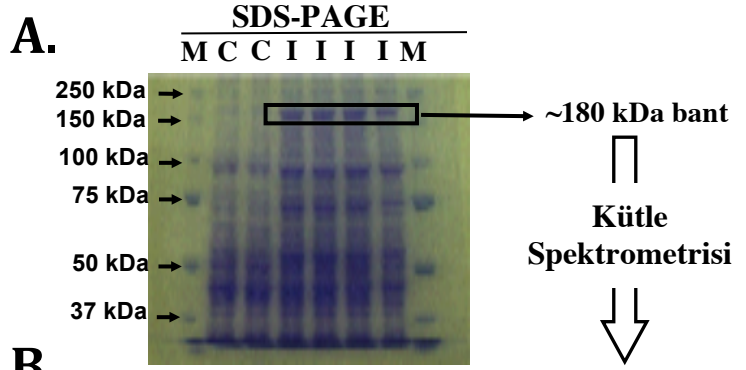
Şekil 3.5. Levrek vitellogen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin postvitellogenik dişi karaciğer, plazma ve ovaryumundaki miktarlarının kütle spektrometre analizi ile saptanması.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada levrekte çoklu *vtg* sistemi tanımlanmış, bunların Vtg ürünlerinin kandaki varlığı tespit edilmiş ve bunların her birinin oosit ile yumurta içerisindeki YP depolarına katkıları üzerine detaylı bilgi edinilmiştir. Bulgular, levreğin diğer acantomorph teleostlar için Finn ve Kristoffersen 2007 tarafından bildirilen evrimsel gelişim şeması ve önerilen Vtg sınıflandırmasına uygun, en az üç ayrı *vtg* cDNA dizisi ve bunların ürünü olan, üç farklı Vtg protein (SbsVtgAa, SbsVtgAb ve SbsVtgC)'ine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

4.1. Karaciğerde Vitellojen Sentezinin Estradiol ile Tetiklenmesinin Kütle Spektrometre Analizi ile Kontrolü

17 β -E₂ ile uyarılmış erkek levrek karaciğer ekstraktları (Tablo 3.1) SDS-PAGE üzerinde ayrıştırıldığında, yaklaşık 180 kDa (Şekil 4.1A) büyüklüğünde bir protein bandı tespit edilmiştir. Jelden kesilen bu bant, tripsin kesimine ve bunun sonrasında LC-ESI/MS/MS analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen spektranın, GenBank'tan temin edilen çizgili levrek StbVtgAa ve StbVtgAb (sırasıyla GenBank: HQ846509 ve HQ846510) dizilerini içeren veri tabanında taranmasıyla, 50 adet özgün triptik Vtg peptidi tespit edilmiştir. Bu peptidler, çalışmamız ilerledikçe elde edilen SbsVtgAa ve SbsVtgAb dizileriyle ya tam bir özdeşlik ile veya tek bir korunmuş amino asit farkıyla mükemmel bir benzerlik göstermiştir (Şekil 4.1B). Belirlenen 50 peptitten 18'inin SbsVtgAa LvH, LvL, β 'c ve Ct alt birimlerine, 32'sinin SbsVtgAb LvH ve LvL alt birimlerine ait olduğu gözlenmiştir. Estradiol ile uyarılmış karaciğer dokusunda tespit edilen SbsVtgAa'ya ait triptik peptidler (Şekil 4.1B) Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te, Vtg tam peptid dizileri üzerinde italik karakterlerle gösterilmiştir. Bunların arasında β 'c alt birimine karşılık gelen peptitlerden biri, aslında Ct bölgesine ait olsa da levrekte bu bölgenin QEY motifinden ayrışması henüz deneysel olarak doğrulanmamıştır. CtAa bölgesinin, YP alt birimi olarak tanımlanması korunmuş QEY motifi üzerinde yer alan tahmini enzimatik ayrışma bölgesine dayanarak yapılmıştır (Reading vd 2009, Finn 2007a). Spektra taramalarında StbVtgC'ye ait istatistiki anlamda önemli miktarda herhangi bir peptide rastlanmamıştır (GenBank: HQ846511).



B.

| YP Alt Birimi | Spektra (N) | Peptid Dizisi | Start-Stop |
|----------------------|-------------|-------------------------------|------------|
| LvHAa | 17 | YEALLLGGLP EEG LAK | 34-49 |
| | | LVEPELFEYSGIWP K | 72-86 |
| | | TQNVYELQEAGAGVCK | 147-163 |
| | | TLYAITEDDKAER | 164-176 |
| | | DDKAERILLTKTRDLNHCQEK | 171-191 |
| | | QEKIKDLGLAYTEKCAKQQ | 189-209 |
| | | HCVELAVCPAELIRPIQDLLAEAVAK | 446-471 |
| | | AAACNIA | 606-612 |
| | | TSAYLAGAAADVLEVGVR | 666-683 |
| | | SLPSSTPLASVYVK | 719-732 |
| | | PSSTPLASVYVK | 721-732 |
| ALIDQAIALATGSPVQTVGR | 746-765 | | |
| LvLAa | 6 | FLGNEVAPTFAIIVR | 1186-1200 |
| | | GYQLAVYLDRPTTR | 1210-1223 |
| | | TLDLIWK | 1336-1342 |
| β'cAa | 2 | GLTPFDGLADK | 1366-1376 |
| | | VNGMEIPINNLPHYPTAK | 1462-1480 |
| CtAa | 1 | NAVSYAHSWVLP A ESCR | 1546-1562 |
| LvHAb | 46 | LVDPEIFEYSGIWP K | 72-86 |
| | | PEIFEYSGIWP K | 75-86 |
| | | LTSALAAQLLTPIKFEYNGVVGR | 95-118 |
| | | TQNVYELQEPGAQGVCK | 147-163 |
| | | GSLQYEFGSELLQTPQLLR | 283-302 |
| | | ISNAEAQIVEVLNHLVTFNAAK | 303-324 |
| | | SNAEAQIVEVLNHLVTFNAAK | 304-324 |
| | | EAQIVEVLNHLVTFNAAK | 307-324 |
| | | YESIEALWTQFK | 345-356 |
| | | FLAAELTIAEAAQALLASVH | 385-404 |
| | | FLAAELTIAEAAQALLASVHMTADLEAIK | 385-414 |
| | | EIVMLGYGTLVAK | 433-445 |
| | | GEIEELVIALK | 472-482 |
| | | LLPGFGSAAAGLPLR | 499-513 |
| | | PGFGSAAAGLPLR | 501-513 |
| | | VHIDAVLALR | 514-523 |
| | | NLQVASFVYSYMK | 580-592 |
| | | NTAPDFASVAAACNVAVK | 597-614 |
| | | TYLAGAYADVLELGV R | 668-683 |
| | | ENAERITKMRQVMKALSEWRA | 699-719 |
| | | ANPLSQPLASVYVK | 719-732 |
| PLSQPLASVYVK | 721-732 | | |
| PLASVYVK | 725-732 | | |
| FFGQEIAFANIDK | 733-745 | | |
| VLDALLSGFAVHYAK | 767-781 | | |
| IATALVDTF A VAR | 905-917 | | |
| DTFAVAR | 911-917 | | |
| IELEIQVGEK | 1040-1049 | | |
| LvLAb | 5 | YLANAITPAVTILIR | 1216-1232 |
| | | VQGYQIAAYFDR | 1240-1251 |
| | | GYQIAAYFDR | 1242-1251 |
| | | PVSLPFGDTAAELEAYQSNWADK | 1389-1411 |

Şekil 4.1. Karaciğerde vitellojen sentezinin estradiol ile tetiklenmesinin kütle spektrometre analizi ile kontrolü. A. Erkek levrek karaciğer protein ekstraktlarının SDS-PAGE üzerinde ayrıştırılması. M: Standart, C: Kontrol, I: E₂ ile uyarılmış erkek levrek karaciğer ekstraktı. B. SDS-PAGE jelden kesilen ~180 kDa'lık bandın LC-ESI/MS/MS analizi sonucu tespit edilen levrek Vtg peptid dizileri. Peptid amino asit dizileri 'Dizi', karşılık geldikleri YP alt birimi 'YP alt birimi', tespit edilen peptid için toplam güvenilir spektra sayısı 'Spektra' ve her bir peptidin SbsVtg dizisi üzerindeki pozisyonları 'Start-Stop' kolonlarında verilmiştir.

4.2. Levrek Vitellojenleri cDNA Nükleotid Dizileri ve Poliadenilasyon Kodonları

4.2.1. Nükleotid dizileri

Çalışmamızın bu bölümünde, uygun primer setleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR ve klonlamaya dayalı sekanslama stratejileri ile levreğe ait üç farklı *vtg* tam nükleotid (*SbsvtgAa*, GenBank: JQ283441; *SbsvtgAb*, GenBank: JQ283442; *SbsvtgC*, GenBank: JQ341410) ve amino asit dizileri (*SbsVtgAa*: GenBank AFA26669.1; *SbsVtgAb*: GenBank AFA26670.1; *SbsVtgC*: GenBank AFA26671.1) elde edilmiştir.

Levreğe ait her bir *vtg*'ye ait cDNA'ları oluşturan temel alt birimler (5'UTR [untranslated region, UTR], sinyal peptid, LvH, Pv, LvL, β 'c, Ct ve 3' UTR)'in tam nükleotid dizileri ile kodlanmış bölge (open reading frame, ORF) peptid dizileri üzerindeki pozisyonları ve büyüklükleri hakkında detaylı bilgi Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bütün halde *SbsvtgAa* cDNA dizisi, 5071 bç uzunluğunda olup, 18 bç'lik bir 5'UTR, 1656 amino asit (aa) rezidüsünü kodlayan 4968 bç'lik bir ORF ve 85 bç'lik bir 3'UTR'a sahiptir. *SbsvtgAb* cDNA dizisi, 5190 bç uzunluğunda olup, 16 bç'lik bir 5'UTR, 1692 aa rezidüsünü kodlayan 5076 bç'lik bir ORF ve 96 bç'lik bir 3'UTR'a sahiptir.

Levrekte bu Vtg ORF büyüklüklerinin, çizgili levrek *StbvtgAa* 5216 bç, *StbvtgAb* 5145 bç (GenBank, V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış), beyaz levrek *WpvtgAa* 5752 bç, *WpvtgAb*, 5156 bç (Reading vd 2009), mercan *RsbvgA* 5219 bç, *RsbvgB* 5348 bç (Sawaguchi vd 2006), *F. heteroclitis* *FunvgI* 5112 bç, *FunvgII* 5061 bç (La Fleur vd 1995a,b, 2005), mezigit *HadvgA* 5189 bç, *HadvgB* 5103 bç (Reith vd 2001), *V. moseri* *BarvgA* 4884 bç, *BarvgB* 4953 bç (Matsubara vd 1999) ve *G. affinis* *GambvgA* 5085 bç, *GambvgB* 5025 bç (Sawaguchi vd 2005a) ile benzer olduğu görülmektedir. Sinyal peptidin yanı sıra *SbsvtgAa* ve *SbsvtgAb* cDNA dizileri ORF'lerinin, acantomorph teleost 'tam' *vtg* formlarında görüldüğü gibi YP alt birimlerinin tamamını (LvH, Pv, LvL, β 'c ve Ct) kodladığı görülmektedir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.9).

Buna karşın, sinyal peptid dahil 1394 aa kodlayan *SbsvtgC* cDNA dizisi, 4198 bç uzunluğunda olup 16 bç'lik bir 5'UTR, 1275 aa rezidüsünü kodlayan 3825 bç'lik bir ORF ve 357 bç'lik bir 3'UTR'a sahiptir. Levrek *vtgC*'nin Pv YP alt biriminden yoksun ve LvL alt biriminden sonra kesilmiş bir C-ucu bölgesi olan çok daha kısa bir ORF'e sahip olduğu (Çizelge 4.1) görülmüştür. Diğer teleost türlerde yapılmış çalışmalarda, çizgili levrek *StbvtgC* 4050 bç (GenBank, V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış), beyaz levrek *WpvtgC* 4243 bç (Reading vd 2009), mercan *RsbPvlvg* 4128 bç (Sawaguchi vd 2006) ve *G. affinis* *GambPvlvg* 3726 bç (Sawaguchi vd 2005a) ORF'lerinin *SbsvtgC* ile benzer olduğu görülmektedir. Sinyal peptidin yanı sıra levrek *vtgC* cDNA dizisi ORF'inin, acantomorph teleost 'eksik' *vtg* tiplerinde görüldüğü gibi yalnızca LvH ve LvL YP alt birimlerini kodladığı görülmektedir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.9).

Çizelge 4.1. Levrek vitellojenlerine ait yumurta sarısı temel alt birimleri için nükleotid ve peptid dizi pozisyonları ve büyüklükleri.

| Vtg | YP Alt Birimi | Nükleotid Pozisyonu | Büyük­lük (bç) | Amino Asit Rezidü Pozisyonu | Büyük­lük (aa) |
|---------------------------------------|-----------------|---------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| VtgAa Toplam 5071 bç 1690 aa | 5'UTR | 1-18 | 18 | 1-6 | 6 |
| | Sinyal peptid | 19-63 | 45 | 7-21 | 15 |
| | LvHAa | 64-3231 | 3168 | 22-1077 16-1071* | 1056 |
| | PvAa | 3232-3450 | 219 | 1078-1150 1072-1144* | 73 |
| | LvLAa | 3451-4167 | 717 | 1151-1389 1145-1383* | 239 |
| | β 'cAa | 4168-4617 | 450 | 1390-1539 1384-1533* | 150 |
| | CtAa | 4618-4986 | 369 | 1540-1662 1534-1656* | 123 |
| | 3'UTR | 4987-5071 | 85 | 1663-1690 | 28 |
| | Kodlama Bölgesi | 19-4986 | 4968 | 7-1662 | 1656 |
| VtgAb Toplam 5190 bç 1729 aa | 5'UTR | 1-16 | 16 | 1-5 | 5 |
| | Sinyal peptid | 17-61 | 45 | 6-20 | 15 |
| | LvHAb | 62-3243 | 3183 | 21-1081 16-1076* | 1061 |
| | PvAb | 3244-3555 | 312 | 1082-1185 1077-1180* | 104 |
| | LvLAb | 3556-4269 | 714 | 1186-1423 1181-1418* | 238 |
| | β 'cAb | 4270-4722 | 453 | 1424-1574 1419-1569* | 151 |
| | CtAb | 4723-5092 | 369 | 1575-1697 1570-1692* | 123 |
| | 3'UTR | 5093-5187 | 96 | 1698-1729 | 32 |
| | Kodlama Bölgesi | 17-5092 | 5076 | 6-1697 | 1692 |
| VtgC Toplam 4198 bç 1399 aa | 5'UTR | 1-16 | 16 | 1-5 | 5 |
| | Sinyal peptid | 17-61 | 45 | 6-20 | 15 |
| | LvHC | 60-3237 | 3177 | 21-1079 16-1074* | 1059 |
| | LvLC | 3238-3841 | 604 | 1080-1280 1075-1275* | 201 |
| | 3'UTR | 3842-4198 | 357 | 1281-1399 | 119 |
| | Kodlama Bölgesi | 17-3841 | 3825 | 6-1280 | 1275 |

(*): Her bir YP protein alt biriminin yalnızca kodlama bölgesi üzerindeki pozisyonları (5' ve 3' UTR hariç)

5'UTR: 5' kodlanmamış bölge

3'UTR: 3' kodlanmamış bölge

YP: Yumurta sarısı proteinleri

| | | Sinyal peptid LvH | |
|------------|---|---------------------------|-----|
| SbsVtgAa | MRAVALALTLALVAGOPHNLAPEFAAGKTYVYK YEALLLGGLP EEG LAK AGLVSSKVLISAAAQNIYMLKLVEPELFEY | | 80 |
| WpVtgAa | MRVVVLALTLALVAGQLHNLAPFDAGKTYVYK YEALLLGGLP EEG LAK AGLVSSKVLISAAAQNIYMLKLVEPELFEY | | 80 |
| ** * ***** | | | |
| SbsVtgAa | SGIWP KDPLVPATKLTSALAAQLMIPIKFEYANGVVGKMSAPEG ISTMVLNV RGILNVLQLNIKK TQNVYELQEAGA QG | | 160 |
| WpVtgAa | SGIWPKDPLVPATKLTSALAAQLMIPIKFEYANGVVGKMFAP EGISTMVLNV H RGILNVLQLNIKK TQNVYELQEAGA QG | | 160 |
| ***** | | | |
| SbsVtgAa | VCKTLYA ITEDDKAER ILLTKTRDL NHCQEKIMKDLGLAYTEKCAK Q QDSKNLRGATAYNYILKPVASGILILEAAVDE | | 240 |
| WpVtgAa | VCKTLYA ITEDDKAERILLTKTRDL NHCQEKI I KDLGLAYTEKCAK Q QDSKNLRGATAYNYILKPVASGILILEAAVNE | | 240 |
| ***** | | | |
| SbsVtgAa | LIQFSPFTEMNGAAQMOTK QSLVFLEIQ RAP IVPIQAQYL HRGSLKYEFSTELLQTP IIHLIKI HN VQAQ IVEILNHLVTN | | 320 |
| WpVtgAa | LIQFSPFTELNGAAQMOTK QSLVFLEIQ RATILPNEAQYLHRGSLKYEFSTELLQTP IQLIKIN N VQAQ IVEILNHLVTN | | 320 |
| ***** | | | |
| SbsVtgAa | NVERVHEDAPLKFLELIQ LLRAAR FEDLEMLWSQYRLKPAFRQWILDSIPAIGTPVALRFI KEKFLV DDLTF AEVAQ ALI | | 400 |
| WpVtgAa | NVERVHEDAPLKFLELIQ LLRAAR FEDLEMLWRQHRLKPTFRQWILDSIPAIGTPVALRFI KEKFL DDL TVAEVAQ ALI | | 400 |
| ***** | | | |

Devamı Arkada

Şekil 4.2. Levrek VtgAa amino asit dizilerinin (SbsVtgAa) beyaz levrek VtgAa amino asit dizileriyle (WpVtgAa) karşılaştırılması. Rezidü pozisyonları sağdaki numaralarla gösterilmiştir. Tahmini enzimatik kesim noktaları olan rezidüleri, üzerinde yer alan dikey çizgi ile ve YP alt biriminin kısaltılmış adı (LvH, Pv, LvL, β^c veya Ct) ile belirtilmiştir. Karşılaştırılan her bir baz çifti altında yer alan asterisk (*) veya tek nokta (.)'lar, sırasıyla özdeşlik ve benzerliği ifade etmektedir. Tek çizgiler (-), optimum karşılaştırma için tam diziye girilen boşlukları ifade etmektedir. VtgAa Ct bölgesinde yer alan korunmuş sistein rezidüleri, gri kutularda koyu karakterle (C) gösterilmiştir. Korunmuş CGxC motifi ise siyah çerçeve içinde gösterilmiştir. Levrek dizileri üzerinde yer alan (O) ve (N) karakterleri, sırasıyla O- ve N-bağlı potansiyel glikolizasyon bölgelerini ifade etmektedir. SbsVtgAa Pv alt birimleri üzerinde yer alan potansiyel fosforilasyon bölgeleri, altı çizili olarak gösterilmiştir. Varsayılan Vtg reseptör bağlanma bölgeleri, siyah dolgu üzerine beyaz yazıyla belirtilmiştir. Estradiol ile uyarılmış erkek levrek karaciğerinde LC-ESI/MS/MS ile belirlenmiş olan SbsVtgAa'ya ait triptik peptidler italik karakterlerle (peptid dizileri için bkz. Şekil 4.1B), postvitellojenik dişi levrek karaciğer, plazma ve ovaryumunda LC-ESI/MS/MS ile saptanan SbsVtgAa'ya ait triptik peptid dizileri koyu karakterlerle (peptid dizileri için bkz. Çizelge 4.6) gösterilmiştir. Hem E₂ ile uyarılmış erkek karaciğerinde hem de postvitellojenik dişi karaciğer, plazma ve ovaryumunda aynı anda tespit edilen ortak SbsVtgAa triptik peptid dizileri koyu ve italik karakterlerle belirtilmiştir.

Şekil 4.2'nin Devamı

| | | |
|----------|---|------|
| SbsVtgAa | ASIHMTANTEAIKL VEALAIN SKNSGSPVLR EIVLLGYGTMISKH CVELAVCPAELIRPIQDLLAEAVAKDEIQDIILL | 480 |
| WpVtgAa | ASIHMTANTEAIKLVEALAINSKIVESPVLREIVLLGYGTMISKHCVELAVCPAELIRPIQDLLAEAVAKDEIQDIILL | 480 |
| | ***** | |
| SbsVtgAa | VKVLGNAGQATSLKPITK ILPIHG TAAAS LPIK VHANAIMALRNI AKKEPR MIQELALQ LYMDKALHPELRMLASIVLFE | 560 |
| WpVtgAa | VKVLGNAGQATSLKPITRILPIHGTAASLPMKVHANAIMALRNI AKKEPRMIQELALQLYMDKALHPELRMLASIVLFE | 560 |
| | ***** | |
| SbsVtgAa | TRPAMGLVTTLANIVK TEENLQ VAS F TYSHMKS L TRSTAA I HAS V ASAC N VAIKILSPKLNRLSFRFSKAIHVDIYNSPL | 640 |
| WpVtgAa | TRPAMGLVTTLANIVKTEENLQVASFLYSHMKS L TRSTAA I HAS V AAAC N IAIKILSPKLNRLSFRFSKAIHVDIYNSPL | 640 |
| | ***** | |
| SbsVtgAa | MLGAAASAFYINDAATILPRSIVAK T SAYLAGAA ADV LEVGV R TEGL Q EALLK N PALID N ADRMTKMKRVIKALSEL R SL | 720 |
| WpVtgAa | MLGAAASAFYINDAATILPRSIVAKTSAYLAGAAADVLEVGV R TEGL Q EALLK N PALID N ADRMTKMKCVIKALSDL R SL | 720 |
| | ***** | |
| | O | |
| SbsVtgAa | PSSTPLASVYVKFFGQ EIAFANIDK ALIDQ AIALAT G PSV Q TVGRNALKSLLSGASFHFVKPLLATEVRRIIPTAAGLPM | 800 |
| WpVtgAa | PSSTPLASVYVKFFGQ E IAFANIDK ALIDK ---LATG PSVQ TVGRNALNALLSGASFHFVKPLLATEVRRIMPTAAGLPM | 797 |
| | ***** | |
| | O | |
| SbsVtgAa | ELSLYTAAVAAA VQVR ATTT P ALPENFHF A HLLKTD I QFETEIRPSIAVNT F AAMGVNTAIL Q AALLSR A KLNSIV P AK | 880 |
| WpVtgAa | ELSLYTAAVAAA VQVR ATTT P ALPENFHF A Q L LKTD I Q L E T EIRPSIAVNT F AAMGVNTAIL Q AALLSR A KLNSIV P AK | 877 |
| | ***** | |
| SbsVtgAa | ITARLNINEGHFKIEALPVS V PEHVA A VHVET V AVARNIEDLAAARIT P IIPAK I Q T ISREILTSKISPSVAD S WS Q SS | 960 |
| WpVtgAa | ITARLN I KEGHFKIEALPVS V PEHVA A VHVET F AVARNIEDLAAARIT P IIPAK I Q T ISREILTSKISS V AD S WS Q SS | 957 |
| | ***** | |
| SbsVtgAa | E I I H EDVA I K P IIKS K AA Q FE K KY C AK A IA I GL K GC F K I AT E NAV F IS D I A LY K LAG R HS V ALS L K P IE G E A IES L E I EV | 1040 |
| WpVtgAa | E I I H EDVA V K P IIKS K AA Q FE K KY C AK A VA I GL K GC F K I T C E H AA F IS D I A LY K LAG R HS V ALS L K P IE G E A IES L E I EV | 1037 |
| | ***** | |

Devamı Arkada

Şekil 4.2'nin Devamı

| | | | | | | |
|----------|--|------------|----------|-------------|----------|------|
| | N | Pv | N | O OO | N | |
| SbsVtgAa | QVGPKAAEKLK QINLSEEEIIEGRPILMKL KKILAPGLKNSTSSSSSSSSSRSSRSSLSSRSSSSSSSSSRSSSSSRVNRSSSA | | | | | 1120 |
| WpVtgAa | QVGPKAAEKLK QINLSEEEIIEGRPILTKL KKILAPGLKNSTSSSSSSSSSSSRSSRSSLSSRSSHSSSSSSSSS-----SSSA | | | | | 1112 |
| | ***** | | | | | |
| | | LvL | | | | |
| SbsVtgAa | SSLASLFGASSSSS-----SRAQLSKRVIYRHKFQKNHKKEVLSSQVTSAAALSRSRSSASSFEA | | | | | 1179 |
| WpVtgAa | SSLASLFGASSSSSRSSSRSSSSHSSSSSRRAQPSKRVIYRHKFQKNHKKEVLSFQVTSAVLSRS--SASSFEA | | | | | 1190 |
| | ***** | | | | | |
| | O | | | | | |
| SbsVtgAa | IRRQNK FLGNEVPTFAIIVRAI RADKLLGYQLAVYLD RPTRLQI ILAALAADNNWKL CADGALLSKHKVTAKIGWGA | | | | | 1259 |
| WpVtgAa | IQRQNKFLGNKV PTFAIIVRAI RADKNVLGYQMAVYLD RPTRLQI ILAALAANNWKL CADGALLSKHKVTAKIGWGA | | | | | 1270 |
| | * .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** | | | | | |
| SbsVtgAa | ECK QYDTMITAETGLVGPSPAARLRMAWTELP SALKHYA QRVYDI PASMLAG LIQKDON ANQLSLTVVATS DRTLDL | | | | | 1339 |
| WpVtgAa | ECKQYNTI ITAETGLVGP PRPAARIRVAWTELPSTLKH YAQRVYDI PASMLAG LIQEKDON IADQLSLTVVATS DRTLDL | | | | | 1350 |
| | ***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** | | | | | |
| | | β'c | | | | |
| SbsVtgAa | IWKTP HTVYKLALHLP IALPLVEIK GLTPFDGLADK VHYLFAKAGAAE CSFSKETL TTFNNRRY KNEMPLSCYQVLAQD | | | | | 1419 |
| WpVtgAa | IWKTP TRTVYKLALRLP ITMPLAEIK GLTPFDGFADK VHYLFAKAGAAE CSFSKETL TTFNNRRYKY EMPLSCYQVLAQD | | | | | 1430 |
| | ***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** | | | | | |
| SbsVtgAa | CTDEIK FMVLLKEDNIKQNHINVKI ADIDIDLYPKNT DVIVK VNGMEIPINNLPYQHPTAKI QIRPN GEGISVFAPALGL | | | | | 1499 |
| WpVtgAa | CTDELK FMILLKEDNIKQNHINVKI ADIDIDLYLKNT DVIVK VNGMEIPINNLPYQHPTAKI QIRPN GEGISVFAPSLGL | | | | | 1510 |
| | **** .*** .*** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** | | | | | |
| | | Ct | | | | |
| SbsVtgAa | HEVYFDRNSWKVQVVDWMKGQ T CGLC GKADGEV RQ EYRTPNGRLTKNAVS YAH SWVL PAES CRDTTE CRM KLESVQLEKQ | | | | | 1579 |
| WpVtgAa | HEVYFDRNSWKVQVVDWMKGQ T CGLC GKADGEV RQ EYRTPNGH LTKNAVS YAH SWVLOAES CRDTTE CRM KHESVQLEKQ | | | | | 1590 |
| | ***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** | | | | | |
| | N | | | | | |
| SbsVtgAa | VNIEGQES RCYSVEPVL RL CLPGCF VPVKT TA VT VG FH CL PADSDLN L TESVRSIYDNSVDLRETAE AHLA CSCTA Q CA | | | | | 1656 |
| WpVtgAa | VN IL GQES RCYSVEPVL RL CLPGCF VPVNT TA VT VG FH CL PADSD LKHPES LSSVYNN SVN LRET VEAHLA CRCTA Q CA | | | | | 1667 |
| | *** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** | | | | | |

| | | Sinyal peptid LvH | |
|----------|--|--|-----|
| SbsVtgAb | MRVLVLAFTVALAAANHINVFPEFSAGKTYVYK YEALLMGGLP EEGLARAGVKVISKVL LINAASPD F MLKLVDP E IFEY | | 80 |
| WpVtgAb | MRVLVLAFTVALAAANHINFAPEFAAGKTYVYK YEALIMGGLP EEGLGRAGVKVLSKVL LINAASP NTF IVKLVDP E IFEY | | 80 |
| | | ***** .***** .***** ***** .***** ** .***** | |
| SbsVtgAb | SGIWP KDAFIPATKL TSALAAQLL T PIKFEY TNGVVGRVF FAPAGVSATV LNIYRGILN IFQLN IKKT QNVYELQ EPGA Q | | 160 |
| WpVtgAb | SGIWP KDAFVPATKL TSALAAQLL T PIKFEY TNGVVGRVF FAPAGVS TVLNIYRGILN IFQLN IKKT QNVYELQ EPGA Q | | 160 |
| | | ***** .***** .***** ***** .***** | |
| SbsVtgAb | VCK THYVISED AKADRILL TKTKDLNHCQ ERIIKD IG LAYTEK CV ECEARG KT LKGAAAF NYIMKPTATG ALL EATATE | | 240 |
| WpVtgAb | VCK THYVISED AKADRILL TKTKDM NQCQ ERIIKD IGL AYTEKCV ECEARG K LKGAAAF NYIMKPTATG ALL EATATE | | 240 |
| | | ***** .***** .***** ***** .***** | |
| SbsVtgAb | LIQFSPFNILNGAAQ MEAKQIL T FLEIEK TP VMP IRADY LHRG SLQY EF GS ELLQ TP IQLL RISNA EAQI VEVLNHL VTF | | 320 |
| WpVtgAb | LIQFSPFNILNGAAQ MEAKQIL T FLEIEK TP VVP IRADY LHRG SLQY EF GS ELLQ TP IQLL KISNA EAQI VEVLNHL VTF | | 320 |
| | | ***** .***** .***** ***** .***** | |
| SbsVtgAb | NAAKV HEDAP LKFI EL IQLL RVAR YESIE AL WTQ F KAR PDY RHW IL NAV PA IG TH AALR FLKE KFLA AE L T IAEAAQ ALL | | 400 |
| WpVtgAb | NAAKV HEDAP LKFI EL IQLL RVAR YESIE AL WTQ F KAR PDY RHW M NAV PA IG TH VALR FLK DKFLA AE L T IAEAAQ ALL | | 400 |
| | | ***** .***** .***** ***** .***** | |

Devamı Arkada

Şekil 4.3. Levrek VtgAb amino asit dizilerinin (SbsVtgAb) beyaz levrek VtgAb amino asit dizileriyle (WpVtgAb) karşılaştırılması. Rezidü pozisyonları sağdaki numaralarla gösterilmiştir. Tahmini enzimatik kesim noktaları olan rezidüleri, üzerinde yer alan dikey çizgi ile ve YP alt biriminin kısaltılmış adı (LvH, Pv, LvL, β'c veya Ct) ile belirtilmiştir. Karşılaştırılan her bir baz çifti altında yer alan asterisk (*) veya tek nokta (.)'lar, sırasıyla özdeşlik ve benzerliği ifade etmektedir. Tek çizgiler (-), optimum karşılaştırma için tam diziye girilen boşlukları ifade etmektedir. VtgAb Ct bölgesinde yer alan korunmuş sistein rezidüleri, gri kutularda koyu karakterle (C) gösterilmiştir. Korunmuş CGxC motifi ise siyah çerçeve içinde gösterilmiştir. Levrek dizileri üzerinde yer alan (O) ve (N) karakterleri, sırasıyla O- ve N-bağlı potansiyel glikolizasyon bölgelerini ifade etmektedir. SbsVtgAb Pv alt birimleri üzerinde yer alan potansiyel fosforilasyon bölgeleri, altı çizili olarak gösterilmiştir. Varsayılan Vtg reseptör bağlanma bölgeleri, siyah dolgu üzerine beyaz yazıyla belirtilmiştir. Estradiol ile uyarılmış erkek levrek karaciğerinde LC-ESI/MS/MS ile belirlenmiş olan SbsVtgAb'ye ait triptik peptidler italik karakterlerle (peptid dizileri için bkz. Şekil 4.1B), postvitellojenik dişi levrek karaciğer, plazma ve ovaryumunda LC-ESI/MS/MS ile saptanan SbsVtgAb'ye ait triptik peptid dizileri koyu karakterlerle (peptid dizileri için bkz. Çizelge 4.6) gösterilmiştir. Hem E₂ ile uyarılmış erkek karaciğerinde hem de postvitellojenik dişi karaciğer, plazma ve ovaryumunda aynı anda tespit edilen ortak SbsVtgAb triptik peptid dizileri koyu ve italik karakterlerle belirtilmiştir.

Şekil 4.3'ün Devamı

N

SbsVtgAb *ASVHMTADLEAIKIAEGLAMNNKIQENPVLREIVMLGYGTLVAKYCAENPTCPAELVRPIHELAVQAVARGEIEELIVA* 480
 WpVtgAb *ASVHMTADLEAIKIVADLAMNNKIQENPVLREIVMLGYGTLVAKFCTENPTCPAELVKPIHELAVQAAAEGEIEELVVA* 480

SbsVtgAb *LKVLGNAGHPASLKPIMKLLPGFGSAAAGLPLRVHIDAVLALRNIKREPKMIQEMAVQLFMDKALHPELRMVVAIVLFE* 560
 WpVtgAb *LKVLGNAGHPASLKTIMKLLPGFGSAAAGLPLRVHIDAVLALRNIKKEPKMIOEIAVQLFMDKALHPELRMVVAIVLFE* 560

SbsVtgAb *TKLPMGLVTTLADTLLKEKNLQVASFVYSYMKAMTKNTAPDFASVAAACNVAVKILSPKFD RMSYRFSRALYFDAYHNPW* 640
 WpVtgAb *TKLPMGLLTTLADALLKEKNLQVASFVYSYMKAMTKNTAPDFASVAAACNVAVKILSPKFD RMSYRFSRALYLDAYHNPW* 640

SbsVtgAb *MMGAAASAFYV NDAATVLPRAIVAKARTYLAGAYADVLELGV RTEGVQEALLKIHEAPENAERITKMRQVMKALSEWRAN* 720
 WpVtgAb *MMGAAASAFYINDAATVLPRAIVAKARTYLAGAYADVLELGV RTEGVQEALLKIHEAPENTERITKMRQVMKALSEWRAN* 720

O

99 SbsVtgAb *PLSQPLASVYVKFFGQEIAFANIDKAIVDQI IELASGPAIQTYGRRVLDALLSGFAVHYAKPMLVAEVRRI LPTAVGLPM* 800
 WpVtgAb *PLSQPLASVYVKFFGQEIAFANIDKAIVDQI IELASGPAIHTYGRRVLDALLSGFAVHYAKPMLVAEVRRI LPTVVG LPM* 800

O

SbsVtgAb *ELSFYTA AVAAASIEFQATVSPPLPENFHQAQLLKSDVNMRAAISPSVSMHTYAVMGVNTALIQASLLLRARVHTIVPAK* 880
 WpVtgAb *ELSFYTA AVAAASIELQATVSPPLPENFHQAQLLKSDVNMRAAIAPSVSMHTYAVMGVNTALIQASLLLRARVHTIVPAK* 880

O

SbsVtgAb *MEARIDMIKGNFKLQFLPVQGVDKIATALVDTFAVARNVEDLAAAKITPMIPTEVA AKMSREIFSSKISRMASSLAGSMS* 960
 WpVtgAb *MEARIDMIKGNFKLQFLPVQIDKIATALVDTFAVARNVENLAAAKITPMIPAEVGAKMSREVFSSKNSRVASSLAGSMS* 960

SbsVtgAb *ASSEIIPVDLPRNIASKLRIPKAFQKKMCAAIETFGIKACTEIESRNAAFIRDSPLYAI IGRHAVMVEVAPAAGPVIEKI* 1040
 WpVtgAb *ASSEIIPVDLPRNIASKLKLKAFQKKMCAAMETFGIKACTEIESRNAAFIRCPLYAI IGRHAVMVEVAPAAGPVIEKI* 1040

Devamı Arkada

| | | Sinyal peptide LvH | |
|---------|--|--|-----|
| SbsVtgC | | MQGLLFCCLVALATCQSVHYELSLNPKKTYEYKYEGGVNFGLGAPNLAESGVRMTCKVKIVGVSAQTFILQASNLVFEEF | 80 |
| WpVtgC | | MQGLLFCCLVALATCQSVHYELSLNPKKTYEYKYEGGVNFGLGIPNLAESGVR IACKVKIVGVSAQTFILQASNLVFEEF | 80 |
| | | *****.***** | |
| | | N | |
| SbsVtgC | | NGFPGKNTYNASPKLTQRIAAQLIKPFMFNYAGGHVSDIHASAEISDTVVNIVRGILGFFQVTVKTTQRIYELEEVGIHG | 160 |
| WpVtgC | | NGFPGKNTYNASPKLTQRIAAQLIKPFMFNYTCGHVSDIHASAEISDTVVNIVRGILGFFQVTVKTTQRIYELEEVGIHG | 160 |
| | | *****.***** | |
| | | O | |
| SbsVtgC | | KCQSNYATEENMETKDM TITQVVDVSG CREKAAIYRGMATAVLDKISKQRGESVISTVRYVYVNVK PTEEGGLITQAHGLE | 240 |
| WpVtgC | | KCQSNYATEENMETKDM TITQVVDVSG CREKAAIYRGMATAVLDKISKQRGESVISTVRYVYTVKATEEGGLITRAHGLE | 240 |
| | | *****.*****.*****.***** | |
| SbsVtgC | | RQHFSPFN VKGGSFKM QAMKEMVLLGVS D TARAV MF ^M GM] NLVYK FVNAE ANVPIMMQLDDPLPKAVELIKHLAE A | 320 |
| WpVtgC | | RQHFSSFN VKGGSFKM QAMKEIVLLGVS D TARAV IF ^M GM]NLVYK FVNAE ANVPIMMQLNLEDPLPKAVELIKQLAE A | 320 |
| | | *****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| SbsVtgC | | NKYEIDSATTEDTIKLYQLLR VMPYEELEAMWR QLSGNEEHRRWFLDMIVEVSDARILKFLEVRFQAGDISVIEAGEILL | 400 |
| WpVtgC | | NKYQIDSATTEDTIKLYQLLR VMPYEELEAVWKQLL GNEEHRRWFLDMIVEVSDARILKFLEVRFQSGDISVIEAGEILL | 400 |
| | | ***.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| SbsVtgC | | LAINHLQAIPELVEMAK MFLNMPFSKS NIYLWHTVVLTYGSLVYKHCAYYTPCPINAVQPLLNMAMESLRNGNEADMVIA | 480 |
| WpVtgC | | LAINHLQAIPELVEMAKVFLTMPFSKSNIYLWHTVALTYGSLVYKHCAYYTPCPINSVQPLLDMAMESLRNGNEADMVIA | 480 |
| | | *****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |

Devamı Arkada

Şekil 4.4. Levrek VtgC amino asit dizilerinin (SbsVtgC) beyaz levrek VtgC amino asit dizileriyle (WpVtgC) karşılaştırılması. Rezidü pozisyon numaraları sağda gösterilmiştir. Tahmini enzimatik kesim noktaları olan rezidüler, üzerinde dikey çizgi ile ve YP alt biriminin kısaltılmış adı (LvH veya LvL) ile belirtilmiştir. Karşılaştırılan her bir baz çifti altında yer alan asterisk (*) veya tek nokta (.)'lar, sırasıyla özdeşlik ve benzerliği ifade etmektedir. Tek çizgiler (-), optimum karşılaştırma için tam diziyeye girilen boşlukları ifade etmektedir. Levrek dizileri üzerinde yer alan (O) ve (N) karakterleri, sırasıyla O- ve N-linked potansiyel glikolizasyon bölgelerini ifade etmektedir. Varsayılan Vtg reseptör bağlanma bölgeleri, siyah dolgu üzerine beyaz yazıyla belirtilmiştir. Postvitellojenik dişi levrek karaciğer, plazma ve ovaryumunda LC-ESI/MS/MS ile tespit edilen SbsVtgC'ye ait triptik peptid dizileri koyu karakterlerle (peptid dizileri için bkz. Çizelge 4.6) gösterilmiştir.

Şekil 4.4'ün Devamı

| | | |
|---------|---|------|
| SbsVtgC | LKALGNAGHPGSIKTIMRFLPGVAATPVDLPPRVLSAAVQSMRLIAARDPHSVQDITMSLFLQKNLPTEIRMLAFMILFD | 560 |
| WpVtgC | LKALGNAGHPGSIKTIMRFLPGVAATPVDLPPRVLSAAVQSMRLIAARDPHSVQDITMSLFLQKNLPTEIRMLAFMILFD ***** | 560 |
| SbsVtgC | TKPPLALVSTVTAHLQEEKDLHVISFAYSYLRSFARS SSTPENHFLSIACNVAVK ILAPKFGRLSYHYSKAMRMDWFNDDF | 640 |
| WpVtgC | TKPTLALVSVVTAHLQEEKDLHVVSFAYSYLRSFARS SSTPENHFLSIACNVAVK VLAPKFGRLSYHYSKAMRMDWFNDDF *** ***** .***** .***** | 640 |
| SbsVtgC | LIGTAAEVFMLRSATNIF PTEIMMGK FFF IGRIL QLMELGIRA EKELFGTSSIPGFTGDLSFSDFQAI FNVLQNW EIL | 720 |
| WpVtgC | LIGTAAEVFMLRSATNIF PTEIMMGK FFF IGRIL QLL ELGIRAEGIKELFGTSSIPGFTGDLSFSDFQAI FNVLQNW EIL ***** .***** | 720 |
| SbsVtgC | PNDKPLLSAFSRAS GQEWFFADINKDFIQNI IRAVTPSAGKESPLWAVIEDLQRGVSWHWTKPFLIFEVRY FQATTGLP | 800 |
| WpVtgC | PNDKPLLSAFSRVFG QEWFFADINKDFIQNI IRAVTPSAEKESPLWAVIEDLQRGVSWHRTKPFLIFEVRY FQATTGLP ***** ***** ***** ***** ***** | 800 |
| SbsVtgC | LEISKYY ESVNGITVNAKAAVNPPLTEHLAQLLNSEISLETDFIGFTKDLWVFGINTDLFQCGSELKSK MPLAIPWKF | 880 |
| WpVtgC | LEISKYYQ SVNGITVNAKAAVNPPLPEHLAQLLTSEISLETDFIGYTKDLWVFGINTALFQCGSELKSK MPLAIPWKF ***** .***** ***** .***** .***** ***** ***** | 880 |
| SbsVtgC | SAKINVREK KFELDFLPCK KFEFEVFSVSSNVYAVTRNIEEPTLAKMTPIMPNAIDSNDEVVHMGPTVVRPEPEQMLTPNT | 960 |
| WpVtgC | SAKINVREK KFELDFLPCK KFEFEVFSVSSNVYAVTRNIEEPALAKMTPIMPNAIDSNDEVVHMGPTDVRPEPEQMLRPNT ***** .***** ***** ***** ***** | 960 |
| SbsVtgC | WHPIAKMAESNIYGAGLCVESELRREYYHEEYPLYYFLGYTHLAFKVVPAQAIKAVDKIHFEVNAGPSRHPMSARQLLD | 1040 |
| WpVtgC | WHPIAKMAESNIYGAGLCVESELRREYYHEEYPLYYFLGYTHLAFKVVPAQ TIKAVE KIHFEVNAGPSRHPMSARQLLD ***** .***** .***** ***** | 1040 |
| LvL | | |
| SbsVtgC | TLRRLSKEATQVRVRLSSDSASSVRGSPNNH QDYLMEGWN STPEAVFNIAKAFAMSGNQKPEGYDAAIYYTPEANI QNAQLI | 1120 |
| WpVtgC | TLRRLSKEATQRI RLPS SDSASSVRGSPNNHHH LM EGWNSTPEAVFNIAKAFAMSGNQKPEGYDAAIYYTPEAN TENAQLI ***** .** ***** .***** ***** ***** ***** | 1120 |

Devamı Arkada

Şekil 4.4'ün Devamı

```
SbsVtgC VSQVGEDTNWKMCVDTIVHAHAEAKAHIRWGAECQTYEMSMRGATAHLPGSKPTLKAKVHWARIPETMADMGRGIESYIP 1200
WpVtgC VSQVGEDTNWKMCVDTIVHAHAEAKAHIRWGAECQTYEMSMRGATAHLPGSKPTLMAKAHWARIPETMADMGRGIESYIP 1200
***** ** *****

N
SbsVtgC GMAFLLGFSEQHERNAKQEVSASVVAASADSIDMKIKFPEYTVFRQAIPVPLPPASFLEFQODIRNTTIDSFGRA 1275
WpVtgC GIAFLLGFSEQHERNAKQEVSASVVAASAGSINMKIKFPEYTVFRQAIPVPLPPASFLEFQODIRNTTIDSFGRA 1275
* .***** ** *****
```

4.2.2. Poliadenilasyon kodonları

Üç *vtg* cDNA dizisine ait ORF'in de korunmuş bir TAA 'stop' kodonuyla bittiği ve her üç transkriptin de Beadoing ve diğerleri (2000) tarafından tanımlanan heksamerik bir poliadenilasyon kodona (polyadenylation signal; PAS) sahip olduğu saptanmıştır. *SbsvtgAa* cDNA dizisi, poly-A ucundan 15 bç geride bulunan ve diğer türlerdekine benzer olarak transkripsiyonda aktif olduğu varsayılan bir PAS (AATAAA), farklı olarak 19 bç geride bir TTTAAA ve poly-A ucunun hemen başlangıcında bir diğer AAAACA PAS'a sahiptir. *SbsvtgAb* cDNA dizisi, poly-A ucundan 12 bç geride bulunan diğer türlerdekine ve *SbsvtgAa*'dakine benzer olarak transkripsiyonda aktif olduğu varsayılan bir PAS (AATAAA), farklı olarak da poly-A ucunun hemen başlangıcında bir CATAAA PAS kodonu bulundurmaktadır. *SbsvtgAa* ve *SbsvtgAb* cDNA dizilerinden bariz şekilde farklı olarak *SbsvtgC* cDNA dizisi, 3' UTR'de poly-A ucunun 14 bç yukarısında bulunan ve transkripsiyonda aktif olduğu varsayılan PAS (AATAAA) kodonunun öncesinde bir AAAACA, identik iki tahmini CATAAA ve dördüncü bir ATGAAA PAS kodonu taşımaktadır.

Her üç *Sbsvtg* üzerinde de genellikle poly-A ucundan 10-50 bç öncesinde yer alan fonksiyonel olduğu varsayılan AATAAA poliadenilasyon signal bölgesinin *WpvtgAb*, *StbvtgAa* ve *StbvtgC*, *RsbvgA* ve *RsbvgB*, kefal *vgA* ve *vgB* (Amano vd 2007a), *GambvgA* ve *GambvgB*, *FunvgI* ve *FunvgII*, *HadvgA* ve *HadvgB* ve de *BarvgA* ve *BarvgB* dizilerinde aynı olduğu görülmektedir.

4.3. Levrek Vitellojenleri cDNA Dizilerinden Türetilmiş Birincil Poliipeptid Dizileri, Alt Birim Yapıları ve Homoloji Analizleri

Yapısal olarak *SbsVtgAa* ve *SbsVtgAb* dizilerinin, taşıdıkları YP alt birimleri (NH₂-Sinyal peptid-LvH-Pv-LvL-β'c-Ct)'nin birbirleriyle ve diğer türlere [beyaz levrek (Hiramatsu vd 2002d, Reading vd 2009), çizgili levrek (GenBank, V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış), mercan (Sawaguchi vd 2006), *V. moseri* (Matsubara vd 1999) ve *G. affinis* (Sawaguchi vd 2005a)] ait Aa veya Ab formu ("tam") Vtg'lerle aynı oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.2,

4.3, 4.4 ve 4.9). Levrek Vtg'lerine ait cDNA dizilerinden hesaplanan moleküler ağırlık değerleri (SbsVtgAa ~181 kDa, SbsVtgAb ~186 kDa, SbsVtgC ~143 kDa, Şekil 4.9)'nin, beyaz levrek (WpVtgAa ~181 kDa, WpVtgAb ~183 kDa, WpVtgC ~141 kDa; Reading vd 2009) ve çizgili levrek (StbVtgAa ~182 kDa, StbVtgAb ~185 kDa, StbVtgC ~143 kDa; GenBank, V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış) için aynı yolla hesaplanan değerlerle çok yakın benzerlikte olduğu görülmektedir. Bu değerler ayrıca, Hiramatsu vd (2002e) tarafından saflaştırılmış olan beyaz levrek Vtg proteinleri için bildirilen moleküler ağırlıklar (WpVtgAa ~180 kDa, WpVtgAb ~180 kDa, WpVtgC ~148 kDa) ile de uyum içindedir. SbsVtgAa ve SbsVtgAb birincil polipeptid dizilerinin, *Moronidae* türlerine (Çizelge 4.2) ve diğer teleost türlere ait Vtg dizileriyle yüksek homolojileri (Şekil 4.5), sinyal peptid dizileri ve bunların ayrışma bölgeleri (Çizelge 4.4), poliserin Pv alt birimleri (Şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.9), Vtg reseptör bağlanma bölgeleri (Çizelge 4.5), birincil YP enzimatik ayrışma bölgeleri (Şekil 4.6) ve amino asit içerikleri (Şekil 4.7) açısından yüksek korunmuşluk göstermeleri, bunların VtgA'nın paralog iki "tam" formu olarak SbsVtgAa ve SbsVtgAb şeklinde tanımlanmalarını doğrulamıştır. Benzer kıyaslamalara göre levrekte varlığı saptanan C-tipi, fosvitinsiz, "eksik" Vtg formunun, SbsVtgC olarak tanımlanmasını da doğrulamıştır.

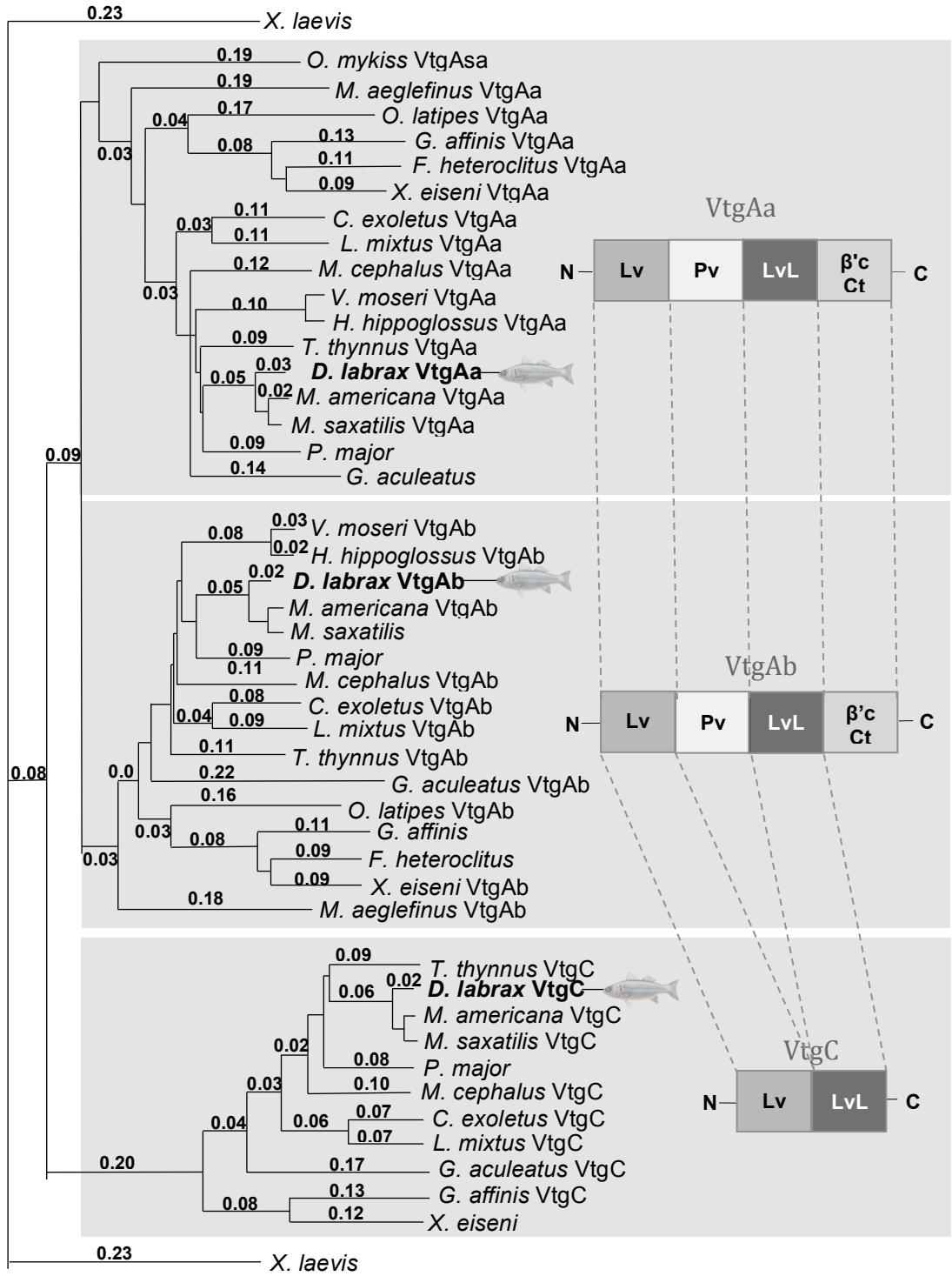
Buna göre, *Moronidae* familyasından diğer bazı türlere ait dizilerle karşılaştırıldığında, SbsVtgAa ve StbVtgAa arasında % 94 özdeşlik ve % 96 benzerlik, SbsVtgAa ve WpVtgAa arasında % 93 özdeşlik ve % 95 benzerlik; SbsVtgAb ve StbVtgAb arasında % 93 özdeşlik ve % 96 benzerlik, SbsVtgAb ve WpVtgAb arasında % 93 özdeşlik ve % 96 benzerlik (Çizelge 4.2) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca SbsVtgAa ve bir diğer perciformes üyesi olan mercana ait RsbVgA arasında, % 81 özdeşlik ve % 88 benzerlik; SbsVtgAb ve RsbVgB arasında % 83 özdeşlik ve % 91 benzerlik olduğu görülmüştür.

Daha kısa bir cDNA ile kodlanan SbsVtgC'nin, Pv alt biriminden yoksun olduğu, β' c ve Ct taşımayan ve kesilmiş yapıda bir C-ucu bölgesine sahip olduğu ve de StbVtgC ve WpVtgC ile % 95 özdeşlik ve % 97 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4). SbsVtgC tam dizilerininin, bir diğer perciformes üyesi olan mercana ait

RsbPvIVg ile yalnızca % 81 özdeşlik ve % 91 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Son olarak levrek Vtg birincil peptid dizilerinin, kendi aralarındaki homoloji değerleri: SbsVtgAa ve SbsVtgAb arasında % 61 özdeşlik ve % 78 benzerlik, SbsVtgAa ve SbsVtgC arasında % 21 özdeşlik ve % 38 benzerlik, SbsVtgAb ve SbsVtgC arasında % 22 özdeşlik ve % 39 benzerlik olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Levrek vitellojenlerinin *Moronidae* familyasından diğer türlerle özdeşlik ve benzerlik karşılaştırması. Levrek Vtg cDNA dizilerinin (SbsVtgAa, SbsVtgAb ve SbsVtgC) diğer *Moronidae* türlerine ait Vtg'lerle (beyaz levrek; WpVtgAa, WpVtgAb ve WpVtgC, çizgili levrek; StbVtgAa, StbVtgAb, StbVtgC) karşılaştırılması sonucu elde edilen özdeşlik ve benzerlik oranları parantez içinde gösterilmiştir. Koyu gri dolgulu hürelerdeki değerler önemli karşılaştırmaları ifade etmektedir.

| | Wp VtgAa | Wp VtgAb | Wp VtgC | Stb VtgAa | Stb VtgAb | Stb VtgC | Sbs VtgAa | Sbs VtgAb | Sbs VtgC |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| Sbs VtgAa | 93% (95%) | 60% (78%) | 21% (38%) | 94% (96%) | 60% (78%) | 21% (38%) | 100 | 61% (78%) | 21% (38%) |
| Sbs VtgAb | 61% (78%) | 93% (96%) | 22% (38%) | 61% (78%) | 93% (96%) | 22% (38%) | 61% (78%) | 100 | 22% (39%) |
| Sbs VtgC | 21% (38%) | 22% (39%) | 95% (97%) | 21% (38%) | 23% (39%) | 95% (97%) | 21% (38%) | 22% (39%) | 100 |



Şekil 4.5. Farklı teleost türlerine ait vitellojenler arasında polipeptid dizilerin karşılaştırmasına dayanarak oluşturulmuş Clustal-W ilişki şeması. Branşlar üzerindeki numaralar, diziler arasındaki farklılık (p-distance) değerlerini ifade etmektedir. Levrek Vtg'leri, balık sembolüyle beraber koyu karakterlerle (*D. labrax* VtgAa, *D. labrax* VtgAb ve *D. labrax* VtgC) gösterilmiş ve dolgu kutular içerisinde üç ayrı grup halinde sınıflandırılmıştır. Her bir Vtg için YP alt birimi yapılarının şematik gösterimi sağ tarafta verilmiştir.

Çizelge 4.3. Karşılaştırmalı sonuçlarda kullanılan türlerin taksonomik bilgileri, vitellogen GenBank numaraları ve kaynak bilgileri.

| TAXON | TÜR Vtg | GENBANK | KAYNAK |
|---|--|-----------------|--------------------|
| Süper takım: ACANTHOPTERYGII | | | |
| Takım: PLEURONECTIFORMES | <i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAa | ABQ58113 | Finn, 2007a |
| | <i>Verasper moseri</i> VtgAa | AB181833 | Sawaguchi vd 2005a |
| Takım: PERCIFORMES | <i>Dicentrarchus labrax</i> VtgAa | JQ283441 | Bu çalışma |
| | <i>Morone americana</i> VtgAa | DQ020120 | Reading vd 2009 |
| | <i>Morone saxatilis</i> VtgAa | HQ846509 | Yayınlanmamış veri |
| | <i>Pagrus major</i> VtgAa | AB181838 | Sawaguchi vd 2006 |
| | <i>Centrolabrus exoletus</i> VtgAa | FJ456930 | Finn vd 2009 |
| | <i>Labrus mixtus</i> VtgAa | FJ456934 | Finn vd 2009 |
| | <i>Thunnus thynnus</i> VtgAa | FJ743688 | Pousis vd 2011 |
| Takım: GASTEROSTEIFORMES | <i>Gasterosteus aculeatus</i> VtgAa | ENSEMBL | ENSGACP00000012923 |
| Takım: CYPRINODONTIFORMES | <i>Fundulus heteroclitus</i> VtgAa | Q90508 | LaFleur vd 1995a |
| | <i>Gambusia affinis</i> VtgAa | AB181835 | Sawaguchi vd 2005a |
| | <i>Xenotoca eiseni</i> VtgAa | EU761161 | Yayınlanmamış veri |
| Takım: BELONIFORMES | <i>Oryzias latipes</i> VtgAa | BAB79696 | Yayınlanmamış veri |
| Takım: MUGILIFORMES | <i>Mugil cephalus</i> VtgAa | AB288932 | Amano vd 2007a |
| Süper takım: PARACANTHOPTERYGII | | | |
| Takım: GADIFORMES | <i>Melanogrammus aeglefinus</i> VtgAa | AAK15158 | Reith vd 2001 |
| Süper takım: PROTACANTHOPTERYGII | | | |
| Takım: SALMONIFORMES | <i>Oncorhynchus mykiss</i> VtgAsa | JC4956 | Mouchel vd 1996 |
| Süper takım: ACANTHOPTERYGII | | | |
| Takım: PLEURONECTIFORMES | <i>Hippoglossus hippoglossus</i> VtgAb | ABQ58114 | Finn, 2007a |
| | <i>Verasper moseri</i> VtgAb | AB181834 | Sawaguchi vd 2005a |
| Takım: PERCIFORMES | <i>Dicentrarchus labrax</i> VtgAb | JQ283442 | Bu çalışma |
| | <i>Morone americana</i> VtgAb | DQ020121 | Reading vd 2009 |
| | <i>Morone saxatilis</i> VtgAb | HQ846510 | Yayınlanmamış veri |
| | <i>Pagrus major</i> VtgAb | AB181839 | Sawaguchi vd 2006 |
| | <i>Centrolabrus exoletus</i> VtgAb | FJ456931-2 | Finn vd 2009 |
| | <i>Labrus mixtus</i> VtgAb | FJ456935 | Finn vd 2009 |
| | <i>Thunnus thynnus</i> VtgAb | GU217572 | Pousis vd 2011 |
| Takım: GASTEROSTEIFORMES | <i>Gasterosteus aculeatus</i> VtgAb | ENSEMBL | ENSGACP00000012923 |
| Takım: CYPRINODONTIFORMES | <i>Fundulus heteroclitus</i> VtgAb | Q98893 | LaFleur vd 1995b |
| | <i>Gambusia affinis</i> VtgAb | AB181836 | Sawaguchi vd 2005a |
| | <i>Xenotoca eiseni</i> VtgAb | EU761162 | Yayınlanmamış veri |
| Takım: BELONIFORMES | <i>Oryzias latipes</i> VtgAb | BAB79591 | Yayınlanmamış veri |
| Takım: MUGILIFORMES | <i>Mugil cephalus</i> VtgAb | AB288933 | Amano vd 2007a |
| Süper takım: PARACANTHOPTERYGII | | | |
| Takım: GADIFORMES | <i>Melanogrammus aeglefinus</i> VtgAb | AAK15157 | Reith vd 2001 |
| Süper takım: ACANTHOPTERYGII | | | |
| Takım: PERCIFORMES | <i>Dicentrarchus labrax</i> VtgC | JQ341410 | Bu çalışma |
| | <i>Morone americana</i> VtgC | DQ020122 | Reading vd 2009 |
| | <i>Morone saxatilis</i> VtgC | HQ846511 | Yayınlanmamış veri |
| | <i>Pagrus major</i> VtgC | AB181840 | Sawaguchi vd 2006 |
| | <i>Centrolabrus exoletus</i> VtgC | FJ456933 | Finn vd 2009 |
| | <i>Labrus mixtus</i> VtgC | FJ456936 | Finn vd 2009 |
| | <i>Thunnus thynnus</i> VtgC | GU217573 | Yayınlanmamış veri |
| Takım: GASTEROSTEIFORMES | <i>Gasterosteus aculeatus</i> VtgC | ENSEMBL | ENSGACP00000012923 |
| Takım: CYPRINODONTIFORMES | <i>Gambusia affinis</i> VtgC | AB181837 | Sawaguchi vd 2005a |
| | <i>Xenotoca eiseni</i> VtgC | EU761163 | Yayınlanmamış veri |
| Takım: MUGILIFORMES | <i>Mugil cephalus</i> VtgC | AB288934 | Amano vd 2007a |

4.4. Levrek Vitellojenleri Sinyal Peptidleri ve Bunların Ayırışma Bölgeleri

Her üç SbsVtg polipeptidin de Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4’de görüldüğü üzere N-ucu bölgelerinde 15 rezidü büyüklüğünde öngörülen bir sinyal peptidi taşıdığı tespit edilmiştir. Beyaz levrek, çizgili levrek, mercan ve kefal gibi farklı teleost türlerine ait olgun Vtg proteinlerinin veya LvH alt birimlerinin bilinen N-ucu amino asit dizileri ile levrek Vtg amino asit dizileri (sinyal peptidi dahil)’nin eşleştirilmeleri yardımıyla korunmuş SbsVtg sinyal peptid bölgeleri ve bunların enzimatik ayırışma bölgeleri belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

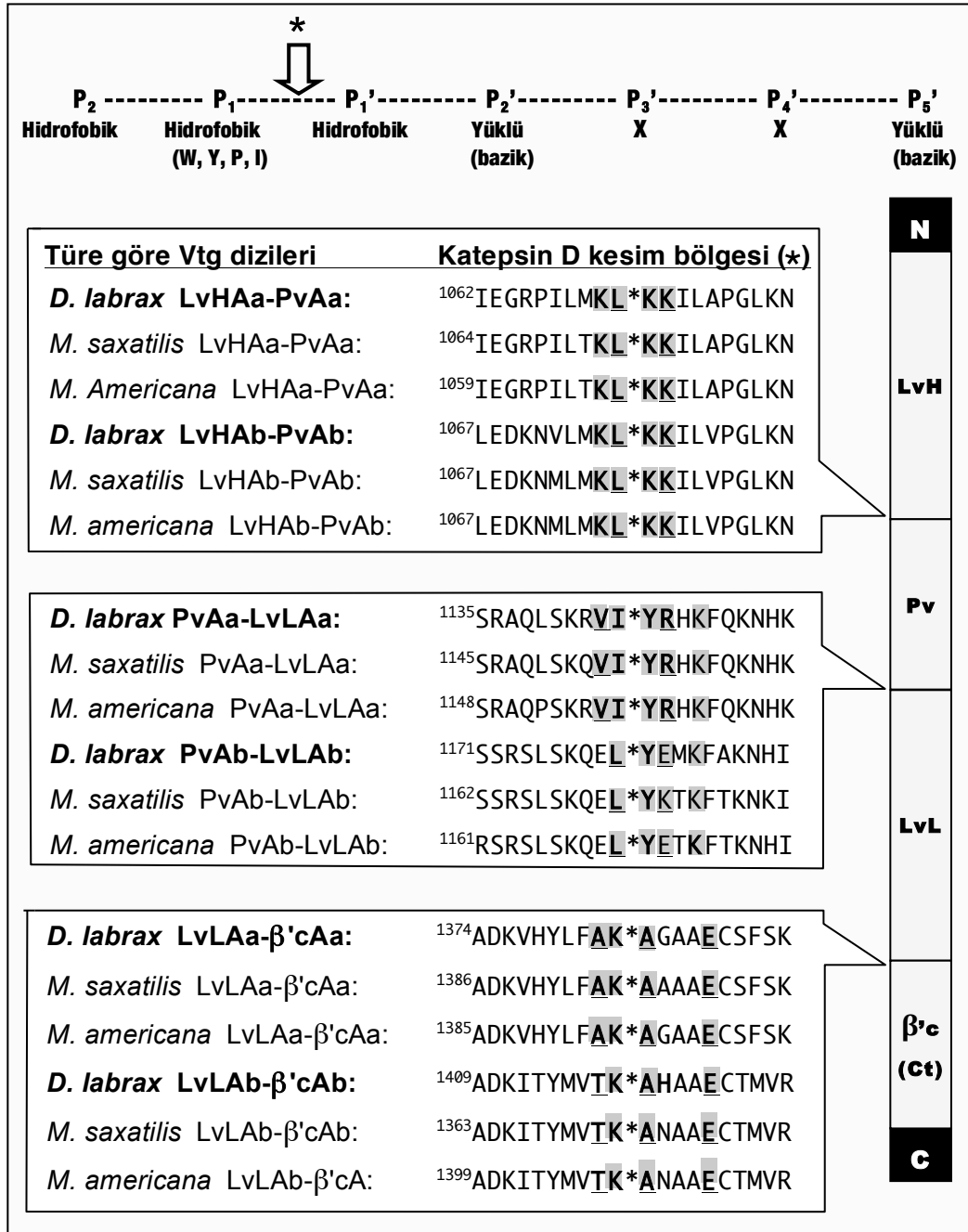
Sinyal peptid dizileri ve 22 aa uzunluktaki Vtg/LvH N-ucu bölgesinin SbsVtgAa için, WpVtgAa dizileriyle % 89, SbsVtgAb için WpVtgAb dizileri ile % 95, ve SbsVtgC için WpVtgAb dizileri ile % 100 özdeşlik gösterdiği belirlenmiştir. N-ucu bölge sekanslamasıyla doğrulanmış olan beyaz levrek dizileri (Hiramatsu vd 2002ae, Reading vd 2009), çizgili levrek dizileriyle karşılaştırıldığında benzer değerlerle karşılaştırılırken, levrek veya beyaz levrek dizileri diğer teleostlardan mercan ve kefal dizileriyle karşılaştırıldığında çok daha düşük özdeşlik değerleriyle karşılaşılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Levrek vitellojenlerine ait sinyal peptid dizilerinin diğer türlerle karşılaştırılması. Sinyal peptidlerin enzimatik ayrışma bölgeleri (**), bilinen bir N-ucuna sahip tahmini Vtg veya LvH polipeptid (Vtg/LvH) dizilerinin karşılaştırılmasıyla tanımlanmıştır. Tek çizgiler (-), VtgAa dizileriyle optimum karşılaştırma için tam diziye girilmiş boşlukları ifade etmektedir. Altı çizili rezidüer, diğer bir *Moronidae* üyesi olan beyaz levrek Vtg dizisine birebir özdeşliği ifade etmektedir. ‘ID %’ kolonunda, 37 rezidü üzerinden karşılaştırılan sinyal peptid dizisinin beyaz levrek VtgAb sinyal peptid dizisiyle özdeşlik oranı verilmiştir. Koyu karakterlerle gösterilmiş rezidüere, Pv taşıyan diğer Vtg’lerden farklı olarak sadece VtgC’de rastlanmıştır.

| Vtg | Sinyal peptid**N-ucu Vtg/LvH dizileri | ID % |
|---------------------------|--|------|
| <i>D. labrax</i> VtgAa | <u>MRAVALALTLALVA</u> -G**-QPHNLAPEFAAGKTYVYKYEAL | 89 |
| <i>M. americana</i> VtgAa | <u>MRVVVLALTLALVA</u> -G**-QLHNLAPEFDAGKTYVYKYEAL | 100 |
| <i>M. saxatilis</i> VtgAa | <u>MRVVVLALTLALVA</u> -G**-QLHNLAPEFAAGKTYVYKYEAL | 97 |
| <i>P. major</i> VtgAa | <u>MRAVVLALTLALVA</u> -G**-QPHNLAPEFAAGRTYVYKYETL | 86 |
| <i>M. cephalus</i> VtgAa | <u>MRAVVLALS</u> LAFFVSA**GQSQHFAPDFAAGKTFVYKYEAL | 65 |
| <i>D. labrax</i> VtgAb | <u>MRVLVLAFTVALAAA</u> **NHINFVPEFSAGKTYVYKYEAL | 95 |
| <i>M. americana</i> VtgAb | <u>MRVLVLAFTVALAAA</u> **NHINFAPEFAAGKTYVYKYEAL | 100 |
| <i>M. saxatilis</i> VtgAb | <u>MRVLVLAFTVALAAA</u> **NHVNFAPEFAAGKTYVYKYEAL | 97 |
| <i>P. major</i> VtgAb | <u>MRVLILAFTVALATG</u> **YQVNLAPEFAVGRTHMYKYEAL | 70 |
| <i>M. cephalus</i> VtgAb | <u>MRVLVLAL</u> TVALVGS**HQISFAPEFAPGKTYEYKYEAF | 73 |
| <i>D. labrax</i> VtgC | <u>MQGLLFCCLVALATC</u> **QSVHYELSLNPKKTYEYKYE ^{EGG} | 100 |
| <i>M. americana</i> VtgC | <u>MQGLLFCCLVALATC</u> **QSVHYELSLNPKKTYEYKYE ^{EGG} | 100 |
| <i>M. saxatilis</i> VtgC | <u>MQGLLFCCLVALATC</u> **QSVHYELSLNPKKTYEYKYE ^{EGG} | 100 |
| <i>P. major</i> VtgC | <u>MQGLLLCCLVALATC</u> **QSLRYDLSLNPRKTYQYKYE ^{GS} | 81 |
| <i>M. cephalus</i> VtgC | <u>MRGLLLCCLVALATS</u> **QSVRYDVSLNPKKTYEYKYE ^{GV} | 81 |

4.5. Levrek Vitellojenleri Türevi Yumurta Sarısı Proteinleri ve Bunların Birincil Enzimatik Ayrışma Bölgeleri

Levrek ve diğer bazı teleost türlere ait Vtg ve YP alt birimlerine ait N-ucu dizileri (LvL, Pv ve β' c) eşleştirildiğinde, bu bölgelerin birbiriyle örtüştüğü gözlenmiştir. Bu bölgeler Vtg öncül proteinlerinin büyümekte olan oosit içerisine alındıktan sonra katepsin D aktivitesiyle YP'lerine parçalandıkları birincil enzimatik ayrışma bölgeleridir (Şekil 4.6). Dizilerin karşılaştırmalı analizleri, bu bölgelerin birçok türde korunmuşluk gösterdiğini ve çoğunun katepsin D tarafından tercih edilen rezidü dizi motifini taşıdığını (Reading vd 2009) ortaya koymuştur. SbsVtgAa için, LvH ve Pv alt birimleri arasındaki enzimatik tanıma bölgesinin 1062 aa, SbsVtgAb için 1067 aa üzerinde yer aldığı belirlenmiştir. Diğer bir enzimatik ayrışma bölgesi, Pv ile LvL arasında olup, bu bölgenin SbsVtgAa için 1135 aa, SbsVtgAb için 1171 aa üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Hafif zincirli lipoprotein (LvL) ve β' c alt birimleri arasındaki enzimatik ayrışma bölgesinin ise SbsVtgAa için 1374 aa, SbsVtgAb için 1409 aa üzerine olduğu gözlenmiştir. Finn (2007a) tarafından bildirilen β' c alt birimi üzerindeki Ct bölgesi için, korunmuş QEY motifiyle tanınan bir diğer enzimatik ayrışma bölgesinin, SbsVtgAa için 1534 aa, SbsVtgAb için 1570 aa üzerinde yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.6. *Moronidae* vitellojenlerinde yumurta sarısı proteinleri tahmini ayrışma bölgeleri. Üstte, katepsin D'nin ayrışma bölgesini tanımda tercih ettiği dizi motifi [P₂, P₁, P₁', P₂', P₃', P₄', P₅'] ve karakteristikleri gösterilmiştir. Burada 'X' dizi üzerinde özellikleri belirsiz herhangi bir rezidüyü ifade etmektedir. Ayrıştırılan YP alt birimleri (LvH-Pv, Pv-LvL ve LvL-β'c), 'Türe göre Vtg dizileri' kolonunda tür ismi ile beraber verilmiştir. Teleostlarda A tipi Vtg için alt birim modeli sağda verilmiştir. Kesim bölgeleri, ilk rezidülerindeki üstel rakamlar, bu bölgelerin Vtg tam amino asit dizileri üzerindeki başlangıç pozisyonunu, (*) ise enzim kesiminin gerçekleştiği amid bağıny ifade etmektedir. Acanthomorph teleost Vtg'lerinde, katepsin D'nin ayrışma bölgesini tanımda tercih ettiği dizi motifi gri ile gölgelendirilmiş karakterlerle, bu dizi motifiyle uyum halindeki substrat rezidüleri ise altı çizili koyu karakterlerle gösterilmiştir.

Birincil YP ayrışma bölgeleri iki paralog VtgA (VtgAa ve VtgAb) formunu taşıyan birçok teleostta bulunmaktadır. Bu ayrışmayı gerçekleştiren katepsin D'nin tanıdığı özgün hedef peptid dizileri, Reading vd (2009) tarafından analiz edilmiştir. Katepsin D'nin, Şekil 4.6'da (*) ile gösterilmiş kesim bölgelerini tanıması belli kimyasal karakteristiklere sahip özgün amino asit dizi motiflerinin varlığına bağlıdır. Kesimin gerçekleştiği amid bağına komşuluk eden rezidüer (sırasıyla ayrışma bölgesinin hemen solu ve sağında bulunan P₁ ve P₁' rezidüleri) genellikle hidrofobiktir. Katepsin D'nin ayrışma bölgesini tanıyabilmesi için P₂' veya P₅' pozisyonunda tercihen bazik yüklü bir diğer rezidü yer almalıdır. P₁ pozisyonunda lösin [L] veya tirozin [Y], triptofan [W], fenilalanin [F] gibi aromatik rezidüer tercih edilirken, P₂ ve P₁' pozisyonlarında bulunan rezidüerlerin hidrofobik olma gerekliliği kuralı aynı decede katı değildir [örneğin; P₂ hidrofobik—P₁ hidrofobik (aromatik veya lösin)—*—P₁' hidrofobik—P₂' yüklü (bazik)—P₃' X—P₄' X—P₅' yüklü (tercihen bazik), burada X herhangi bir rezidüyü ifade etmektedir].

Levrek VtgAa ve VtgAb peptid dizileri, tahmini katepsin D tanıma bölgelerinin belirlenmesi amacıyla diğer *Moronidae* (beyaz levrek ve çizgili levrek) türlerine ait dizilerle karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6). Bu bölgeler, YP'lerine ait N-ucu bölgeleri bilinen diğer birçok teleost (*M. americana*, *F. heteroclitus*, *G. affinis*, *V. moseri*, *H. hippoglossus*, *M. cephalus* ve *P. major*) için daha önceden doğrulanmıştır (Reading vd 2009). *Moronidae* Vtg dizilerinin bu karşılaştırmaları, her Vtg için özgün olan enzim tanıma bölgelerinde bulunan rezidüerlerin yüksek korunmuşluk gösterdiğini ve Şekil 4.6'da belirtilen katepsin D'nin tercih ettiği rezidü motifiyle yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

LvH ile Pv arasındaki ayrışma bölgesi için P₂-P₁*P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' pozisyonlarında yer alan KL*KKILX motifi, her iki *Moronidae* Vtg (VtgAa ve VtgAb) için de aynı olup burada X, alanin [A] veya valin [V] olabilmektedir. Böylece katepsinin ayrışma bölgesini tanıyabilmesi için P₁ ve P₂' pozisyonlarında bulunması gereken rezidüerlerin kimyasal karakteristikleri, lösin [L] ve lizin ([K], bazik yüklü) ile karşılanmış olur. Ayrıca P₂ ve P₁' pozisyonlarında olması gereken hidrofobik rezidü yerine [K] bulunmasının kabul edilebilir olmasının nedeni, genellikle polipeptide sadece

terminal yükü etkileşime girecek şekilde gömülü olan bu amino asitin uzun alifatik yan zincire sahip olmasıdır (Reading vd 2009). P₂' pozisyonunda olması istenilen yüklü rezidünün yerinde oluşu, P₅' pozisyonunda bulunması gereken yüklü rezidülerin yerine hidrofobik rezidülerin ([A] ve [V]) bulunmasını, kabul edilebilir bir durum haline getirmektedir. Bu enzimatik ayrışma bölgesi, beyaz levrekte saflaştırılmış PvAb preparasyonu N-ucu bölgesinin doğrudan sekanslanmasıyla doğrulanmıştır (Reading vd 2009).

Moronidae VtgAa üzerinde Pv ile LvL arasındaki enzimatik ayrışma bölgesi için P₂-P₁*P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' pozisyonlarında yer alan ortak bir VI*YRHKF motifi görülmektedir. Burada P₂ ve P₂' rezidüleri, katepsin D'nin ayrışma bölgesini tanıyabilmesi için gerekli karakteristikleri (sırasıyla [V], hidrofobik ve [R], bazik yüklü) taşımaktadır. Reading vd (2009) tarafından belirtildiği üzere, teleost türlerde günümüze kadar incelenmiş YP ayrışma bölgelerinin çoğunda katepsin D, P₁ ve P₁' pozisyonlarında alifatik veya aromatik rezidüler tercih etmektedir. *Moronidae* VtgAa için bu rezidülerin, P₁ için alifatik bir amino asit olan izolösin [I] ve P₁' için aromatik bir amino asit olan tirozin [Y] olduğu görülmektedir. *Moronidae* VtgAb üzerinde Pv ile LvL arasındaki enzimatik ayrışma bölgesi için P₂-P₁*P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' pozisyonlarında yer alan bir EL*YX¹X²KF motifi görülmektedir. Burada X¹ glutamik asit [E] veya [K], X² ise metiyonin [M] veya treonin [T] olup diğer pozisyonlardaki rezidüler, katepsin D'nin ayrışma bölgesini tanıyabilmesi için gereken kimyasal özellikleri taşımaktadır (P₁: [L], hidrofobik; P₁': [Y], aromatik; P₂': [E], bazik yüklü veya [K], bazik yüklü). P₂ pozisyonunda hidrofobik rezidü yerine [E] bulunması, daha önce de bahsedildiği üzere bu kuralın sıkı olmayışından dolayı kabul edilebilir bir durumdur. P₅ pozisyonunda aromatik fenilalanin [F] bulunması da P₂' pozisyonunda olması istenilen bazik yüklü rezidü [K]'nın yerinde oluşundan dolayı kabul edilebilir bir durumdur. Bu enzimatik ayrışma bölgesi, VtgAb için beyaz levrekte saflaştırılmış ~29 kDa moleküler büyüklüğe sahip bir Lv (YP1) preparasyonu N-ucu bölgesinin doğrudan sekanslanmasıyla doğrulanmıştır. Bu sekanslamadan elde edilen dizilerin tahmini moleküler ağırlığının, ~29 kDa olarak hesaplanmış olan beyaz levrek LvLAb dizisiyle aynı olduğu bildirilmiştir (Hiramatsu vd 2002a, Reading vd 2009).

Moronidae VtgAa üzerinde LvL ile β' c arasındaki enzimatik ayrışma bölgesi için, P₂-P₁*P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' pozisyonlarında yer alan ve X rezidüsünün [A] veya glisin [G] olduğu bir AK*AXAAE motifi görülmektedir. Bu motif, katepsin D'nin ayrışma bölgesini tanıyabilmesi için gerekli kimyasal karakteristikler taşıyan rezidüleri olmaları gereken yerde bulundurmaktadır. Buna göre, P₂ pozisyonunda hidrofobik olan [A], P₁ pozisyonunda daha önce bahsedildiği üzere, kabul edilebilir özelliklerde olan [K], P₁' pozisyonunda hidrofobik olan [A] ve P₅' pozisyonunda asidik yüklü olan [E] bulunmaktadır. P₂' pozisyonunda olması gereken yüklü rezidüler yerine hidrofobik olan rezidülerin ([A] veya [G]) bulunması, P₅' pozisyonunda tercih edilen yüklü rezidünün yerinde oluşundan dolayı kabul edilebilir bir durumdur. *Moronidae* VtgAb üzerinde LvL ile β' c arasındaki enzimatik ayrışma bölgesi için P₂-P₁*P₁'-P₂'-P₃'-P₄'-P₅' pozisyonlarında yer alan ve X rezidüsünün histidin [H] veya asparjin [N] olduğu bir TK*AXAAE motifi görülmektedir. Bu motif, katepsin D'nin ayrışma bölgesini tanıyabilmesi için gerekli kimyasal karakteristikler taşıyan rezidüleri olmaları gereken yerde bulundurmaktadır. Buna göre, P₁ pozisyonunda tolere edilebilir bir rezidü olan [K], P₁' pozisyonunda hidrofobik olan [A] ve P₅' pozisyonunda asidik yüklü olan [E] bulunmaktadır. P₂' pozisyonunda yüklü rezidü yerine neredeyse nötral veya tam nötral olan, sırasıyla [H] veya [N] bulunması, P₅' pozisyonunda tercih edilen yüklü rezidünün yerinde oluşundan dolayı kabul edilebilir bir durumdur. Ayrıca P₂ pozisyonunda olması tercih edilen hidrofobik rezidü yerine polar treonin [T] bulunması da bu pozisyonda hidrofobik rezidü bulunması kuralının katı olmayışından dolayı kabul edilebilir bir durumdur. Bu enzimatik ayrışma bölgesi, beyaz levrek ovaryum ekstraktından saflaştırılmış bir β' cAb preparasyonu N-ucu bölgesinin doğrudan sekanslanması yoluyla doğrulanmıştır (Hiramatsu vd 2002a).

4.6. Levrek 'Tam' Vitellojenlerine Ait Fosvitin Alt Birimleri, Fosforilasyon ve Glikolizasyonu

Fosvitin karaciğer tarafından kana salgılanmasından önce yapısına kovalent bağlarla fosfat bağlama yeteneğine sahip serin rezidüleri taşıyan (% 50'nin üzerinde oranda) bir metalloproteindir. Serin üzerindeki negatif yüklü fosfat iyonlarına kalsiyum, magnezyum, çinko ve diğer yüklü katyonları (örneğin demir) bağlamak suretiyle bu

iyonların Vtg aracılığıyla büyümekte olan oosit içerisine taşınmalarını sağlar. Metal iyonlarının bu yöntemle taşınmasının bu iyonlarca zengin deniz ortamında yaşayan balıklardan ziyade tatlı sularda yaşayan balıklar için daha önemli olduğu bildirilmiştir (Finn 2007b, Reading ve Sullivan 2011). Vitellojen molekülleri, karaciğer hücrelerinden salgılanmadan önce, Golgi yapılarında fosforile olurlar. Bu aşamada, serin rezidülerine bağlanan fosfat iyonlarının, Vtg'nin vaktinden önce proteolizini önlediği, kandaki çözünürlüğünü artırdığı ve LvH-LvL aracılığıyla sağlanan lipid taşınması sırasındaki etkileşimlerde, Vtg yapısını stabilize tutmaya yardımcı olduğu sanılmaktadır (Finn vd 2007b). Reading ve diğerleri (2009) tarafından belirtildiği üzere, Vtg Pv alt birimlerinin büyüklükleri teleost türler arasında ciddi farklılıklar göstermektedir. Buna göre, gelişmiş acanthopterygian ve paracanthopterygian balıklara ait Vtg Pv alt birimleri daha büyük moleküller halindedir. Filogenetik açıdan birbirine uzak teleost türlerde bile Pv ve Lv alt birimlerinin büyüklükleri arasındaki pozitif korelasyon olduğu, Pv alt biriminin LvH ve LvL ile lipid taşıyıcılar olarak beraber hareket ettiklerini ortaya koymaktadır (Finn 2007b).

Levrek Vtg Pv alt birimleri büyüklükleri ve serin içeriklerinin (SbsPvAa 73 aa, ~52% serin, SbsPvAb 104 aa, ~55% serin) diğer teleostlar için bildirilen değerlerle benzer olduğu belirlenmiştir. Buna göre, özellikle *Moronidae* familyasından olan beyaz levrek için bildirilen WpPvAa 89 aa, ~61% serin, WpPvAb 94 aa, ~51% serin (Reading vd 2009) ve çizgili levrek için GenBanka sunulmuş cDNA dizilerinden hesaplanmış StbPvAa 80 aa, 53% serin, StbAb 94 aa, 52% serin oranlarının levrek için yukarıda verilen değerlerle yüksek benzerliği dikkat çekmektedir. SbsVtgAa, 73 amino asitlik bir Pv alt birimine sahip olup bu rezidülerin 38'inin serin, bir tanesinin ise treonin [T] potansiyel fosforilasyon bölgeleri olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında SbsVtgAb, 104 amino asitlik bir Pv alt birimine sahip olup, bunların 57'sinin serin ikisinin ise treonin potansiyel fosforilasyon bölgeleri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Beyaz levrek VtgAa ve VtgAb için belirtildiği üzere (Reading vd 2009), levrek Vtg'leri Pv alt birimi üzerindeki serin rezidülerinin büyük çoğunluğunun fosforile olduğu görülmektedir. Tavuk yumurtasında Pv alt biriminin, yüksek oranda fosforilasyon yeteneğinden dolayı bazı metallerce katalize olan fosfolipid oksidasyonunu inhibe eden bir antioksidan olarak görev yaptığı uzun zamandır bilinmektedir (Lu ve Baker 1986,

1987). Bu nedenle, levreğe ve diğer teleostlara ait Pv alt birimlerindeki yüksek fosforilasyon oranının, 'tam' yapıdaki Vtg'ler tarafından oosite taşınan fosfolipid kargolarını koruyucu görev yaptığı sanılmaktadır. Finn (2007b), Pv alt biriminden yoksun olan VtgC'nin lipid taşınmasında görev alıyor olmasına rağmen lipid içeriğinin, genellikle 'tam' Vtg formlarına göre çok daha düşük olduğunu ve belli bir ağırlığı geçmediğini bildirmiştir.

Daha önce belirtildiği ve C tipi Vtg'de tipik özellik olduğu üzere, SbsVtgC'nin bir Pv alt birimi taşımadığı görülmektedir. Ayrıca SbsVtgAa'nın 2 potansiyel *N*-bağlı (*N*-linked) ve 3 potansiyel *O*-bağlı (*O*-linked) glikolizasyon bölgelerine sahip olduğu, buna karşın SbsVtgAb'nin ise yalnızca bir *N*-bağlı ve 7 *O*-bağlı potansiyel glikolizasyon bölgelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Diğer acanthomorph teleostların çoğunda olduğu gibi levrek Pv alt birimleri üzerindeki bu potansiyel glikolizasyon bölgelerinin, aynı zamanda muhtemelen yumurta sarısı içerisine karbonhidrat taşınmasında da görev aldığı sanılmaktadır. Glikolizasyon, ayrıca proteinlerin konformasyonel stabilitesini artırdığından (Sola ve Griebenow 2009) Pv alt biriminin Vtg'lerin yapısal stabilizasyonunda görev alması da söz konusudur.

4.7. Levrek 'Tam' Vitellojenlerine Ait β 'c ve Ct Alt Birimleri

Dişi levrek ovaryum ekstraktlarının nanoLC/MS/MS analizinde, levreğe ait her iki 'tam' Vtg formu için saptanmış olan triptik peptidlerden 3'ünün SbsVtAa, 8'inin ise VtgAb β 'c alt birimine ait olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6). Ayrıca, SbsVtgAa ve SbsvtgAb'nin her ikisinde de LvL ve β 'c alt birimleri arasında katepsin D tanıma bölgesi kriterleriyle uyuşan özelliklere sahip olan bir enzimatik ayrışma bölgesi yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu bölgenin, *Moronidae* türleri arasında yüksek korunmuşluğa sahip olduğu görülmüştür. Levrek ve beyaz levrek VtgAb için 20 rezidülük bu ayrışma bölgesi karşılaştırıldığında, 12nci rezidüde [N] yerine [H]'in bulunduğu görülmektedir. Bu bölge iki tür arasında, katepsin D tanıma bölgesi kriterlerine uyan tek bir rezidü farkıyla, % 95 oranında özdeşlik göstermektedir (Şekil 4.6). SbsVtgAb'nin, enzimatik ayrışmanın gerçekleştiği varsayılan amid bağından sonra gelen kısmının, Sbs β 'cAb (Şekil 4.9) ve Wp β 'cAb (Reading vd 2009) için cDNA'dan

türetilen amino asit dizileri için hesaplanan tahmini moleküler ağırlıklarıyla benzer büyüklükte (~17 kDa) olduğu görülmüştür. Bu değerin ayrıca, beyaz levrek ovaryumundan saflaştırılmış N-ucu sekanslamasıyla belirlenmiş β' c alt birimi dizisiyle özdeş olduğu görülmektedir (Hiramatsu vd 2002a). Bu gözlemlerin tamamı, levrekte PV aşamasındaki oositlerde 'tam' Vtg formlarının, ~14 kDa'luk büyüklüğe sahip olduğunu ve C-ucunda birbirinden farklı iki β' c YP alt birimi (Sbs β' cAa ve Sbs β' cAb)'ni meydana getirdiğini ortaya koymaktadır.

Daha önce bahsedildiği üzere, Finn (2007a) Atlantik pisi balığı VtgAa ve VtgAb üzerinde QEY korunmuş motifleriyle başlayan bir Ct alt birimi bildirmiştir. Bu motifin, *Moronidae* VtgAa ve VtgAb tam dizilerinde korunmuş olduğu ve SbsVtgAa, WpVtgAa (Reading vd 2009) ve StbVtgAa (GenBank) için, sırasıyla 1534, 1545 ve 1541 pozisyonlarındaki rezidüleriyle başladığı görülmektedir. SbsVtgAb, WpVtgAab (Reading vd 2009) ve StbVtgAb (GenBank) için aynı motif, sırasıyla 1570, 1560 ve 1560 pozisyonlarındaki rezidüleriyle başlamaktadır (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). *Moronidae* türlerinde, bu ayrışma bölgesinin işlevliliği ve Ct dizisinin farklı bir YP alt birimi olması, oosit veya yumurtalardan izole edilmiş CtAa ve CtAb üzerinde daha ayrıntılı çalışmalarla kanıtlanması gereken konulardandır. Ancak bu çalışmada, postvitellojenik aşamadaki dişilere ait ovaryum ekstraktlarının nanoLC-MS/MS analizi sonucu elde edilen 14 rezidüye sahip bir triptik peptidin, SbsVtgAb üzerinde yer alan Ct bölgesine karşılık geldiği görülmüştür (Çizelge 4.6). Bu durum, Ct bölgesinin levrek YP alt birimlerinden biri olabileceği fikrini desteklemektedir. Daha önce yapılmış iki ayrı çalışmada da Ct bölgesinin, gerçek bir YP alt birimi olduğu ortaya konmuştur. Matsubara ve diğerleri (2003), *V. moseri*'de rekombinant Ct polipeptidine karşı geliştirilmiş bir antiserum kullanarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada Western blot analizi ile Ct bölgesini, bu türe ait Vtg'lerin YP alt birimi olarak tespit edebilmişlerdir. Kristoffersen ve diğerleri (2009) SDS-PAGE üzerinde tespit ettikleri *Clupea harengus*'a ait ~30 kDa'luk bir protein bandını tripsin kesimine ve sonrasında kütle spektrometrisi (quadrupole Linear Ion Trap; q-TRAP LC/MS/MS) analizine tabi tuttuklarında, bu türde Vtg (ChvtgAc 1) Ct alt birimine karşılık gelen iki triptik peptid ile karşılaşmışlardır.

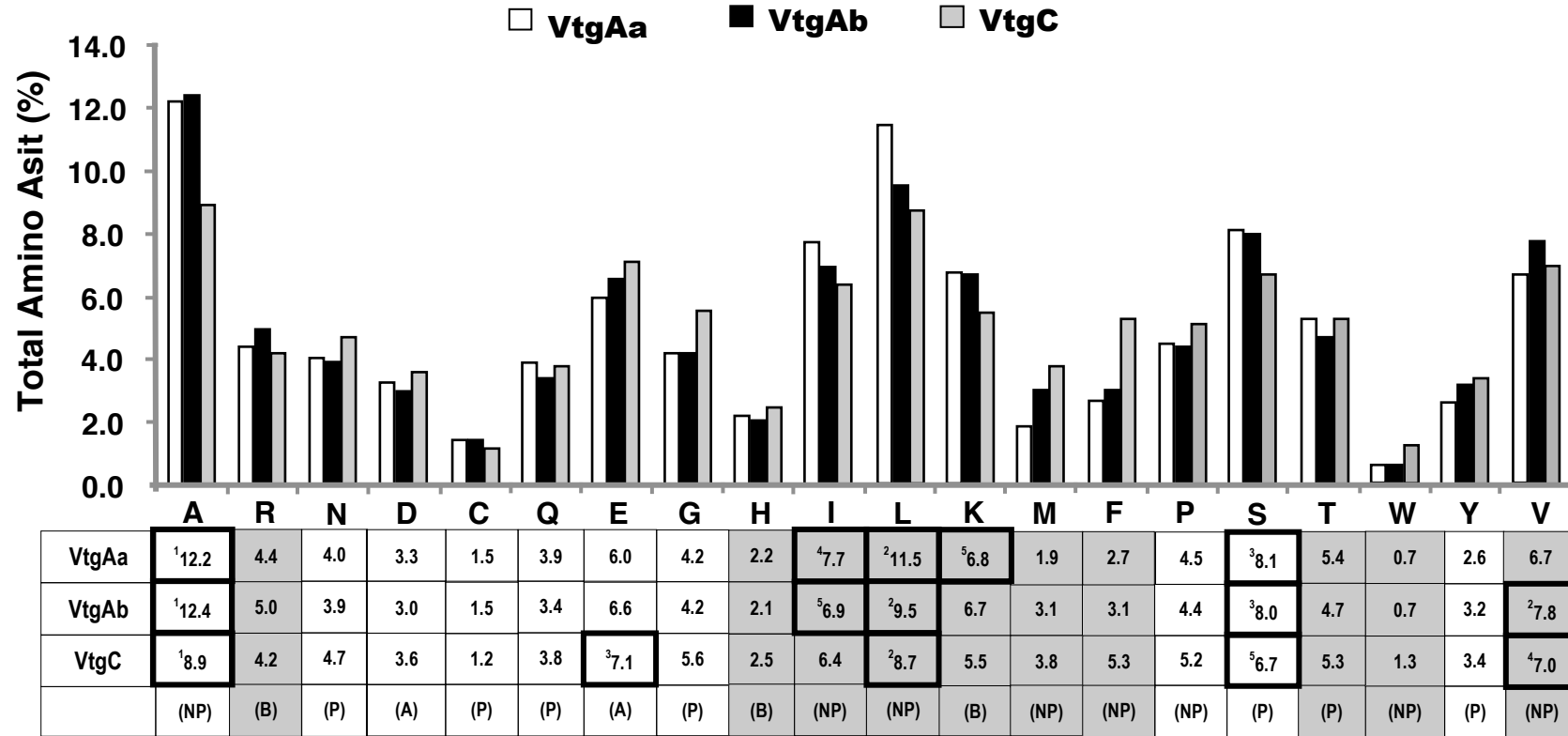
4.8. Levrek Vitellojenlerinin Amino Asit Kompozisyonları

Alanin [A], lösin [L], serin [S], izolösin [I], valin [V] ve lizin [K] yeni yumurtlanmış levrek yumurtalarında FAA havuzunu oluşturan baskın amino asitler (Ronnestad vd 1998) olup, SbsVtg polipeptidlerin yapılarında çok yüksek seviyelerde bulunmaktadır (Şekil 4.7). Her üç SbsVtg'inde de en yoğun olarak bulunan amino asit alanin olup bütün polipeptidin yaklaşık % 9-12'sini oluşturmaktadır (Reading vd 2009).

Yüksek oranlarda yüzebilme yeteneğine sahip yumurtalar bırakan deniz balıklarında, oosit olgunlaşması sırasında Vtg'den türemiş YP'lerin ikincil bir proteolizi sonucu açığa çıkan FAA'lerin ooplazma seviyelerindeki artış sonucunda gerçekleşen ozmotik düşüş, oosit içerisine ciddi oranlarda su girişine yol açar. Bu yoğun su girişi, ovulasyona uğramış yumurtada yüzebilirlik yeteneği kazanımına katkıda bulunduğu bilinen % 83-92'lik su içeriği oranları ile sonuçlanır (Matsubara vd 2003, Cerdá vd 2007, Lubzens vd 2010). Birçok teleost türe ait döllenmiş yumurtada, embriyonik gelişim süreci içerisinde FAA seviyelerindeki düşüşün, bu FAA'lerin embriyoya besin ve de aerobik enerji kaynağı olarak kullanımından kaynaklandığı öne sürülmüştür (Finn ve Fyhn 2010). Atlantik morinası (*Gadus morhua*) embriyolarında, döllenmenin 5 gün sonrasında FAA havuzundaki düşüşün serbest glukoz seviyelerindeki artışla aynı anda gerçekleşmesi, FAA'lerin bu türde embriyonik glukoneogenezde temel substrat maddesi olduğunu ortaya koymaktadır (Finn vd 1995b). İlginç olarak, levrek Vtg'lerinde yüksek seviyelerde bulunan bu amino asitlerin yeni yumurtlanmış levrek yumurtalarında, FAA havuzunda toplam amino asit içeriğinin % 60'ını oluşturacak seviyelerde baskın vaziyette bulunduğu bildirilmiştir (Ronnestad vd 1998). Beyaz levrek (Reading vd 2009) başta olmak üzere diğer türlerde olduğu gibi, bütün levrek Vtg formlarında da tam polipeptidin % 8-12'sini oluşturacak kadar yüksek seviyelerde bulunan tek amino asidin alanin olduğu görülmüştür.

Çok farklı sistematik takımlardan gelen teleost türlere ait Vtg'lerde, bu Vtg'lerden türemiş YP alt birimlerinde ve de yumurtalarda tespit edilmiş yüksek alanin seviyeleri, deniz balıklarına ait pelajik yumurtalardaki FAA havuzunun temel bileşenini

oluşturmaktadır. Bu yüksek seviyelere dayanarak, alaninin embriyogenez sırasında glukoneogenez temel substrat maddesi olarak ve gelişmekte olan embriyoya enerji kaynağı oluşturmak üzere embriyonik karbohidrat metabolizmasında görev aldığı bildirilmiştir (Reading vd 2009). Yüzebilirliği yüksek yumurtalar bırakan deniz acantomorph teleostlarında, son zamanlarda ortaya konmuş ‘tam’ Vtg formlarının (VtgAa ve VtgAb) işlevsel modeline göre, oosit olgunlaşması boyunca değişmeden kalan ve geç larval dönemde besin kaynağı olarak görev yapan LvHAb dışındaki bütün VtgAa ve VtgAb YP alt birimleri, FAA havuzlarını oluşturmak üzere enzimatik olarak FAA'lere ayrıştırılmaktadır (Matsubara vd 1999, 2003, Finn vd 2002b, Finn 2007ab, Kolarevic vd 2008). Benzer şekilde, levrek Vtg'leri arasında en yüksek alanin seviyelerine sahip olan form VtgAa olup, PV ve OV aşamadaki dişi oosit ve yumurtalarına ait SDS-PAGE ve Western blot sonuçları, LvHAa alt biriminin oosit olgunlaşması aşamasında ciddi oranda proteolize uğradığını ortaya koymuştur.



Şekil 4.7. Levrekte üç farklı vitellojen formuna ait amino asit kompozisyonları. Grafik kolonları, her bir amino asitin VtgAa (1656 aa), VtgAb (1692 aa) ve VtgC (1275 aa) içerisindeki oranlarını göstermektedir. Her bir amino asit için tam yüzde (%) değerleri, grafiğin altında yer alan çizelgede verilmiştir. Amino asit isimleri için, standart tek harf kısaltması kullanılmıştır. Her bir Vtg içerisinde en yüksek miktarlarda bulunan ilk beş amino asit, çizelge içerisinde sol-üst karakterlerle ve çizelge hücre kenarları koyulaştırılmış olarak belirtilmiştir. Çizelgenin en alt sırasında parantez içerisinde verilmiş harfler, kimyasal karakteristiklerine göre amino asit gruplarını ((NP); non-polar, (P); polar, (A); asidik ve (B); bazik) ifade etmektedir. Esansiyel amino asitler, gri dolgulu hücrelerle gösterilmiştir.

4.9. Levrek Vitellojenleri Ağır Zincirli Lipovitellinlerinde Reseptör Bağlanma Bölgeleri

Ağır zincirli lipovitellin (LvH) alt birimleri üzerinde bulunan, varsayılan Vtg reseptör bağlanma bölgeleri, önceki çalışmalardan edinilen bilgilere dayanarak saptanmıştır (Stifani vd 1990, Hiramatsu vd 2002a, Reading vd 2009). Dizi karşılaştırma analizleri, SbsVtgAa için reseptör bağlanma bölgesinin 177-185 rezidüleri arasında yer aldığı ve LLTKTRDL amino asit dizisine sahip olduğunu, SbsVtgAb reseptör bağlanma bölgesinin 177-185 rezidüleri arasında yer aldığı ve LLTKTKDL amino asit dizisine sahip olduğunu, SbsVtgC reseptör bağlanma bölgesinin ise 178-186 rezidüleri arasında yer aldığı ve TITQVVDV dizisine sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Çizelge 4.5).

Daha önce belirtildiği üzere ‘tam’ Vtg formları, büyümekte olan oosit içerisine çok düşük yoğunluktaki lipoprotein reseptörü (Very Low Density Lipoprotein Receptor, VLDLR) süpergen familyasına ait olan özelleşmiş membran reseptörleri (VtgR) tarafından kontrol edilen endositoz yoluyla alınırlar. Vtg’lerin, VtgR’lerine bağlanmasının ardından Vtg-VtgR kompleksleri, klatriin kaplı yapılarla periferel ooplazmada veziküller oluşturmak üzere birleşirler. Bu veziküller, daha sonra katepsinleri içeren lizozomlarla birleşerek multiveziküler yapıları oluştururlar (Babin vd 2007). Vitellojenler ilk olarak, oosit büyümesi aşamasında katepsin D tarafından YP alt birimlerine, daha sonra olgunlaşma aşamasında ise diğer katepsinler (örn. katepsin B ve L) tarafından ikinci bir proteolizle FAA’lere ayrıştırılırlar (Carnevali vd 2006). Son zamanlarda beyaz levrekte gerçekleştirilmiş reseptör bağlanma çalışmaları ve ligand blotlama deney sonuçları, VtgAa ve VtgAb’nin tercihen farklı VtgR formlarına bağlandığı ve VtgC’nin ise oosit membran reseptöründen yoksun olduğunu ortaya koymuştur. Buna göre, VtgC’nin oosit içerisine reseptör kontrollü endositoz sırasında diğer Vtg formlarının veya başka proteinlerin yanında sıvı fazda giriş yaptığı sanılmaktadır (Reading vd 2011).

Vtg’nin VtgR’e bağlanması sırasında, Vtg üzerinde bulunan bağlanma bölgesindeki pozitif yüklü rezidü gruplarının, VtgR ekstraselüler yapısı üzerinde

bulunan 8 rezidülük ligand bağlanma tekrar grupları (Ligand Binding Repeats; LBR)'ndaki negatif yüklü rezidüer ile karşılıklı etkileşime geçtikleri sanılmaktadır (Schneider 1996, Nimpf ve Schneider 1998). İlk çalışmalar, VtgR bağlanma bölgesinin teleost Vtg'lerde Lv alt birimleri üzerinde bulunduğunu göstermiştir (Stifani vd 1990, Hiramatsu vd 2002a). Li ve diğeri (2003) tarafından gerçekleştirilmiş daha sonraki çalışmalarda, belli rezidüerlerin seçici modifikasyonu ile beraber maya iki hibrit yöntem kullanılarak, reseptörün bazik amino asitlerce zengin HLT**K**TKDL kısa motifine bağlanma bölgesi tespit edilmiştir. Buna göre, tilapia (*Oreochromis aureus*) LvI (tilapia LvHAb) üzerinde yer alan ve bu motif üzerinde koyu fontla belirtilmiş lizin (K¹⁸¹) rezidüsünün bağlanmada kritik önem taşıdığı bildirilmiştir (Li vd 2003).

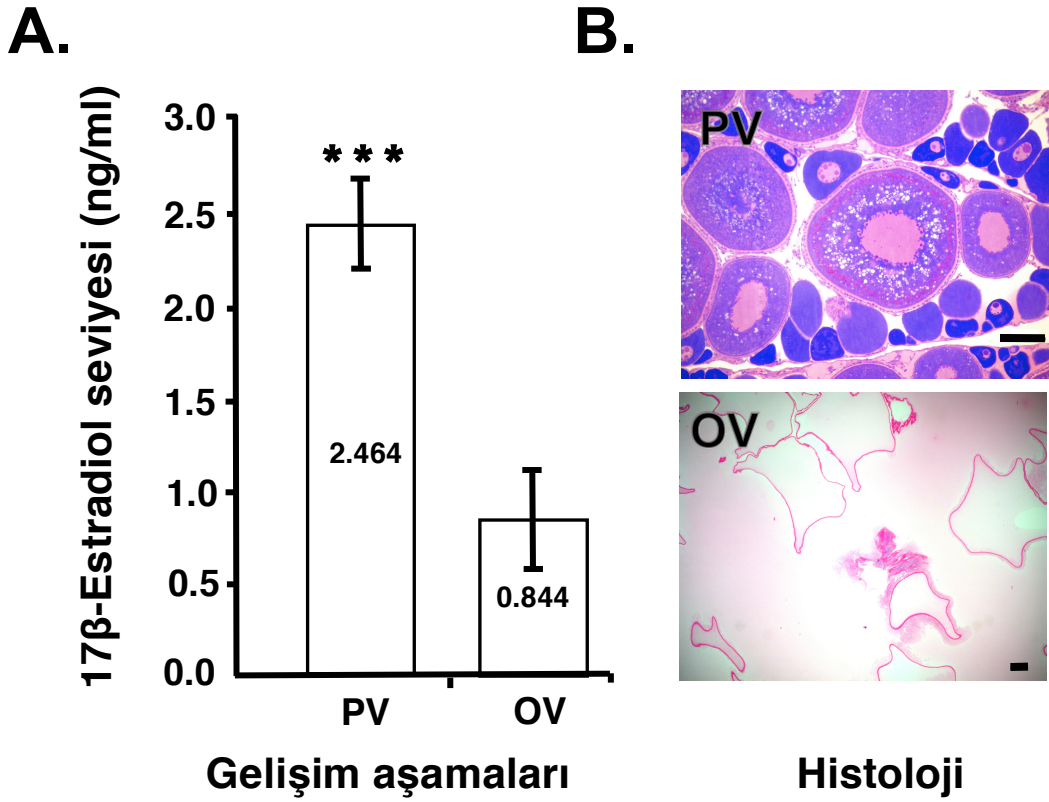
Tilapia LvI dizilerinin, beyaz levrek (Reading vd 2009) dahil diğeri türlere ait Vtg dizileriyle karşılaştırmaları, 'tam' Vtg'ler üzerinde yer alan bu varsayılan reseptör bağlanma bölgelerinin de bazik rezidüerlerce zengin olduğunu ortaya koymuştur. Bu karşılaştırmalarda ayrıca söz konusu motif üzerindeki ilk lizin (tilapiada [K¹⁸¹], diğeri türlerde [K¹⁷⁴⁻¹⁸²]) rezidüsünün tamamen korunmuş olduğu belirlenmiştir. Ancak beyaz levrek ve diğeri türlere ait VtgC dizilerinde, lizin rezidüsü yerine glutamin [Q] bulunmasının WpVtgC'nin ovaryum membran reseptörlerine veya membran proteinlerine bağlanmasındaki başarısızlığın nedeni olabileceği öne sürülmüştür (Reading vd 2011). Bu çalışmadaki sonuçlardan da görüleceği üzere diğeri türlerde olduğu gibi levrekte de SbsVtgAa ve SbsVtgAb üzerinde varsayılan reseptör bağlanma bölgesinde korunmuş [K] rezidüsü ve SbsVtgC üzerinde bunun yerine [Q] rezidüsü bulunmaktadır. *Moronidae* türleri arasında (*D. labrax*, *M. americana* ve *M. saxatilis*), 8 rezidülük varsayılan reseptör bağlanma bölgesi motifi VtgAa ve VtgC için tamamen korunmuş olup SbsVtgAb için yalnızca bir rezidü ([M] yerine [L])'nin farklılığı söz konusudur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Levrek vitellojenleri reseptör bağlanma bölgelerinin diğer teleost türlerindeki bölgeler ile karşılaştırması.

| Türe Göre Vitellojen Formu | Reseptör Bağlanma Bölgesi | GenBank numarası |
|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <i>D. labrax</i> VtgAa | LLTKTRDL | JQ283441 |
| <i>M. americana</i> VtgAa | LLTKTRDL | DQ020120 |
| <i>M. saxatilis</i> VtgAa | LLTKTRDL | HQ846509 |
| <i>P. major</i> VtgAa | LLTKTRDL | BAE43870 |
| <i>M. cephalus</i> VtgAa | LLTKTRDM | AB288932 |
| <i>D. labrax</i> VtgAb | LLTKTKDL | JQ283442 |
| <i>M. americana</i> VtgAb | LLTKTKDM | DQ020121 |
| <i>M. saxatilis</i> VtgAb | LLTKTKDM | HQ846510 |
| <i>P. major</i> VtgAb | LLTKTKDL | BAE43871 |
| <i>M. cephalus</i> VtgAb | IVLTKKDL | AB288933 |
| <i>D. labrax</i> VtgC | TITQVVDV | JQ341410 |
| <i>M. americana</i> VtgC | TITQVVDV | DQ020122 |
| <i>M. saxatilis</i> VtgC | TITQVVDV | HQ846511 |
| <i>P. major</i> VtgC | TITQVVDV | BAE43872 |
| <i>M. cephalus</i> VtgC | TITQVVDV | AB288934 |

4.10. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Kan Plazmasında ve Ovaryumda SDS-PAGE ve Western Blot Yöntemleri ile Saptanması

Bu çalışmada Western blot ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmak üzere, kan plazma ve doku (karaciğer ve ovaryum) temini için örneklenmiş, postvitellojenik (PV) ve ovulasyon (OV) aşamasındaki dişi levreklerle (Çizelge 3.1) ait plazma E₂ seviyeleri Şekil 4.8A'da verilmiştir. F. PRAT ve A. IBAÑEZ tarafından elde edilmiş ve O YILMAZ tarafından analiz edilerek grafiğe dökülmüş olan bu veriler, plazma E₂ seviyelerinin PV aşamada OV aşamaya kıyasla oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu balıklardan PV ve OV aşamalarında alınan ovaryum doku örneklerini temsil eden histolojik kesitlere ait görüntüler Şekil 4.8B'de verilmiştir. Burada belirtilen gonad gelişim aşamaları Mayer ve diğerleri (1988)'ne göre belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Bu çalışmada kullanılan dişi levreklerin kan plazmasındaki 17β-estradiol seviyeleri ve ovaryum histolojik kesit görüntüleri. A. Western blot ve kütle spektrometri analizlerinde kullanılan PV (postvitellojenik) ve OV (ovulasyon) aşamalarındaki dişilere ait plazma 17β-estradiol (E₂) seviyeleri (ng/ml). Düşey kolonlar, N=4 için kolonların içerisinde de sayıyla verilmiş olan ortalama değerleri, düşey ayraçlar ise standart hata (SEM)'yi ifade etmektedir. Üçlü asterisk (***) PV dişilerinin OV dişilerine göre istatistiki açıdan önemli düzeyde farklı ($P \leq 0.01$) E₂ değerlerini ifade etmektedir. B. Postvitellojenik (PV) ve OV dişilerine ait örnek ovaryum doku histolojik kesitleri. Yatay siyah çizgiler 200 µm'lik ölçeği belirtmektedir.

4.10.1. Levrek vitellojenlerinin immünoyokimyasal özellikleri

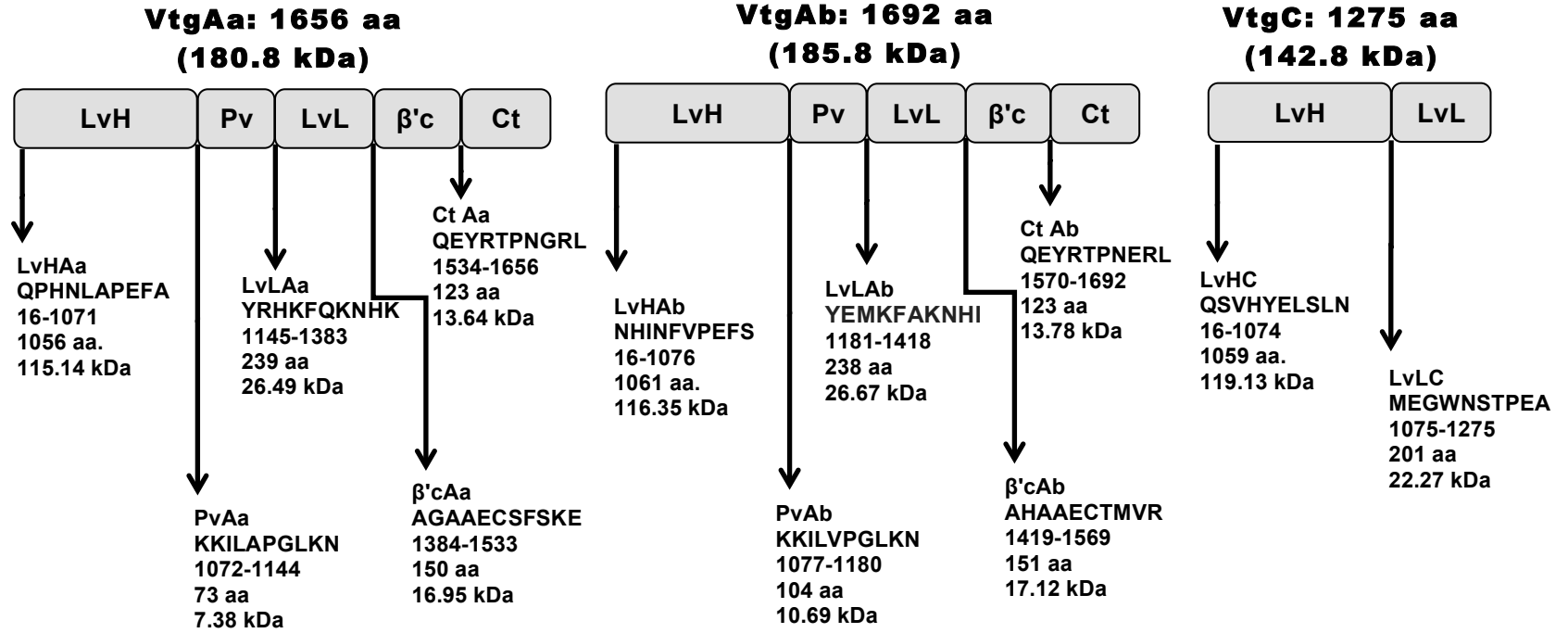
Levrek Vtg cDNA'larından türetilmiş peptid dizileri için hesaplanan tahmini moleküler ağırlıkları (SbsVtgAa 181 kDa, SbsVtgAb 186 kDa, SbsVtgC 143 kDa, Şekil 4.9)'nın, beyaz levrek (WpVtgAa ~181 kDa, WpVtgAb ~183 kDa, WpVtgC ~141 kDa; Reading vd 2009) ve çizgili levrek (StbVtgAa ~182 kDa, StbVtgAb ~185 kDa, StbVtgC ~143 kDa; GenBank, V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayımlanmamış) için aynı yolla hesaplanan tahmini değerlerle çok yakın benzerlikte olduğu görülmektedir. Bu değerler ayrıca beyaz levrek için Hiramatsu ve diğerleri (2002d) tarafından saflaştırılmış olan denatüre birincil WpVtg polipeptidlerinin, SDS-PAGE analizlerinde elde ettikleri bulgularla da yakın uyum içindedir (WpVtgAa ~180 kDa, WpVtgAb ~180 kDa, WpVtgC ~148 kDa). Bu yüksek benzerlikler, SbsVtg ile WpVtg ve StbVtg amino asit dizileri arasında % 93 ile 95 arasında değişen özdeşlik ve % 95 ile 97 arasında değişen benzerlik değerlerinde yansıyan yüksek homoloji (Çizelge 4.2)'den dolayı beklenen bir durumdur. Her üç *Moronidae* türünde de VtgAa ve VtgAb arasındaki yüksek benzerlik, bu iki proteinin beyaz levrekte olduğu gibi (Hiramatsu vd 2002d) levrekte de geleneksel SDS-PAGE üzerinde birbirinden ayıramamasını açıklamaktadır. Acantomorph teleostlarda, VtgAa ve VtgAb arasında moleküler ağırlık ve biyokimyasal karakteristikler açısından belirlenen benzerlikler beyaz levrek (Hiramatsu vd 2002d; Reading vd 2011) ve kefal (Amano vd 2007a)'de de bu iki proteinin saflaştırılması uygulamalarını oldukça karmaşık hale getirmektedir.

Bu çalışmada, üç farklı levrek Vtg formunun Western blot üzerinde saptanmasında kefal Lv (LvAa, LvAb ve LvC)'lerine karşı geliştirilmiş heterolog antikorlar kullanılmıştır. Levrek ve kefal, birbiriyle çok yakın akraba olmayan (Çizelge 4.3) farklı acanthopterygian takımlara (sırasıyla *Perciformes* ve *Mugiliformes*) ait iki tür olsa da taşıdıkları vtg cDNA dizileri ve bunların transkripsiyonu Vtg protein formlarının yakın benzerlik ve alakaları, bu çalışmada ortaya konmuştur (Şekil 4.5). Kefal anti-Lv antikorları, ayrıca sistematik olarak uzak diğer bir teleost tür olan *Cololabis saira* (Takım; *Beloniformes*)'ya ait Vtg'den türemiş Lv'lerin tanımlanması ve saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır (Amano vd 2008c). Benzer olarak, *V. moseri*

(Takım: *Pleuronectiformes*) LvHAa, LvLAa, LvHAb ve LvLAB'ye karşı geliştirilmiş heterolog antikorlar, yine uzak bir tür olan *Clupea harengus* (Takım: *Clupeiformes*)'ta karşılık gelen Vtg formları ve bunların alt birimleri YP'lerin saptanmasında kullanılmıştır (Kristoffersen vd 2009).

Western blot protokolü, her bir levrek Vtg formu ve kefal anti-Lv antikoruna için plazma örnekleri, ovaryum ekstraktları, E₂ ile uyarılmış erkek bireylere ait plazma örnekleri (IP) ve kontrol erkek plazmaları (CP)'na göre ayrı ayrı optimize edilmiştir (Şekil 4.10). Bu sayede, tespit edilen immünoreaktivite özgünlüğü mümkün olduğunca artırılmıştır. Buna göre her bir antikor, SbsVtg polipeptid monomerleri için beklenen büyüklüklere yakın, kendine özgün immünoreaktif bant örnekleri sergilemiştir. Ayrıca, levrek ile yakın akraba olan diğer iki *Moronidae* türü beyaz levrek (Reading vd 20011) ve çizgili levrek (V.N. WILLIAMS, B.J. READING, N. HIRAMATSU ve C.V. SULLIVAN, yayınlanmamış) üzerine yapılmış önceki çalışmalarda, her bir kefal anti-Lv antikorunun, karşılık gelen Vtg'lere gösterdiği özgün immünoreaktivite bu antikorların bu çalışmada kullanılmasına olanak tanımıştır. Bütün bunlara dayanarak, heterolog kefal anti-Lv antikorlarının bu çalışmada levrek Vtg'leri ve bunların alt birimleri YP'lerin tespitinde kullanılması uygun görülmüştür.

SDS-PAGE ve Western blot sonuçlarının anlaşılmasını kolaylaştırmak amacıyla, her bir levrek Vtg birincil polipeptidleri ve bunların YP alt birimlerinin büyüklükleri (aa) ve moleküler ağırlıkları (kDa), her bir YP alt birimine ait dizilerin ilk on rezidü dizisi ve amino asit dizileri üzerindeki pozisyonları Şekil 4.9'da verilmiştir. SbsVtgAa ve SbsVtgAb birincil peptidlerine ait moleküler ağırlıklar, cDNA dizilerinden türetilen amino asit dizileri için, sırasıyla 180.8 ve 185.8 kDa olarak hesaplanmıştır. Birincil SbsVtgC polipeptid için aynı şekilde hesaplanan moleküler ağırlık 142.8 kDa'dur. SbsVtgAa'nın taşıdığı YP alt birimlerine ait moleküler ağırlıklar, LvHAa için 115.1 kDa, PvAa için 7.4 kDa, LvLAa için 26.5 kDa, β'cAa için 17 kDa, ve CtAa için 13.6 kDa olarak hesaplanmıştır. SbsVtgAb YP alt birimleri için bu değerler: LvHAb; 116.4 kDa, PvAb; 10.7 kDa, LvLAB; 26.7 kDa, β'cAb; 17.1 kDa, ve CtAa, 13.8 kDa olarak hesaplanmıştır. SbsVtgC YP alt birimlerine ait moleküler ağırlıklar, LvHC ve LvLC için sırasıyla 119.1 kDa ve 22.3 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Levrek vitellojen formları için yumurta sarısı protein alt birimleri yapısının şematik gösterimi. Her bir Vtg formuna ait isimler (VtgAa, VtgAb veya VtgC), onları takip eden amino asit (aa) bazında birincil polipeptid uzunlukları ve bunların hemen altında parantez içerisinde verilmiş bu polipeptidlerin moleküler ağırlıkları (kDa) koyu karakterlerle gösterilmiştir. Yatay açık gri bloklar her bir Vtg formunda bulunan YP alt birimini (LvH, Pv, LvL, β'c ve Ct), bu bloklardan aşağı doğru uzanan oklar YP alt birimi isim kısaltmalarını, ilk 10 N-ucu amino asit dizisini, sinyal peptid dahil Vtg kodlama dizisi üzerinde buldukları pozisyonu, YP alt birimi uzunluğunu (aa) ve amino asit dizisinden yola çıkılarak hesaplanan tahmini moleküler ağırlığını (kDa) ifade etmektedir.

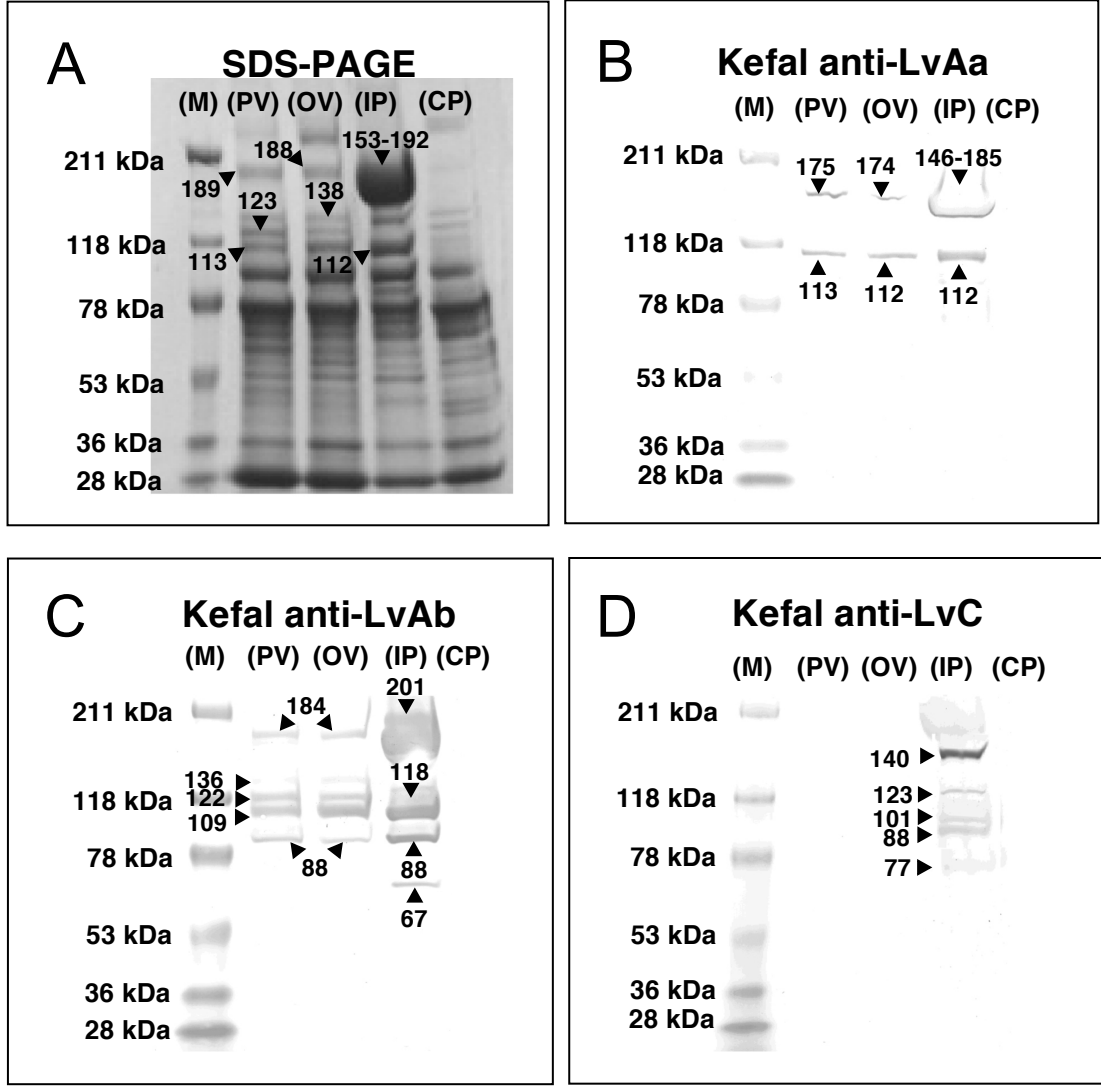
4.10.2. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin kan plazmasında saptanması

Çalışmanın başında, 17β -E₂ tetikleemesinin kontrolü amacıyla SDS-PAGE üzerinde ayrıştırılmış, E₂ ile uyarılmış erkek levreklerle ait plazmalarda ~180 kDa'luk bir protein bandı saptanmış ve kütle spektrometrisi analizlerinde, bu bantta levrek Vtg'lerine ait peptidler tespit edilmişti (Şekil 4.1). Çalışmanın bu kısmında, SDS-PAGE üzerinde PV ve OV aşamalarındaki dişi ve E₂ ile uyarılmış erkek levrek plazma örneklerinde (IP) bulunan, ancak kontrol grubu örneklerinde bulunmayan, ~188-189 kDa, ~138 kDa, ~123 kDa, ve ~112-113 kDa ağırlığa sahip dört protein bandı tespit edilmiştir (Şekil 4.10A). Aynı örneklerde, kefal anti-LvAb antikoru kullanılarak gerçekleştirilen Western blot üzerinde saptanan bantlara ait moleküler ağırlıkların (sırasıyla ~184 kDa, ~136 kDa, ~118-122 kDa ve ~109 kDa), bunlara benzer oldukları görülmektedir (Şekil 4.10C). Western blot üzerinde kefal anti-LvAb'ye immünoreaktivite gösteren ~184 kDa'luk bandın saptanan büyüklüğünün, SbsVtgAb amino asit dizilerinden hesaplanan moleküler ağırlık (~186 kDa, Şekil 4.9) ile yüksek benzerliği, CBB veya immün boyama (immunostaining) yoğunluğuna dayanarak, SbsVtgAb olarak tanımlanmıştır. Blot üzerinde tespit edilen diğer immünoreaktif bantlar, muhtemelen SbsVtgAb ve SbsLvHAb ürünlerinin yığılım veya proteoliz ürünlerini ya da özgül olmayan bağlanmaları temsil etmektedir.

Kefal anti-LvAa antiserumu kullanılarak gerçekleştirilen Western blot üzerinde, PV ve OV dişilerine ait plazma örneklerinde beliren iki bandın büyüklükleri ~174-175 kDa ve ~112-113 kDa (Şekil 4.10B) olarak tespit edilmiştir. Estradiol ile uyarılmış erkek levreklerde, vitellogenozin yüksek oranda tetiklenmiş olduğu ve blot üzerinde beliren ancak büyüklüğü tam olarak saptanamayan (üst ve alt sınır ölçümlerinden tahminen ~146-185 kDa arasında olduğu belirlenen) büyük bir immünoreaktif bant ile doğrulanmıştır. SbsVtgAa cDNA'sından türetilmiş amino asit dizileri için hesaplanan tahmini moleküler ağırlık (~181 kDa), SbsVtgAb için hesaplanan tahmini değerden (~186 kDa) yalnızca 5 kDa küçük ve SDS-PAGE üzerinde IP, PV ve OV plazmalarında beliren protein bantları büyüklüğü ile benzerdir. Kefal anti-LvAa antikoru kullanılarak gerçekleştirilen Western blot üzerinde, PV ve OV plazmalarında tespit edilen, bu

değerlere en yakın büyüklükteki immünoreaktif bantların, ~174-175 kDa oldukları görülmektedir (Şekil 4.10B). SDS-PAGE ve Western blot üzerinde, SbsVtgAa cDNA'sından türetilmiş amino asit dizileri için hesaplanan tahmini moleküler ağırlığına daha yakın büyüklükte bantların belirmemesi açıklanamasa da heterolog kefal anti-Lv antikorunun büyük ihtimalle hafif proteolize uğramış SbsVtgAa molekülü ile etkileşmiş olduğu sanılmaktadır. Postvitellojenik (PV) ve OV dışı plazmaları Western blotu üzerinde beliren ~174-175 kDa'luk bantların, pozisyon olarak SDS-PAGE üzerinde ~188-189 kDa'da beliren protein bantlarının alt sınırlarına karşılık geldiği görülmektedir. Bu bandın ayrıca, ve CP örneğinde reaksiyon vermeyen ancak IP örneğinde tespit edilen ~153-192 kDa'luk bant aralığına karşılık geldiği görülmektedir. Bütün bunlara dayanarak, kefal anti-LvAa antiserumu kullanılarak gerçekleştirilen Western blot üzerinde PV ve OV dışı plazma örneklerinde beliren ~174-175 kDa'luk bantlar SbsVtgAa olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, bu blot üzerindeki ~112-113 kDa'luk diğer bantların, SbsVtgAa proteoliz ürünleri olduğu sanılmaktadır (Şekil 4.10B).

SDS-PAGE üzerinde PV veya OV dışı veya E₂ ile uyarılmış erkek levrek plazma örneklerinde (IP) belirlenen iki protein bandı (~138 kDa ve 123 kDa), aynı zamanda kefal anti-LvC antikorunu kullanılarak gerçekleştirilen Western blot üzerinde IP örneklerinde saptanan ~140 kDa ve ~123 kDa'luk iki bantla, sırasıyla benzer ve aynı büyüklüktedir (Şekil 4.10D). Bu nedenle denatüre olmuş SbsVtgC polipeptid monomerinin moleküler ağırlığının ~138-140 kDa aralığında ve SbsVtgC cDNA'sından türetilmiş amino asit dizileri için hesaplanan tahmini büyüklük ile (~143 kDa; Şekil 4.9) uyum içinde olduğu söylenebilir. Dolayısıyla, Western blot üzerindeki ~140 kDa'luk koyu bant, SbsVtgC olarak tanımlanmıştır. Blot üzerindeki diğer bantların SbsVtgC'nin özgül olmayan proteoliz ürünleri olduğu tahmin edilmektedir. Postvitellojenik (PV) ve OV aşamalarındaki dişilere ait plazma örneklerinde, kefal anti-LvC antikorunu kullanılarak gerçekleştirilen Western blot üzerinde herhangi bir immünoreaktiviteye rastlanmamış olup bu durum dişilerde kanında bu aşamalarda, VtgC seviyelerinin çok düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular ayrıca, çalışmanın ilerleyen bölümlerinde PV aşamalarındaki dişilerde plazmalarından kütle spektrometrisi yoluyla elde edilen bulgularla birbirini desteklemektedir.



Şekil 4.10. Levrek vitellojenlerinin dişi ve estradiol ile uyarılmış erkek kan plazmasında SDS-PAGE ve Western blot yöntemleri ile saptanması. Düşey parantezler, tam moleküler ağırlığı saptanamayan yoğun, ancak difüze halde boyanmış bantların büyüklük aralığını ifade etmektedir. Bireysel bantları işaret eden okların yanındaki sayılar, işaret edilen bandın moleküler ağırlığını (kDa) ifade etmektedir. M: Standart, PV: Postvitellojenik dişi plazması, OV: Ovulasyondaki dişi plazması, CP: Negatif kontrol grubu erkek plazması, IP: 17 β -estradiol ile uyarılmış pozitif kontrol erkek plazması.

4.10.3. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin ovaryumda saptanması

Postvitellojenik (PV) ve OV ovaryum ekstraktları SDS-PAGE ile ayrıştırıldığında, bu örneklerin birinde veya her ikisinde tespit edilen protein bantlarından beş tanesinin (~90 kDa, ~77 kDa, ~48 kDa, ~28 kDa ve ~23 kDa; Şekil 4.11A), kefal anti-LvAa antiserumu kullanılarak gerçekleştirilen Western blot üzerinde belirlenen bantlarla (sırasıyla ~93 kDa, ~77 kDa, ~48 kDa, ~27 kDa ve ~23 kDa; Şekil 4.11B) benzer veya aynı büyüklükte olduğu gözlenmiştir. Belirlenen bant büyüklüğünün, hesaplanan SbsLvHAa polipeptid moleküler ağırlığı (~115 kDa, Şekil 4.9) ile karşılaştırması, CBB veya immün boyama yoğunluğuna dayanarak, Western blot üzerinde kefal anti-LvAa antiserumuna immünoreaktivite gösteren ~93 kDa'luk bandın, SbsLvHAa YP alt biriminin sınırlı özgül olmayan proteolizi veya olgunlaşma sırasındaki ayrışma ürünü olabileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 11B). Bu bandın, LvHAa'nin özgül olmayan proteolizi ürünü veya söz konusu örnekleme zamanında (PV aşamada) hali hazırda kısmen başlamış olan olgunlaşma proteolizi ürünü olduğu sanılmaktadır. SDS-PAGE jel üzerinde PV aşamasındaki dişi gonadında, ~93 kDa'luk bandın değil de hemen üzerindeki ~106 kDa'luk bandın saptanmış olması, bu bandın herhangi bir proteolize maruz kalmamış SbsLvHAa alt birimini temsil ettiğini ortaya koymaktadır. Yaklaşık 93 kDa'luk protein bandı, PV ovaryum ekstraktı Western blotu üzerinde immünoreaktivite gösteren tek bant olsa da OV ovaryum örneği blotunda daha küçük ağırlıklarda birkaç bant daha saptanmıştır. Western blot üzerinde, OV ovaryum ekstraktında bulunup da PV ovaryumunda bulunmayan SbsLvHAa'den küçük ancak SbsLvLAa'den büyük moleküler ağırlığa sahip birkaç bant (~77 kDa, ~48 kDa, ~46 kDa) daha, oosit olgunlaşması (PV) ile ovulasyon (OV) aşamaları arasında SbsLvHAa'da gerçekleştiği düşünülen proteolize işaret etmektedir. Ancak, söz konusu proteolitik parçalanmanın örnekleme zamanında henüz tamamlanmadığı görülmektedir. Postvitellojenik (PV) dişi örneklerinde bulunmamasının nedeni anlaşılmasa da tespit edilen bant büyüklüğü ve levrek LvLAa'nın cDNA'dan türetilmiş olan polipeptid dizilerinden hesaplanan tahmini moleküler ağırlığı (~27 kDa, Şekil 4.9)'nın karşılaştırması ile immün boyama yoğunluğuna dayanarak, Western blot üzerinde kefal anti-LvAa antiserumuna reaksiyon veren ~27 kDa'luk bandın, levrek LvLAa'yı temsil

ettiği sonucuna varılmıştır. Ancak, bu bantla beraber bunun hemen altında bulunan ~27 kDa'luk bandın, SbsLvHAa proteolitik ürünü olma olasılığı da yüksektir. Western blot üzerinde belirlenen SbsLvHAa'nın sınırlı proteolizi ve SbsLvLaa'nın büyük oranda değişmemiş yapısı, pelajik yumurtalar bırakan diğer deniz balıklarında (Matsubara vd 1999, 2003, Reith vd 2001, Finn vd. 2002ab, Sawaguchi vd 2006, Finn 2007ab, Amano vd 2008, Kolarevic vd 2008) bu aşamada neredeyse tamamlanmış olması beklenen LvHAa tam proteolitik ayrışmasının, levrekte gerçekleşmediği ihtimalini ortaya koymaktadır.

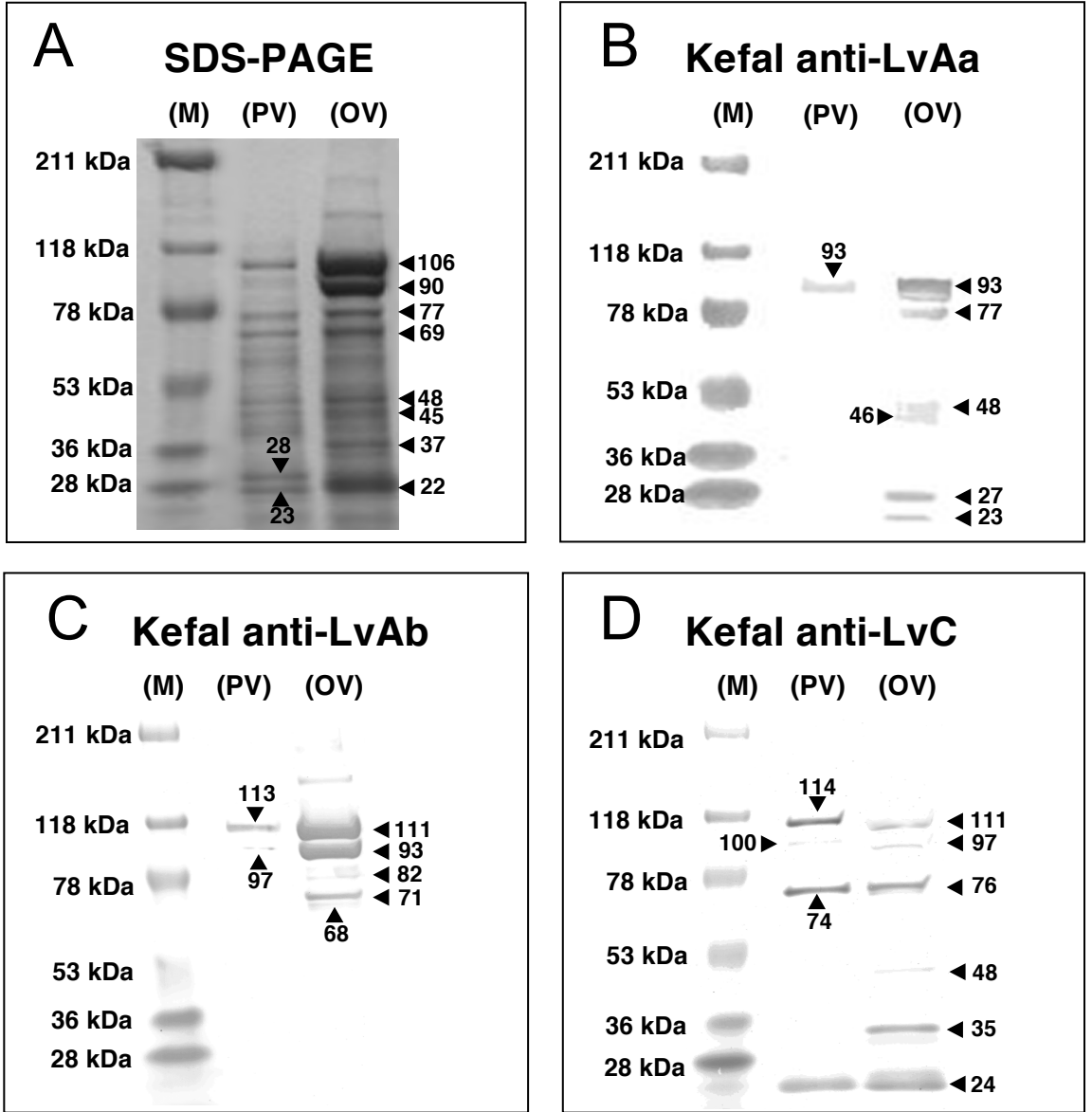
SDS-PAGE üzerinde, PV ovaryum ekstraktında zayıf, ancak OV dışı gonad örneğinde koyu halde beliren iki protein bandının (~106 kDa ve ~90 kDa), aynı örneklerle ait Western blot üzerinde kefal anti-LvAb antiserumuna immünoreaktivite gösteren, sırasıyla ~113-111 kDa ve ~97-93 kDa'luk bantlara karşılık geldiği görülmektedir (Şekil 4.11C). Büyük olan (~113-111 kDa) bant ayrıca, cDNA türevi amino asit dizilerinden hesaplanan SbsLvHAb moleküler ağırlığı ile de uyum göstermektedir (~116 kDa, Şekil 4.9). Bu nedenle PV ovaryum Western blotu üzerindeki ~113 kDa'luk bant SbsLvHAb olarak, ~111 kDa'luk bant ise SbsLvHAb'nin hafif proteolize uğramış formu olarak tanımlanmıştır. Bu bandın hemen altındaki ~97 kDa'luk bant ise SbsLvHAb'nin proteoliz ürünü olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.11C). Bu durum, SbsLvHAb'nin oosit olgunlaşması sırasındaki proteolizinin PV aşamasındaki dişilerde örnekleme sırasında hali hazırda başlamış olduğu ihtimalini ortaya koymaktadır. Bunlara yakın büyüklüklerde (~111 kDa ve ~93 kDa) tespit edilen ve OV ovaryum ekstraktında bulunduğu halde PV aşamasında saptanamayan daha küçük moleküler ağırlığa sahip diğer bantlar (örn. ~82 kDa, ~71 kDa ve ~68 kDa), SbsLvHAb'nin oosit olgunlaşması sırasında hafif derecede proteolize maruz kaldığının göstergesidir. Bu durum, genel olarak pelajik yumurtalar bırakan diğer deniz teleostlarında bildirilen ve LvHAb'nin oosit olgunlaşması sırasında sadece kısmi proteolize uğradığını iddia eden durum ile tutarlılık göstermektedir (Reith vd 2001, Finn vd 2002ab, Sawaguchi vd 2006, Amano vd 2008c). Örnek olarak, *V. moseri*'de LvAb bütün polipeptidinin yaklaşık üçte birinin proteolize olduğu bildirilmiştir (Matsubara vd 1999). *Moronidae* türleri arasında benzer bir fenomen, ayrıca çizgili levrek LvHAb için

(Reading vd 2009) ve hangi Vtg formundan türediği belirtilmeyen *M. chrysops* LvH için (Hiramatsu vd 2002d) bildirilmiştir.

Ovaryum ekstraktının, Western blot üzerinde kefal anti-LvC antiserumuna gösterdiği immünoaktivite sonucu PV ve OV için tespit edilen, sırasıyla ~114-111 kDa, ~74-76 kDa ile ~24-24 kDa büyüklüğündeki bant çiftlerinin yanısıra, sadece OV ovaryum ekstraktı blotunda bulunan ~35 kDa büyüklüğünde koyu bir bant (Şekil 4.11D) tespit edilmiştir. Bu bant çiftleri veya teklerinin büyüklükleri, SDS-PAGE üzerinde tespit edilen bazı protein bantlarının büyüklüğüyle (sırasıyla, ~106 kDa, ~77 kDa ve ~22-23 kDa, Şekil 4.11A) uyum göstermektedir. Yaklaşık 114 kDa'luk bant, tespit edilen büyüklüğü ve SbsLvHC polipeptidi için hesaplanan tahmini moleküler ağırlığı (~119 kDa, Şekil 4.9) ile yakın benzerliği ve immün boyama yoğunluğuna dayanarak, SbsLvHC olarak tanımlanmıştır. Bu bant, OV dışı gonad ekstraktında tespit edilemezken, ~111 kDa'luk bir başka bandın sadece bu örnekte göze çarpması, SbsLvHC'nin oosit olgunlaşması sırasındaki ikinci proteolize uğradığının bir göstergesi olabilir. Bununla beraber, PV aşamalarındaki dişilere ait ovaryum ekstraktında tespit edilen daha küçük moleküler ağırlığa sahip diğer bir bant (~74 kDa), SbsLvHAa ve SbsLvHAb'de olduğu gibi SbsLvHC'de de oosit olgunlaşması sırasındaki YP proteolizinin PV aşamasında başladığını göstermektedir (Şekil 11D). Ovulasyon (OV) aşamasındaki dişiler ovaryum ekstraktında ~111 kDa'da saptanan ve SbsLvHC'nin proteoliz ürünü olduğu düşünülen zayıf bir bandın yanı sıra, ~97 kDa, ~76 kDa ve ~48 kDa'da beliren ancak PV aşamasında bulunmayan diğer bantlar, SbsLvHC'nin, oosit olgunlaşması sırasında daha sınırlı proteolize uğradığını ortaya koymaktadır. Ovulasyon aşamasındaki (OV) dişiler ovaryum ekstraktına ait Western blot üzerinde tespit edilen ~24 kDa'luk bant, SbsLvLC cDNA'sından türetilmiş amino asit dizileri için hesaplanan tahmini değer (~22 kDa, Şekil 4.9) ile yakın benzerliğinden dolayı SbsLvLC olarak tanımlanmıştır. SbsLvHC'nin yoğun proteolizine karşın SbsLvLC'nin ayrılmadan bütün halde kalması yukarıda sözü edilen bazı diğer acantomorph türlerde rastlanana göre oldukça farklı bir durumdur. Kefalde ve *G. affinis*'te, VtgC (LvHC dahil)'nin oosit olgunlaşması sırasındaki proteolizden büyük oranda etkilenmemiş halde çıktığı bildirilmiştir (Amano vd 2007b, Sawaguchi vd 2005b). Ancak *V. moseri* (Matsubara vd 2003), *P. major* (Sawaguchi vd 2006) ve Atlantik pisi balığı (Finn vd2002a)'nda

VtgC'nin oosit olgunlaşması sırasında proteolitik olarak çok az proteolize uğradığı veya bu çalışmada levrekte tespit edildiği düzeylerde olmasa da kısmi proteolize uğradığı bilinmektedir. *Moronidae* türleri arasında VtgC (muhtemelen LvHC)'nin, oosit olgunlaşması sırasında çizgili levrekte (Reading vd 2009) kısmi proteolize uğradığı ancak beyaz levrekte herhangi bir değişime uğramadan kaldığı (Reading ve Sullivan 2011) bilinmektedir.

SDS-PAGE ve Vtg'ye özgün kefal anti-Lv antikorları kullanılarak ovaryum ekstraktı için gerçekleştirilen Western blot bulguları bütün halde değerlendirildiğinde, levreğe ait Vtg formlarından türemiş YP'lerin hepsinin oosit olgunlaşması sırasında kısmi proteolize uğradığı görülmektedir. Levrekte oosit olgunlaşması sırasındaki proteolizin özellikle LvHAa, LvHAb ve LvHC'nin sınırlı parçalanmasını hedef aldığı, bunun yanında LvLAa ve LvLC alt birimlerinin büyük oranda değişmeden kaldığı söylenebilir. Western blot üzerinde, LvLAb için hesaplanan tahmini moleküler ağırlığa (~27 kDa, Şekil 4.9) yakın herhangi bir bant tespit edilemediğinden, oosit olgunlaşması sırasında LvLAb alt birimine ne olduğu hakkında herhangi bir değerlendirme yapılamamaktadır. Oosit olgunlaşması sırasında gerçekleşen proteolizin, oosit hidrasyonu, yumurtanın uygun yüzeylilik karakteri kazanması (Matsubara vd 2003, Finn ve Kristofferson, 2007, Cerdá vd 2007, Babin vd 2007) ve embriyo için besin kaynağı olan FAA havuzu oluşumu (Matsubara vd 2003, Finn ve Fyhn 2010, Reading ve Sullivan 2011)'ndeki önemi göz önünde bulundurulduğunda, levreğe özgün olan bu proteoliz şekli üzerine daha detaylı çalışmalar yapılması faydalı olacaktır. Western blot yöntemiyle elde edilen bulguların doğruluğunun pekiştirilmesi açısından, kan plazmasında bulunan, vitellojenden farklı bir standart proteine karşı bir antiserum kullanılarak yükleme kontrolü gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bunun yanında, ovaryum ekstraktı Western blot analizlerinin doğruluğunun pekiştirilmesi amacıyla vitellogenez öncesi aşamada bulunan gonad örneği kullanılarak bir negatif kontrol reaksiyonu gerçekleştirilmelidir. Son olarak, aşağıdaki bölümde anlatılan ve Western blot sonuçlarını doğrulamak amacıyla PV ovaryum örnekleri için gerçekleştirilmiş olan, Vtg'den türemiş YP alt birimlerine ait peptid spektralarının incelendiği kütle spektrometrisi uygulamalarının OV ovaryum örneklerinde de gerçekleştirilmesi gerekmektedir.



Şekil 4.11. Levrek vitellojen ve yumurta sarısı protein ürünlerinin ovaryumda SDS-PAGE ve Western blot yöntemleri ile saptanması. Düşey parantezler, tam moleküler ağırlığı saptanamayan yoğun, ancak difüze halde boyanmış bantların büyüklük aralığını ifade etmektedir. Bireysel bantları işaret eden okların yanındaki sayılar, işaret edilen bandın moleküler ağırlığını (kDa) ifade etmektedir. M: Standart, PV: Postvitellojenik dişi ovaryum ekstraktı, OV: Ovulasyondaki dişi ovaryum ekstraktı.

4.11. Levrek Vitellojen ve Yumurta Sarısı Protein Ürünlerinin Postvitellojenik Dişi Karaciğer, Plazma ve Ovaryumundaki Miktarlarının Kütle Spektrometre Analizi ile Saptanması

Bu çalışmada, levrek Vtg'lerinin sentezi, taşınması ve oosit içerisine alınması seviyelerine dair bir fikir edinebilmek amacıyla, bu proteinler ve enzimatik ayrışma ürünleri YP'lerin karaciğer, plazma ve ovaryumdaki miktarları ve birbirine oranları kütle spektrometre (nanoLC-MS/MS) analizi ile belirlenmiştir. Bunlara ek olarak bu yöntem, levrek Vtg ve bunların YP ürünlerinin yumurta sarısındaki (ovaryum ekstraktı) varlığının, SDS-PAGE ve kullanılan antikor özgünlüğü nedeniyle yalnızca levrek LvH ve LvL alt birimlerinin belirlenmesi ile sınırlı kalan Western blot gibi yöntemlerden bağımsız olarak ortaya konmasına yardımcı olmuştur. Vitellojenlerden türemiş YP'lerin, büyümeyi tamamlamış oosit içerisindeki yumurta sarısı protein depolarına oransal katkıları hakkında bilgi edinmek amacıyla kütle spektrometre analizinde kullanılmak üzere, PV aşamasındaki ovaryum örnekleri seçilmiştir. Levrekte yapılmış önceki çalışmalara göre, PV aşamasındaki dişilerde halen yüksek olması beklenen kandaki E₂ seviyeleri ve dolayısıyla hepatik vitellojen sentezi ile kandaki Vtg seviyeleri (Mañanós vd 1997, Navas vd 1998) bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla da doğrulanmıştır (Şekil 4.8A). Kütle spektrometre analiz yöntemleri, daha önce kompleks protein karışımları içerisinde Vtg'den türemiş YP'lerin tanımlanmasında (Reith vd 2001, Kolaravic vd 2008, Kristofferson vd 2009) kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan ve işaretlenmemiş (label free) kantifikasyonla elde edilmiş verilerin değerlendirilmesinde ProteoIQ gibi basit ama son derece etkili bir metot kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. Postvitellojenik dişi levrek karaciğer, plazma ve ovaryumunda kütle spektrometre analizi ile tespit edilen triptik peptidler. Peptidlerin karşılık geldiği her vitellojene ait yumurta sarısı protein alt birimleri ‘YP Alt Birimi’, amino asit dizileri ‘Peptid Dizisi’, toplam spektra sayıları ‘Total Spektra Sayısı’, tespit edildikleri doku ‘Doku’ ve vitellojen dizileri üzerindeki başlangıç ve bitiş pozisyonları (Start-Stop) kolonlarında verilmiştir. L: Karaciğer, P: Plazma, O: Ovaryum.

| YP Alt Birimi | Peptid Dizisi | Total Spektra Sayısı | Doku | Start-Stop |
|---------------|------------------------|----------------------|-------|------------|
| LvHAa | YEALLLGGGLPEEGLAK | 28 | L/P/O | 34-49 |
| | VLISAAAQNIYMLK | 32 | L/P/O | 58-71 |
| | LVEPELFEYSGIWPK | 1 | 0 | 72-86 |
| | LTSALAAQLMIPIK | 4 | P/O | 96-108 |
| | MSAPEGISTMVLNVYR | 36 | P/O | 119-134 |
| | GILNVLQLNIK | 8 | P/O | 135-145 |
| | TQNVYELQEAGAQGVCK | 7 | 0 | 147-163 |
| | QSLVFLEIQR | 24 | P/O | 260-269 |
| | APIVPIQAQYLHR | 9 | 0 | 270-282 |
| | LVEALAINSK | 10 | 0 | 415-424 |
| | EIVLLGYGTMISK | 41 | L/P/O | 433-445 |
| | ILPIHGTAASLPIK | 11 | P/O | 499-513 |
| | MIQELALQLYMDK | 6 | P/O | 532-544 |
| | TEENLQVASFTYSHMK | 4 | 0 | 577-592 |
| | STAAIHASVASACNVAIK | 21 | 0 | 597-614 |
| | TSAYLAGAAADVLEVGVR | 2 | 0 | 666-683 |
| | TEGLQEALLK | 7 | 0 | 684-693 |
| | TEGLQEALLKNPALIDNADR | 21 | L/P/O | 684-703 |
| | SLPSSTPLASVYVK | 2 | 0 | 719-732 |
| | FFGQEIAFANIDK | 35 | L/P/O | 733-745 |
| | ALIDQAIALATGPSVQTVGR | 15 | P/O | 746-765 |
| | IATENAVFISDIALYK | 6 | P/O | 999-1014 |
| | QINLSEEEIIEGRPILMK | 3 | P | 1053-1070 |
| LvLAa | FLGNEVAPTFAIIVR | 10 | P/O | 1186-1200 |
| | QYDTMITAETGLVGPSAAR | 39 | L/P/O | 1263-1282 |
| | MAWTELPSALK | 18 | P/O | 1285-1295 |
| | VYDYIPASMLAGLIQGK | 3 | P | 1301-1317 |
| | DQNSANQLSLTVVATSDR | 33 | L/P/O | 1318-1335 |
| | GLTPFDGLADK | 2 | 0 | 1366-1376 |
| β'cAa | YKNEMPLSCYQVLAQDCTDEIK | 1 | 0 | 1404-1425 |
| | IADIDIDLYPK | 28 | L/P/O | 1444-1454 |
| | VNGMEIPINNLPYQHPTAK | 32 | L/P/O | 1462-1480 |
| CtAa | CYSVEPVLR | 3 | P | 1589-1597 |

Devamı Arkada

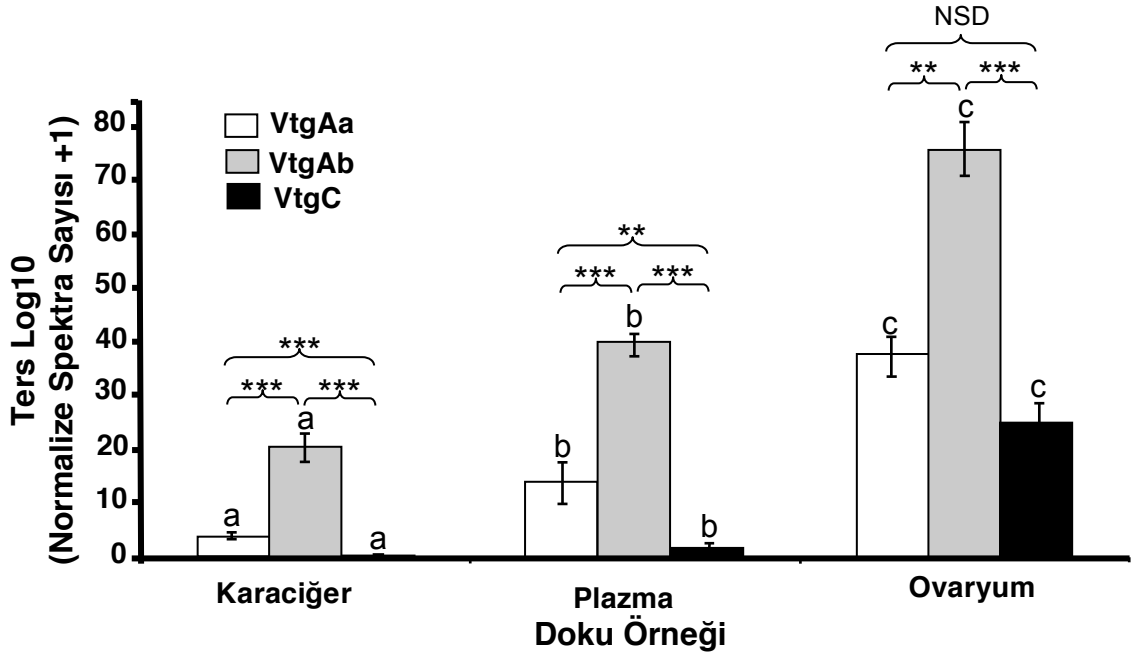
Çizelge 4.6.'nın Devamı

| YP Alt Birimi | Peptid Dizisi | Total Spektra Sayısı | Doku | Start-Stop |
|---------------------|--------------------|----------------------------|-------|------------|
| LvHAb | YEALLMGGLP EEG LAR | 62 | L/P/O | 34-49 |
| | VLINAASPDTFMLK | 74 | L/P/O | 58-71 |
| | LVDPEIFEYSGIWP K | 11 | P/O | 72-86 |
| | VFAPAGVSATVLNIYR | 33 | L/P/O | 119-134 |
| | GILNIFQLNIK | 1 | P | 135-145 |
| | GILNIFQLNIKK | 1 | P | 135-146 |
| | TQNVYELQEPGAQGVCK | 18 | O | 147-163 |
| | DIGLAYTEK | 8 | O | 195-203 |
| | QILTFLEIEK | 9 | P/O | 260-269 |
| | QILTFLEIEKTPVMPIR | 1 | P | 260-276 |
| | FIELIQLLR | 33 | L/P/O | 333-341 |
| | YESIEALWTQFK | 4 | P/O | 345-356 |
| | HWILNAVPAIGTHAALR | 20 | P/O | 363-379 |
| | EIVMLGYGTLVAK | 59 | L/P/O | 433-445 |
| | GEIEELIVALK | 23 | L/P/O | 472-482 |
| | VLGNAGHPASLKPIMK | 3 | O | 483-498 |
| | LLPGFGSAAAGLPLR | 55 | L/P/O | 499-513 |
| | VHIDAVLALR | 36 | L/P/O | 514-523 |
| | MIQEMAVQLFMDK | 48 | P/O | 532-544 |
| | EKNLQVASFVYSYMK | 2 | O | 578-592 |
| | NLQVASFVYSYMK | 29 | P/O | 580-592 |
| | NTAPDFASVAAACNVAVK | 53 | L/P/O | 597-614 |
| | TYLAGAYADVLELGVR | 4 | P/O | 668-683 |
| | TEGVQEALLK | 11 | P/O | 684-693 |
| | ANPLSQPLASVYVK | 35 | L/P/O | 719-732 |
| | FFGQEIAFANIDK | 35 | L/P/O | 733-745 |
| | LQFLPVQGVDK | 20 | L/P/O | 892-904 |
| | IATALVDTFAVAR | 52 | L/P/O | 905-917 |
| | ITPMIPTEVAAK | 4 | L/O | 927-938 |
| | MCAA IETFGIK | 10 | O | 988-998 |
| | DSPLYAIIGR | 33 | L/P/O | 1013-1022 |
| | HAVMVEVAPAAGPVIEK | 4 | O | 1023-1039 |
| | IELEIQVGEK | 30 | L/P/O | 1040-1049 |
| | VINMSEEEEEILEDK | 6 | L/O | 1057-1070 |
| PvAb | MIDVVAPISK | 1 | O | 1126-1135 |

Devamı Arkada

Çizelge 4.6.'nın Devamı

| YP Alt Birimi | Peptid Dizisi | Total Spektra Sayısı | Doku | Start-Stop |
|---------------|-------------------------|----------------------|---------|------------|
| LvLab | YLANAITPAVTILIR | 17 | L/P/O | 1218-1232 |
| | VQGYQIAAYFDR | 44 | L/P/O | 1240-1251 |
| | LQVVFANLAENDHWR | 29 | P/O | 1256-1270 |
| | ICADGVMLSYHK | 5 | 0 | 1271-1282 |
| | VAWGIECK | 3 | 0 | 1287-1294 |
| | QYETEITAETGLVGQDPAVR | 59 | L/P/O | 1295-1314 |
| | MTWDKIPTNMK | 2 | 0 | 1317-1327 |
| | ELSEYLSR | 10 | P/O | 1332-1339 |
| | IALEAGIGLAK | 40 | L/P/O | 1340-1350 |
| β'cAb | DKLITFNNR | 2 | 0 | 1429-1437 |
| | LITFNNR | 2 | 0 | 1431-1437 |
| | FKNEMPHSCYQVLAQDCSQELK | 8 | P/O | 1439-1460 |
| | NEMPHSCYQVLAQDCSQELK | 10 | 0 | 1441-1460 |
| | DQTLEQNLINVK | 21 | L/P/O | 1468-1479 |
| | IENIDVDLYPK | 30 | L/P/O | 1480-1490 |
| | IENIDVDLYPKDSAIMVK | 27 | P/O | 1480-1497 |
| | VNGVEIPISNLPYQHPAGQIQIR | 36 | P/O | 1498-1520 |
| CtAb | NAVSYAHSWVLP GK | 25 | P/O | 1582-1595 |
| | CYSVEPVL R | 3 | P | 1625-1633 |
| | SIDLSETSEAHVAC R | 16 | P | 1672-1686 |
| LvHC | YEGGVNFGLGAPNLAESGVR | 14 | 0 | 34-53 |
| | DMTITQVVDVSGCR | 8 | 0 | 176-189 |
| | YVYNVKPTEEGGLITQAHGLER | 5 | 0 | 220-241 |
| | EMVLLGVSDTAR | 6 | 0 | 261-272 |
| | VMPYEELEAMWR | 2 | 0 | 342-353 |
| | MFLNMPFSK | 10 | L/O | 418-426 |
| | NGNEADMVIALK | 12 | 0 | 471-482 |
| | FLPGVAATPVDLPPR | 32 | P/O | 499-513 |
| | DPHSVQDITMSLFLQK | 1 | 0 | 529-544 |
| | SSTPENHFLSIACNVAVK | 10 | P/O | 597-614 |
| | SATNIFPTEIMMK | 8 | 0 | 653-665 |
| | ILQLMELGIR | 23 | P/O | 674-683 |
| | ASGQEWFFADINK | 1 | 0 | 733-745 |
| | DFIQNIIR | 4 | P/O | 746-753 |
| | YFQATTGLGLEISK | 10 | 0 | 791-805 |
| | MPLAIPWK | 1 | 0 | 872-879 |
| | KFELDFLPCK | 6 | 0 | 890-899 |
| FELDFLPCK | 1 | 0 | 891-899 | |
| LvLC | MCVDTIVHAHA EAK | 2 | 0 | 1132-1145 |
| | QEV SASVVAASADSIDMK | 4 | 0 | 1218-1235 |
| | IKFPEYTVFR | 8 | 0 | 1236-1245 |



Şekil 4.12. Postvitellogenik dişi levrek karaciğer, plazma ve ovaryumunda kütle spektrometre analizi ile tespit edilmiş olan VtgAa, VtgAb ve VtgC'ye ait triptik peptidlerin ters Log transformasyonu gerçekleştirilmiş spektra sayıları. Düşey kolonlar N=4 balığa ait ortalama değerleri, düşey ayraçlar ise ortalamanın standart hata (SEM) değerlerini göstermektedir. Kolonların üzerinde yer alan yatay ayraçlar, ortalama değerler arasında istatistiksel farklılıkları $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ veya $P \leq 0.001$ önem düzeyine göre, sırasıyla (*), (**) veya (***) ile ifade etmektedir. İstatistiksel anlamda önemli farklılık bulunmayan yerler, NSD (istatistiksel olarak önemsiz fark; Not Significantly Different) kısaltması ile belirtilmiştir. Her bir Vtg formundan türemiş triptik peptidlerin, farklı dokulardaki ortalama değerlerinin karşılaştırmasında kolonlar üzerinde yerleştirilen küçük harf karakterler kullanılmıştır. Buna göre farklı harfler, istatistiksel anlamda önemli farklılıkları ifade etmektedir.

Postvitellojenik dişi karaciğer, plazma ve ovaryum örneklerinin, nanoLC-MS/MS analizi sonucunda SbsVtgAa'ya ait 33 özgün triptik peptid tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Bu peptidlerin tamamı göz önünde bulundurulduğunda, SbsVtgAa birincil peptid dizisinin (sinyal peptid hariç) % 30'unu oluşturdukları görülmektedir. SbsVtgAa'ya karşılık geldiği belirlenen bu peptidlerin, 23'ünün LvHAa, 6'sının LvLAa 3'ünün β'cAa ve 1'inin ise varsayılan CtAa alt birimlerinin türevi oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Bu peptidlerin çoğuna, PV aşamadaki dişilere ait plazma ve ovaryum örneklerinde rastlanırken, bunların yalnızca küçük bir kısmına karaciğerde rastlanmıştır. SbsVtgAa'ya ait peptidlerin karaciğer, plazma ve ovaryumdaki ortalama spektra sayıları (Normalized Spectral Counts; N-SC)'nin logaritmik transforme değerleri ($\text{Log}_{10}[y + 1]$, $y = \text{N-SC}$) arasında istatistiki olarak önemli düzeyde farklar olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12). Buna göre, peptid N-SC değerlerinin ovaryumda plazmadan ($P \leq 0.05$), plazmada ise karaciğerden daha yüksek olduğu ($P \leq 0.01$) belirlenmiştir (ovaryum >>plazma>karaciğer, Şekil 4.12).

Postvitellojenik dişi karaciğer, plazma ve ovaryum örneklerinde, SbsVtgAb'ye ait 55 özgün triptik peptid tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Toplamda bu peptidlerin, SbsVtgAb tam peptid dizisinin % 43.6'sını oluşturdukları görülmektedir. SbsVtgAb'den türemiş bu peptidlerin, 34'ünün LvHAb, 1'inin PvAb, 8'inin β'cAb ve 3'ünün ise varsayılan CtAa alt birimlerine ait oldukları ortaya konmuştur (Çizelge 4.6). LvHAb'den türemiş peptidlerin yaklaşık % 42'sinin her üç doku türünde de yüksek oranda bulunduğu, geri kalanların ise yalnızca plazma ve ovaryum örneklerinde tespit edildiği görülmektedir. SbsVtgAa'dan türemiş peptidlerde olduğu gibi, SbsVtgAb'den türemiş peptidlerin karaciğer, plazma ve ovaryumdaki ortalama N-SC logaritmik transforme değerleri ($\text{Log}_{10}[y + 1]$, $y = \text{N-SC}$) arasında istatistiki olarak önemli ($P \leq 0.001$) düzeyde farklar olduğu belirlenmiştir. Buna göre, ortalama normalize peptid spektra sayılarının (N-SC) ovaryumda plazmadan daha yüksek olduğu, plazmada ise karaciğerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (ovaryum >>plazma>karaciğer, Şekil 4.12).

SbsVtgC'den türemiş olan toplam 21 peptidin, 18'inin LvHC ve 3'ünün LvLC'ye ait olduğu, bunlardan sadece bir tanesinin karaciğerde bulunduğu, geri kalan

peptidlerin % 80'inin yalnızca ovaryumda bulunduğu ve SbsVtgC tam peptid dizisinin % 22.1'ini oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer levrek Vtg formlarından türemiş peptidlerde (SbsVtgAa ve SbsVtgAb) olduğu gibi, SbsVtgC'den türemiş peptidlere ait karaciğer, plazma ve ovaryumdaki ortalama N-SC logaritmik transforme değerleri ($\text{Log}_{10}[y + 1]$, $y = \text{N-SC}$) arasında istatistiki olarak önemli ($P \leq 0.001$) düzeyde farklar olduğu görülmüştür. Buna göre, ortalama normalize peptid spektra sayılarının (N-SC) ovaryumda plazmadan daha yüksek olduğu ($P \leq 0.001$), plazmada ise karaciğerden daha yüksek olduğu ($P \leq 0.05$) belirlenmiştir (ovaryum >>plazma>karaciğer, Şekil 4.12).

Kütle spektrometre analizleri, levrek Vtg'leri ve bunlardan türemiş YP'lerin PV aşamasındaki dişilere ait karaciğer, plazma ve ovaryumdaki varlığını doğrulamıştır (Çizelge 4.6). Bütün örnek tiplerindeki bulgular, levrek Vtg veya bunlardan türemiş YP seviyelerinin karaciğerde en düşük, kan plazmasında orta düzeyde ve ovaryumda en yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.12). Karaciğerden sentezlendikten hemen sonra Vtg'lerin kana salındığı ve büyümekte olan oosite taşınarak YP formunda depolandığı düşünüldüğünde, bu bulgular beklenen bir durumu ifade etmektedir. Tespit edilen triptik peptidler, PvAa hariç levrek Vtg formlarına ait bütün YP alt birimlerini temsil etmekte olup bu peptidlerin dizileri olgun Vtg protein dizilerinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Yumurta sarısı protein alt birimlerinin tahmini büyüklükleri (Şekil 4.9) ile tespit edilen triptik peptid sayısı (Çizelge 4.6) arasında pozitif bir ilişki olduğu göz önünde bulundurulduğunda, ~7 kDa büyüklüğündeki PvAa alt birimine ait herhangi bir triptik peptid tespit edilememesi oldukça normal bir durumdur. Bu bulgularla, her bir levrek Vtg formuna ait YP alt birimlerinin (PvAa hariç), PV aşamasındaki dişilere ait gonadlarda yumurta sarısı depolarına katkıları da doğrulanmıştır (Çizelge 4.6). Bütün bunlar göz önüne alındığında, her üç levrek Vtg'inin de YP'lerine ayrışmak üzere oosit içerisine alındığı net olarak görülmektedir.

Örnek tipine bağlı olarak, SbsVtgAa'dan türemiş YP'lere göre 2-5 kat arasında daha yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edilen SbsVtgAb'nin levrekte bulunan Vtg'ler arasında baskın form olduğu görülmektedir (Şekil 4.12). SbsVtgC yan ürünü YP'lerin, kan plazmasında ve karaciğerde SbsVtgAb YP'lerinde göre, sırasıyla 22 ve 113 kat daha az seviyelerde buldukları gözlenmektedir. Bu durum, VtgC'nin

karaciğerden sentezinin ve dolayısıyla kana salgılanmasının, levrekte oogenezin PV aşamasında oldukça sınırlı olduğunu ortaya koymaktadır. Tespit edilen 21 adet SbsVtgC triptik peptidinden yalnızca bir tanesine (tespit edilen toplam peptid sayısının yalnızca % 5'i) karaciğerde rastlanırken, bunların hepsine birden ovaryumda rastlanmıştır (Çizelge 4.6). Bunun yanında, SbsVtg yan ürünü peptidlerin ovaryumdaki seviyelerinin diğer örnek tiplerine göre oldukça yüksek ve SbsVtgAb peptidlerinin 1/3'ü oranında olduğu bariz görülmektedir (Şekil 4.12). Bu bulgular, SbsVtgAb'nin büyümeyi tamamlamış levrek oositinde Vtg'den türemiş YP'lerin % 54.5'ini oluşturarak oosit YP birikimine baskın bir katılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ancak burada ayrıca, SbsVtgAa ve SbsVtgC'nin de sırasıyla % 27.3 ve % 18.2 gibi önemli oranlarda katılım gösterdiği de görülmektedir.

Günümüze kadar incelenmiş diğer acanthomorph teleostlardan Atlantik pisi balığı (Finn vd 2007), *V. moseri* (Sawaguchi vd 2008), kefal (Amano vd 2008ab) ve mercan (Sawaguchi vd 2006)'da da kan dolaşımı ve/veya oosit YP depolarında, temel katılımı sağlayan Vtg formunun VtgAb olduğu ancak VtgAa'nın da bu birikimlerde önemli düzeyde katkıları olduğu gözlenmiştir. Örneğin, aşırı derecede yüzebilme yeteneğine sahip yumurtalar bırakan (pelagophil) *C. rupestris*'te, VtgAb ve VtgC formlarının oosit YP depolarına katkısı çok az seviyelerde olup VtgAa diğer formlara göre önemli bir farkla yumurta sarısının temel kaynağını oluşturmaktadır (Kolaravic vd 2008). Yukarıda adı geçen bütün bu türlerde VtgAa'dan türemiş YP'leri ozmotik olarak oosit hidrasyonuna ve yumurtanın yüzebilirlik karakteri kazanımına yardımcı olmak amacıyla yoğun bir proteolizle FAA'lere ayrışırlar. Bunun yanında VtgAb'den türemiş temel YP olan LvHAb, yalnızca sınırlı bir proteolize maruz kalır. Bu durum oosit içerisindeki VtgAa/VtgAb oranının, FAA havuzu büyüklüğünü kontrol ettiğini ve paralog Vtg formlarından her birinin maruz kaldığı farklı proteoliz derecelerini yansıttığını göstermektedir. Yüzebilirliği yüksek yumurtalar bırakan türlerde, VtgAa ve VtgAb'nin oositlerde belli oranlarda depolandığı bilinmektedir. Bunun yanında diğer bazı türlerin, VtgAa/VtgAb oranlarını yumurta yüzebilirliğini kontrol edecek şekilde yumurtlama ortamının tuzluluğuna göre ayarlayabildiği öne sürülmüştür (Matsubara vd 2003, Sawaguchi vd 2006).

Çoğu teleostta VtgC, oosit olgunlaşması sırasında uğradığı küçük çaplı proteoliz ve dolayısıyla yumurta FAA havuzuna veya yüzebilirliğine sınırlı katkıları nedeniyle daha önemsiz bir Vtg formu olarak değerlendirilmiştir (Matsubara vd 2003, Hiramatsu vd 2006, Finn ve Kristoffersen 2007, Reading vd 2009, Reading ve Sullivan 2011). Bu sonuca, vitellojenik oosit içerisindeki Vtg tipine özgün LvH (LvHAa:LvHAb:LvHC) oranlarına dayanarak varılmıştır. Kefalde bu oran 4:13:1 iken, *V. moseri*'de 9:15:1 olarak bildirilmiştir. Ayrıca LvHC'nin, kefalde oositlerdeki toplam LvH birikiminin % 5.4'ünü, *V. moseri*'de ise % 4'ünü oluşturduğu belirtilmiştir (Amano vd 2008a, Sawaguchi vd 2006). Kefal oositlerinde belirlenen, *V. moseri*'dekine göre daha düşük LvHAa ve daha yüksek LvHC seviyelerinin, kefalın acı sularda yumurtlaması ve oositlerinin follikül olgunlaşması sırasında hacimce yalnızca % 171 artışa neden olan orta ölçekte bir hidrasyona uğramasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Greeley vd 1986). Bunun yanında, *V. moseri* oositlerinin hacimce % 314 (Matsubara ve Koya 1997), yüksek yüzebilirliğe sahip yumurtalar bırakan diğer türlere ait oositlerin ise hacimce % 260-643 (Greeley vd 1986) oranında artışına neden olan ciddi hidrasyonlara uğradığı bildirilmiştir. Bu bilgilere göre kefalde Vtg tipine özgü LvH oranının, LvHAa alt biriminin ozmotik olarak aktif FAA havuzuna katkılarını sınırlayacak şekilde adapte olduğu söylenebilir.

Şekil 4.12'de, karaciğer için verilmiş olan normalize spektra sayılarının ters Log10 [(N-SC) +1] ortalama değerlerine göre, Vtg formlarından türemiş peptidlerin karaciğerdeki miktarları arasında yaklaşık 22.0:113.0:1.0 gibi bir SbsVtgAa:SbsVtgAb:SbsVtgC ilişki olduğu belirlenmiştir. Buna göre, karaciğerde SbsVtgAb'den türemiş peptidlerin, SbsVtgAa'dan türemiş peptidlerden yaklaşık 5 kat daha yüksek seviyelerde bulunduğu, buna karşın SbsVtgC'den türemiş peptidlerin çok düşük seviyelerde bulunduğu gözlenmektedir. Plazma için bu değerler 7.6:22.6:1.0 olarak belirlenmiştir. SbsVtgAb'den türemiş peptidlerin, plazmada SbsVtgAa'dan türemiş peptidlerden ~3 kat daha yoğun bulunduğu ve SbsVtgC'den türemiş peptidlerin ise plazmada da çok az seviyelerde bulunduğu görülmüştür. Ovaryumda SbsVtgAa:SbsVtgAb:SbsVtgC oranı, 1.5:3.0:1.0 olarak belirlenmiştir. SbsVtgAb'den türemiş peptidlerin ovaryumda SbsVtgAa'dan türemiş peptidlerden yaklaşık 2 kat daha yoğun bulunduğu, buna karşın SbsVtgC'den türemiş peptidlerin ovaryumda

SbsVtgAa'dan türemiş peptidlerin yarısı ve SbsVtgAb'den türemiş peptidlerin 1/3'ini oluşturacak seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, PV aşamasındaki levrek ovaryum ekstraktında belirlenen triptik peptidlerin normalize edilmiş spektral sayılarına dayanarak, Vtg formuna özgü oran (VtgAa:VtgAb:VtgC) 1.5:3.0:1.0 olarak ortaya konmuştur. Burada VtgC'den türemiş YP (öncelikli olarak LvHC)'lerin, oosit içerisindeki toplam YP'lerin % 18.0'ini oluşturduğu görülmektedir. VtgC'den türemiş YP'lerin, ovaryumda bu derece yüksek oranlarda bulunmaları yalnızca levreğe özgü bir durum değildir. Benzer şekilde, *G. affinis*'te vitellojenik oosit içerisindeki YP'lerin yaklaşık % 25'inin VtgC'den türediği bildirilmiştir (Sawaguchi vd 2005ab). Denizde yaşayan ve pelajik yumurtalar bırakan türlerin oositlerinin olgunlaşma aşamasında, *in vivo* olarak % 250 (Mayer vd 1990) veya *in vitro* olarak % >271 (Sorbera vd 1999) gibi önemli oranlarda hidrasyona uğradığı bilinmektedir. Bu türlerden biri olan levrekte, oosit olgunlaşması sırasında Vtg'den türemiş YP'lerinin ikincil proteolizi sonucunda oldukça büyük bir FAA havuzuna sahip olduğu tahmin edilmektedir. Çalışmada, PV ve OV aşamalarındaki ovaryum ekstraktlarının, kefal anti-LvC antikoru kullanılarak gerçekleştirilen Western blot analizlerinde, SbsLvHC'nin oosit olgunlaşması sırasında ciddi bir proteolize uğradığı belirlenmiştir. Bu durum, levrekte ve belki de diğer bazı türlerde VtgC ürünü YP'lerin, FAA havuzuna ve dolayısıyla da oosit hidrasyonuna önemli katkıları olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, incelenen türlerdeki Vtg veya LvH oranları ile ilgili yorumların, her bir Vtg ve bunların türevi YP'lerin uğradığı farklı proteoliz düzeyleri hakkında edinilecek detaylı bilgilere dayanarak yapılması gerekmektedir.

Postvitellojenik dişilerde, VtgC'nin ovaryum YP depolarına bariz katkılarının, karaciğer ve kan plazmasındaki oranlarına göre nispeten yüksek oluşu oldukça ilginçtir. Bu durum, VtgC'nin sentez yeri ve büyümekte olan oosite girişinin yanı sıra, VtgC türevi YP'lerin oositteki birikim mekanizmaları üzerine merak uyandırmaktadır. Postvitellojenik (PV) aşamadaki levrek ovaryumunda VtgC türevi peptid miktarları, oogenez süresince gerçekleşen birikimin toplamını yansıtmaktadır. Ancak, karaciğer ve kan plazmasındaki miktarlar, VtgC'nin PV aşamasına özgün sentez oranlarını ve bu noktada muhtemelen büyümekte olan oosit içerisine alınmalarından dolayı, kan

dolaşımından tasfiyelerini yansıtmaktadır. Diğer bir deyişle, söz konusu peptid miktarlarının PV aşamasında karaciğerdeki VtgC sentezi ve bu noktada kanda taşınmakta olan miktarlarını, ovaryumda ise oosit gelişimi boyunca PV aşamasına kadar olan süreç içerisindeki birikimini yansıtmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada VtgC türevi peptidlerin farklı örnek tiplerinde tespit edilen miktarlarındaki nispi farklılıklar, oogenez boyunca VtgC sentez, salınım ve tasfiye oranlarından kaynaklanıyor olabilir. Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Ndiaye vd 2006) ve *O. latipes* (Hiramatsu vd 2008) üzerine yapılmış bazı çalışmalar, VtgC'nin vitellogeniz tamamlanmadan önce previtellogenik aşamada üretiliyor olabileceğini de öne sürmüştür. Ayrıca VtgC'nin, oositin kendisi veya karaciğerden başka bir doku tarafından sentezleniyor olabileceği üzerine de spekülasyonlar mevcuttur. Zebra balığında, *vtgC* mRNA'larının karaciğer dışındaki dokulardaki ekspresyon (ekstrahepatik ekspresyon)'u üzerine kanıtlar bulunmaktadır. Ancak, bu balıkta *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yeri belirlenen bağırsak, ovaryum ve testis gibi dokulara ilişik adipöz hücreleri (adiposit)'ndeki bu ekspresyon oranı karaciğerdekine göre % 10'un altında kalmıştır (Wang vd 2005). Gökkuşluğu alabalığı ve zebra balığında yapılan bir çalışmada *vtgC* transkripsiyon seviyelerinin karaciğerdekine oranla 45 kat daha düşük olduğu ancak, VtgC'nin beyaz adipöz doku (White Adipose Tissue, WAT) tarafından üretildiği ve bu üretimin vitellogeniz erken aşamalarında geç döneme göre daha yüksek seviyelerde olduğu bildirilmiştir (Tingaud-Sequeira vd 2011).

Ovaryumda tespit edilen yüksek VtgC seviyelerini açıklayabilecek diğer bir olasılık da diğer Vtg formlarının oosit içerisinde plazmadaki seviyelerinden daha yüksek birikim oranlarına (VtgAa:VtgAb:VtgC) neden olan seçici yeni mekanizmaların varlığı üzerinedir. Bu çalışmada Vtg tipine göre peptid oranları kan plazmasında 7.6:22.6:1.0, ovaryumda ise 1.5:3.0:1.0 olarak tespit edilmiştir. VtgC'nin LvH alt birimi üzerinde yer alan istisnai bir reseptör bağlanma bölgesinin varlığı bildirilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.5'te, levrek ile beraber günümüze kadar incelenmiş diğer *Moronidae* türleri ve bazı acantomorph teleostlar için, bu bölgelere ait amino asit dizileri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar, Reading ve diğerleri (2009)'nın bildirdiği üzere, VtgC için bu bölge üzerinde diğer Vtg'lerden farklı olarak reseptör bağlanması açısından kritik öneme sahip lizin yerine glutaminin yer aldığı göstermiştir. Bu durum, beyaz levrekte diğer

Vtg formlarının aynı deneysel koşullarda ovaryum membranına veya membran proteinlerine bağlanmasını ancak lizin yerine glutamin taşıyan VtgC'nin bağlanmakta başarısız oluşunu açıklamaktadır (Reading vd 2011). Bu gözlemler, VtgC'nin özgün bir oosit reseptöründen yoksun olduğu ve oosite bilinmeyen yollarla, diğer Vtg formlarının veya başka ligandların reseptör kontrollü endositozuna ilişik olarak sıvı fazda, giriş yapıyor olabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır (Reading vd 2009). Ancak bu senaryo, VtgC türevi YP'lerin oosit içerisindeki yoğun birikimini açıklamamaktadır.

Levrekte VtgC'nin, oositlerde bu kadar yüksek seviyelerde birikiminden sorumlu mekanizmaların açıklanabilmesi için, *vtgC* transkripsiyon seviyelerinin karaciğer, ovaryum ve diğer dokularda saptanması gerekmektedir. Bununla beraber, farklı Vtg tiplerinin ve bunlardan türemiş YP'lerinin plazma ve ovaryumdaki seviyelerinin, oogenezin farklı aşamalarında tespiti üzerine daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen tam cDNA dizileri (*SbsvtgC*), *vtgC* transkripsiyon seviyelerinin farklı dokular ve ovaryum gelişim aşamalarında kantitatif PCR (qPCR) yoluyla belirlenmesinde primer tasarlanmasına olanak tanıyacak ve kontrol amaçlı kullanılacak nükleotid dizi kaynağını oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışmada elde edilen olgun protein peptid (SbsVtgC) dizileri, farklı gonad gelişim aşamaları için VtgC ve türevi YP miktarlarının izotopik olmayan kütle spektrometrisi yoluyla plazma ve ovaryumda belirlenmesinde kullanılacak veri tabanına kaynak oluşturmaktadır.

Postvitellojenik (PV) aşamadaki dişi levrelere ait plazma örneklerinde tespit edilen 'tam' yapıdaki Vtg'lere ait triptik peptid oranları (VtgAa:VtgAb; ~1:3) ile ovaryum örneklerinde tespit edilen triptik peptid oranları (~1:2), VtgAa türevi YP'lerin oositteki birikiminin VtgAb türevi YP'lerin birikimi ile orantılı ve plazmadaki tahmini VtgAa/VtgAb oranından yaklaşık % 50 daha yüksek olduğunu göstermektedir. Vitellojen C'de olduğu gibi, VtgAa türevi YP'lerin PV aşamasındaki oositlerde daha yüksek birikimi, bundan önceki aşamalarda kanda VtgAa seviyelerinin VtgAb seviyelerinden daha yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. Sawaguchi ve diğerleri (2008) *V. moseri*'de, VtgAa:VtgAb plazmadaki oranında oosit büyümesi (vitellojenez) boyunca ~1.0:1.4, oosit büyümesi tamamlandığında (PV aşamada) ise ~3.2:1.0 değerleri

gösteren tersi bir durum bildirmiştir. Bu durum, kan dolaşımında Vtg oranlarındaki değişimin türler arasında farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Ancak *V. moseri*'de, folliküldeki Vtg formuna özgü LvH oranlarının (LvHAa:LvHAb) plazmadaki VtgAa:VtgAb oranlarındaki değişime rağmen oosit büyümesi sırasında ~1.0:1:7 değerinde sabit kaldığı görülmüştür. Bu durum, farklı Vtg formlarının oosit içerisine birbirinden bağımsız olarak alınmasını kontrol eden ve muhtemelen reseptör kontrollü olan bir sistemin varlığını doğrulamaktadır. Reading ve diğerleri (2011), beyaz levrekte VtgAa ve VtgAb'ye özgül olarak bağlanan birbirinden bağımsız çoklu VtgR sisteminin varlığını ortaya koymuş, bunların miktarlarında aktivite ve hassasiyetlerindeki farklılıkların bu iki Vtg'nin oosit içerisindeki seçici birikimini etkileyebileceğini belirtmiştir. Farklı Vtg formlarının oogenezin farklı aşamalarında plazma oranlarının değişimi ve YP'lerin oosit içerisindeki birikim oranları üzerine yapılabilecek çalışmalar, çoklu VtgR'lerin miktarları ve işlevlilikleri hakkında detaylı bilgi sağlayacaktır. Sonuç olarak, bu bilgiler yukarıda bahsi geçen bütün olasılıkları aydınlatmaya yardımcı olacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, levrekte çoklu Vtg sistemi üzerine bildirilen ilk raporu teşkil etmektedir. Burada, son yıllarda diğer *Moronidae* türlerinde ve diğer birçok acanthomorph teleost türünde keşfedilmiş olan iki paralog VtgA formu ve fosvitinsiz bir Vtg formu levrek için ortaya konmuştur. Buna göre, homolog olan üç farklı levrek Vtg proteini (SbsVtgAa, SbsVtgAb ve SbsVtgC) ve bunları kodlayan genlerin tam cDNA dizileri (*SbsvtgAa*, *SbsvtgAb* ve *SbsvtgC*) ile beraber bunların levrek kanında ve oositlerindeki varlığı, birbirini doğrulayan farklı yöntemlerle ortaya konmuştur.

Levrekte ayrıca, bu üç farklı Vtg formuna ait cDNA dizilerinden yola çıkılarak elde edilen tahmini polipeptid dizileri ve YP alt birim yapıları belirlenmiştir. Bununla beraber söz konusu Vtg alt birimleri, üzerinde yer alan olası sinyal peptid, birincil enzimatik ayrışma ve reseptör bağlanma bölgeleri ile amino asit kompozisyonları gibi yapısal ve olası fonksiyonel özellikleri bakımından analiz edilmiştir. Bu analizler ve önceki çalışmalardan edinilen bilgiler doğrultusunda, levrekte ve diğer teleostlarda bulunan her bir Vtg formu ve türevleri YP'lerin, özel fonksiyonları hakkında fikir edinilmiştir. Buna göre, VtgC'nin diğer Vtg formlarından farklı bir alt birim yapısına ve reseptör bağlanma bölgesine sahip olduğu belirlenmiş, dolayısıyla oosit içerisine muhtemelen reseptör kontrollü endositozun dışında bir yolla alındığına dair yargıya varılmıştır. Ayrıca, diğer tam yapıdaki Vtg formlarına ait alt birimler üzerindeki varsayılan fosforilasyon ve glikolizasyon bölgeleri, poliserin ve korunmuş sistein dizilerinin, olgun Vtg molekülünün yapısal stabilizasyonunda ve oosite lipid taşınmasındaki rolleri üzerine bilgi edinilmiştir.

Her bir Vtg formunun, PV aşamasındaki dişi levrek kan plazmasındaki varlığı, Western blot analizi nanoLC/MS/MS analizleri gibi birbirini tamamlayıcı ve doğrulayıcı iki yöntem ile ortaya konmuştur. Western blot analizleri ayrıca ovulasyon aşamasındaki levrek gonad ekstraktında her bir Vtg'den türemiş Lv YP alt birimlerinin varlığını tespit etmede kullanılmıştır. Postvitellojenik (PV) ve ovulasyon (OV) aşamasındaki ovaryum ekstraktlarına ait Western blotlarının karşılaştırılmaları, her üç Vtg formunun da yumurta YP depolarına katkıları olduğunu ortaya koymuştur. Bu

durum, kütle spektrometre analizi ile de doğrulanmıştır. Bu yöntemden edinilen bulgular, her üç Vtg LvH alt biriminin de oosit olgunlaşması sırasında kısmi ayrışmaya uğradığını göstermiştir. Bu gözlemler levreğe özgü bir YP proteoliz modelinin varlığına işaret etmektedir. Buna göre her bir Vtg'nin yapısında bulunan YP alt birimlerinden özellikle LvH (SbsLvHAa, SbsLvHAb ve SbsLvHC)'in oosit olgunlaşması sırasında kısmi bir proteolize uğradığı ve büyük ihtimalle oosit hidrasyonunda ozmotik etmen ve embriyo gelişiminde besin kaynağı olarak görev yapan FAA havuzlarına katıldığı tahmin edilmektedir. Ancak, bu modelin varlığı ve işleyişinin daha detaylı çalışmalarla deneysel olarak doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışmada ayrıca, PV aşamasındaki dişi levrek karaciğer, kan plazması ve ovaryum örneklerinin kütle spektrometre analizleri, SbsVtgAb'nin bu türde baskın Vtg formu olduğunu ve oosit YP depolarına en çok katılımı sağladığını ortaya koymuştur. Bu yöntem ayrıca SbsVtgAb kadar olmasa da SbsVtgAa ve SbsVtgC'nin de YP birikimine önemli katkıları olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmadan elde edilen bu bulgular bütünü ile, kültür şartlarındaki levrekte oogenez ve yumurta kalitesi üzerine gelecekte yapılabilecek çalışmalara temel oluşturacak bilgi ve araçlar temin edilmiştir. Sıcaklık, fotoperiyot, beslenme ve stress gibi faktörlerin vitellogenizi ve katepsin gen ekspresyonu seviyelerini olumsuz etkilediği diğer türlerde bildirilmiş olsa da bu olumsuzlukların çoklu Vtg sistem üzerine etkileri daha önce incelenmemiştir. Yetiştiricilik şartları veya çevresel şartlardaki herhangi bir olumsuzluğun, vitellojen sisteminin işleyişini de etkileyeceği varsayılacak olursa, bu aksamaların levrekte yumurta kalitesini düşürüp düşürmeyeceği incelenmeyi bekleyen diğer konular arasındadır.

Ancak, levrekte yumurta kalitesi üzerine herhangi bir çalışma planlanmadan önce, bu türde çoklu Vtg sistem üzerine tamamlayıcı temel çalışmalar gerçekleştirilmesi daha uygun olacaktır. Buna göre vitellojenden türemiş YP'lerin ovulasyona uğramış yumurtadaki oranlarının doğru yorumlanabilmesi amacıyla, her bir vtg gen transkripsiyonunun ne zaman ve ne oranda gerçekleştiğinin kantitatif PCR (qPCR) yoluyla belirlenmesi faydalı olacaktır. Bu amaçla kullanılacak primerler, bu çalışmadan elde edilen Vtg cDNA'ları kullanılarak tasarlanabilir. Benzer olarak, üreme döngüsü

boyunca plazma vitellojen seviye profilleri ve Vtg'den türemiş YP'lerin oranlarındaki değişikliklerin, oosit ve yumurta ekstraktlarının kütle spektrometre analizi ile karşılaştırılmasıyla ortaya konması oosit olgunlaşması sırasındaki ikinci proteoliz hakkında daha sağlıklı yorumlar yapılmasına olanak tanıyacaktır. Bu analizlerin gerçekleştirilmesinde, bu çalışmadan elde ettiğimiz üç farklı Vtg cDNA dizileri, veri tabanını oluşturmak üzere kullanılabilir. Bütün bu temel çalışmalar tamamlandıktan sonra, elde edilen yeni bilgiler ve metodlar kullanılarak yumurta kalitesi çalışmaları, dişilerden biyopsiyle alınacak postvitellojenik oosit ve ovulasyona uğramış yumurtaların kütle spektrometre analizleri ile karşılaştırılmaları sonucu gerçekleştirilmelidir. Ayrıca yetiştiricilik koşullarında herhangi bir değişiklik ve uygulamanın yumurta kalitesini olumsuz etkilemesi halinde çoklu vitellojen sistemin işlevselliğini değerlendirmek için de aynı yol izlenebilir.

Bu çalışmadan elde edilen *Sbsvtg* dizileri, yukarıda bahsi geçen kantitatif PCR ve kütle spektrometre analizlerine dayalı çalışmaların yürütülebilmesi için gerekli alt yapıyı oluşturmaktadır. Bütün olarak elde edilen bulgularla bu çalışma, dünya genelinde en önemli deniz türlerinden biri olan levrekte, oogenez ve yumurta kalitesi temelinde yatan vitellogenezin moleküler detayları üzerine fonksiyonel çalışmalara sağlam bir zemin hazırlamıştır.

6. KAYNAKLAR

- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. and LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- ALVARIÑO, J.M.R., CARRILLO, M., ZANUY, S., PRAT, F. and MAÑANÓS, E. 1992. Pattern of sea bass oocyte development after ovarian stimulation by LHRHa. *J. Fish Biol.*, 41: 965-970.
- AMANO, H., FUJITA, T., HIRAMATSU, N., SAWAGUCHI, S., MATSUBARA, T., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2007a. Purification of multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). *Mar. Biol.*, 152: 1215-1225.
- AMANO, H., FUJITA, T., HIRAMATSU, N., SHIMIZU, M., SAWAGUCHI, S., MATSUBARA, T., KAGAWA, H., NAGAE, M., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2007b. Egg yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. *J. Exp. Zool.*, 307A: 324-341.
- AMANO, H., FUJITA, T., HIRAMATSU, N., KAGAWA, H., MATSUBARA, T., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2008a. Multiple vitellogenin-derived yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): disparate proteolytic patterns associated with ovarian follicle maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 75: 1307-1317.
- AMANO, H., FUJITA, T., HIRAMATSU, N., KAGAWA, H., SAWAGUCHI, S., MATSUBARA, T., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2008b. Molecular alteration of three forms of vitellogenins and their derivative yolk proteins during oocyte growth and maturation in grey mullet (*Mugil cephalus*). *Cybium, the International Journal of Ichthyology*, 32 (2) suppl.:156-158.
- AMANO, H., KITAMURA, M., FUJITA, T., HIRAMATSU, N., TODO, T., SUYAMA S. and HARA, A. 2008c. Purification and characterization of lipovitellin from Pacific saury (*Cololabis saira*). *Fish. Sci.*, 74: 830-836.
- ASTURIANO, J.F., SORBERA, L.A., RAMOS, J., KIME, D.E., CARRILLO, M. and ZANUY, S. 2002. Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Sci. Mar.*, 66 (3): 273-282.
- BABIN, P.J., CARNEVALI, O., LUBZENS, E. and SCHNEIDER, W.J. 2007. Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. In: P.J. Babin, J. Cerdá, E. Lubzens (editors). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. New York. Springer. pp. 39-76.

- BAGOWSKI, C.P., MYERS, J.W. and FERRELL, JR. J.E. 2001. The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 276: 37708–37714.
- BARNABÉ, G. 1995. The sea bass. Nash, C.E. and Novothy, A.J. 1995. World Animal Science, Production of Aquatic Animals, Elsevier, Amsterdam, pp. 269-287.
- BEAUDOING, E., FREIER, S., WYATT, J.R., CLAVERIE, J-M. AND GAUTHERET, D. 2000. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.*, 10: 1001-1010.
- BENNET, H.S., WYRICK, A.D., LEE, S.W.Y and McNEIL, J.H. 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stains. *Stain Technology*, 51: 71-94.
- BOBE, J. and LABBÉ, C. 2010. Egg and Sperm Quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165: 535-548.
- BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.*, 72: 248-254.
- BROMAGE, N.R. 1995. Broodstock management and seed quality-general considerations. In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (editors). Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Blackwell, Oxford, 424pp.
- BROOKS, S., TYLER, C.R. and SUMPTER, J.P. 1997. Egg quality in fish: What makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fish.*, 7: 387-416.
- BUJO, H., LINDSTEDT, K. A., HERMANN, M., MOLA DALMAU, L., NIMPF, J. and SCHNEIDER, W. J. 1995. Chicken oocytes and somatic cells express different splice variants of a multifunctional receptor. *J. Biol. Chem.*, 270: 23546–23551.
- CARNEVALI, O., MOSCONI, G., CENTONZE, F., ZANUY, S., CARRILLO, M. and BROMAGE, N.R., 1998. Influence of dietary lipid composition on yolk protein components in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Sci. Mar.* 62: 311-318.
- CARNEVALI, O., CENTONZE, F., BROOKS, S., MAROTA, I. and SUMPTER, J.P. 1999a. Molecular cloning and expression of ovarian cathepsin D in seabream, *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.*, 66: 785-791.

- CARNEVALI, O., CARLETTA, R., CAMBI, A., VITA, A. and BROMAGE, N. 1999b. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream, *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Biology of Reproduction*, 60: 140-146.
- CARNEVALI, O., MOSCONI, G., CAMBI, A., RIDLFI, S., ZANUY S. and POLZONETTI-MAGNI, A.M. 2001. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass *Dicentrarchus labrax* egg and developing embryo. *Aquaculture*, 202: 249-256.
- CARNEVALI, O., CIONNA, C., TOSTI, L., LUBZENS, E. and MARADONNA, F. 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 146: 195-203.
- CARNEVALI, O., CIONNA, C., CERDÁ, J. and CIOACCHINI, G. 2008. Changes in cathepsin gene expression and relative enzymatic activity during gilthead sea bream oogenesis. *Mol. Rep. Dev.*, 75: 97-104.
- CARRILLO, M., BROMAGE, N., ZANUY, S., SERRANO, R. and PRAT., F. 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 81: 351-365.
- CARRILLO, M., ZANUY, S., PRAT, F., SERRANO, R. and BROMAGE, N. 1993. Environmental and hormonal control of reproduction in sea bass. In: J.F. Muir and R.J. Roberts (editors). *Recent Advances in Aquaculture*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Vol IV, pp. 43-54.
- CARRILLO, M., ZANUY, S., PRAT, F., CERDÁ, J., RAMOS, J., MAÑANOS, E. and BROMAGE, N. 1995. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (editors). *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell, Oxford. pp. 138-168.
- CERDÁ, J.L., PETRINO, T.R. and WALLACE, R.A. 1993. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Dev. Biol.* 160: 228-235.
- CERDÁ, J.L., SUBHEDAR, N., REICH, G., WALLACE, R.A. and SELMAN, K. 1998. Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, 160: 228-235.
- CERDÁ, J., FABRA, M. and RALDÚA, D. 2007. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration. In: P.J. Babin, J. Cerdá and E. Lubzens (editors). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht, The Netherlands. Springer. pp. 349-396.

- CERDÁ, J., BOBE, J., BABIN, P.J., ADMON, A. and LUBZENS, E. 2008. Functional genomics and proteomic approaches for the study of gamete formation and viability in farmed finfish. *Rev. Fish. Sci.*, 16 (S1): 54-70.
- CHANG, Y.S., WANG, S.C., TSAO, C.C. and HUANG, F.L. 1996. Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene. *Mol. Reprod. Dev.*, 44: 295-304.
- CHANG, Y.S., HSU, C.C., WANG, S.C., TSAO, C.C. and HUANG, F.L. 1997. Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP2 gene. *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 258-267.
- DAVAIL, B., PAKDEL, F., BUJO, H., PERAZZOLO, L.M., WACLAWEK, M., SCHNEIDER, W.J. and Le MENN, F. 1998. Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. *J. Lipid Res.*, 39: 1929-1937.
- DAVIS, L.K., HIRAMATSU, N., HIRAMATSU, K., READING, B.J., MATSUBARA, T., HARA, A., SULLIVAN, C.V., PIERCE, A.L., HIRANO, T. and GRAU, E.G. 2007. Induction of three vitellogenins by 17beta-estradiol with concurrent inhibition of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Biol. Reprod.*, 77: 614-625.
- FABRA, M., RALDUA, D., POWER, D.M., DEEN, P.M. and CERDÁ, J. 2005. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated. *Science*, 307: 545.
- FABRA, M., RALDUA, D., BOZZO, M.G., DEEN, P.M., LUBZENS, E. and CERDÁ, J. 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-1o play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. *Dev. Biol.*, 295: 250-262.
- FINN, R.N., RONNESTAD, I. and FYHN, H.J. 1995a. Respiration, nitrogen and energy metabolism of developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111A: 647-671.
- FINN, R.N., FYHN, H.J. and EVJEN, M.S. 1995b. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). I. Respiration and nitrogen metabolism. *Mar. Biol.*, 124: 355-369.
- FINN, R.N., ØSTBY, G.C., NORBERG, B. and FYHN, H.J. 2002a. In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. *J. Exp. Biol.*, 205: 211-224.
- FINN, R.N., WAMBOLDT, M. and FYHN, H.J. 2002b. Differential processing of yolk proteins during oocyte hydration in fishes (*Labridae*) that spawn benthic and pelagic eggs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 237: 217-226.

- FINN, R.N. 2007a. The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: a conserved mechanism of oocyte hydration. *Biol. Reprod.*, 76: 936-948.
- FINN, R.N. 2007b. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. *Biol. Reprod.*, 76: 926-935.
- FINN, R.N. and KRISTOFFERSEN, B.A. 2007. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE*, 2 (1): e169.
- FINN, R.N. and FYHN, H.J. 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquaculture Research*, 41 (5): 684-716.
- FINN, R.N, KOLAREVIC, J., KONGSHAUG, H. and NILSEN, F. 2009. Evolution and differential expression of a vertebrate vitellogenin gene cluster. *BMC Evolutionary Biology*, 9:2.
- GREELEY, M.S.J., CALDER, D.R. and WALLACE, R.A. 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: Correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B: 1-9.
- HIRAMATSU, N., HARA, A., HIRAMATSU, K., FUKADA, H., WEBER, G.M., DENSLOW, N.D. and SULLIVAN, C.V. 2002a. Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morone americana*: Purification, characterization and vitellogenin-receptor binding. *Biol. Reprod.*, 67: 655-667.
- HIRAMATSUA, N., HIRAMATSU, K., HIRANO, K. and HARA, A. 2002b. Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 131 (2): 429-441.
- HIRAMATSU, N., ICHIKAWA, N., FUKADA, T., FUJITA, T., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2002c. Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids. *J. Exp. Zool.*, 292: 11-25.
- HIRAMATSU N, MATSUBARA, T., WEBER, G.M., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2002d. Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.*, 68 (Suppl 1): 694-699.
- HIRAMATSU, N., MATSUBARA, T., HARA, A., DONATO, D.M., HIRAMATSU, K., DENSLOW, N.D. and SULLIVAN, C.V. 2002e. Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 355-370.

- HIRAMATSU, N., CHAPMAN, R.W., LINDZEY, J.K., HAYNES, M.R. and SULLIVAN, C.V. 2004. Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from white perch (*Morone americana*). *Biol. Reprod.*, 70: 1720-1730.
- HIRAMATSU, N., CHEEK, A.O., SULLIVAN, C.V., MATSUBARA, T. and HARA, A. 2005. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: T.P. Mommsen and T. Moon (editors). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 6, pp. 431-471. Environmental Toxicology, Chapter 16 (s), Elsevier Science Press, Amsterdam, The Netherlands. 562pp
- HIRAMATSU, N., MATSUBARA, T., FUJITA, T., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Mar. Biol.*, 149: 35-47.
- HIRAMATSU, N., INOUE, M., IDEUCHI, H., FUJITA, T., AMANO, H., MATSUBARA, T., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2008. Differential production and uptake of dual vitellogenins in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *CYBIUM Int. J. Ichthyol.*, 32(2). p. 260.
- HYLLNER, S.J., WESTERLUND, L., OLSSON, P.E. and SCHOPEN, A. 2001. Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: Members of a unique group of structural proteins. *Biol. Reprod.*, 64: 805-811.
- IBAÑEZ, A.J., PEINADO-ONSURBE, J., SANCHEZ, E., CERDÁ-REVERTER, J.M. and PRAT, F. 2008. Lipoprotein lipase (LPL) is highly expressed and active in the ovary of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), during gonadal development. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 150: 347-354.
- KANAMORI, A. 2000. Systematic identification of genes expressed during early oogenesis in medaka. *Mol. Reprod. Dev.*, 55: 31-36.
- KING, W., GHOSH, S., THOMAS, P. and SULLIVAN, C.V. 1997. A receptor for the oocyte maturation-inducing hormone $17\alpha,20\beta,21$ trihydroxy-4-pregnen-3-one on ovarian membranes of striped bass. *Biol. Reprod.*, 56: 266-271.
- KOBAYASHI, M., SORENSEN, P.W. and STACEY, N.E. 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 71-84.
- KOLAREVIC, J., NERLAND, A., NILSEN, F. and FINN, R.N. 2008. Goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) is an extreme vtgAa-type pelagophil teleost. *Mol. Reprod. Dev.*, 75(6): 1011-1020.

- KRISTOFFERSEN B. A., NERLAND A., NILSEN F., KOLAREVIC J. and FINN R. N. 2009. Genomic and proteomic analyses reveal non-neofunctionalized vitellogenins in a basal clupeocephalan, the Atlantic herring, and point to the origin of maturational yolk proteolysis in marine teleosts. *Mol. Biol. Evol.*, 26: 1029-1044.
- LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- LaFLEUR, G.J., BYRNE, B.M. and KANUNGO, J. 1995a. *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: The deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J. Mol. Evo.*, 41 (4): 505-521.
- LaFLEUR, G., JR., BYRNE, B.M., HAUX, C., GREENBERG, R.M. and WALLACE, R.A. 1995b. Liver derived cDNAs: Vitellogenin and vitelline envelope protein precursors (choriogenins). In: F. W. Goetz and P. Thomas (editors). Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas, Austin. pp. 336-338.
- LaFLEUR, G.J. JR., RALDÚA, D., FABRA, M., CARNEVALI, O., DENSLOW, N., WALLACE, R.A. and CERDÁ, J. 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, 73: 815-824.
- LE MENN, F., DAVAIL, B., PELISERO, C., NDIAYE, P., BON, E., PERAZZOLO, L. and NÚÑEZ RODRIGUEZ, J. 1999. A new approach to fish oocyte vitellogenesis. In: B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson, and S.O. Stefansson (editors). Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Institute of Marine Research and University of Bergen, Bergen, Norway. pp. 281-282.
- LI, A., SADASIVAM, M. and DING, J.L. 2003. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (Vtgr) and vitellogenin (Vtg), implications on low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. *J. Biol. Chem.*, 278: 2799-2806.
- Lu, C.-L. and Baker, R.C. 1986. Characteristics of egg yolk phosvitin as an antioxidant for inhibiting metal-catalyzed phospholipid oxidations. *Poultry Science*, 65: 2065-2070.
- Lu, C.-L., and Baker, R.C. 1987. Effects of Ph and food ingredients on the stability of egg-yolk phospholipids and the metal-chelator antioxidant activity of phosvitin. *J. Food Science*, 52: 613-616.
- LUBZENS, E., YOUNG, G., BOBE, J. and CERDÁ, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endoc.*, 165: 367-389.

- MAÑANÓS, E., ZANUY, S., LE MENN, F., CARRILLO, M., NÚÑEZ, J. 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I: Induction, purification and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107B: 205-216. (JCR-1997: 0.948)
- MAÑANÓS, E., NUNEZ, J., ZANUY, S., CARRILLO, M. and MENN, F.L. 1994b. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II-validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.*, 107: 217-223.
- MAÑANÓS, E.L., S. ZANUY, S., and CARRILLO, M. 1997. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiol. Biochem.*, 16: 211-222.
- MATSUBARA, T. and KOYA, Y. 1997. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.*, 278: 189-200.
- MATSUBARA, T., OHKUBO, N., ANDOH, T., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *Dev. Biol.*, 213: 18-32.
- MATSUBARA, T., NAGAE, M., OHKUBO, N., ANDOH, T., SAWAGUCHI, S., HIRAMATSU, N., SULLIVAN, C.V. and HARA, A. 2003. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 295-299.
- MAYER, I., SHACKLEY, S. E. and RYLAND, J. S. 1988. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I: An histological and histochemical study of oocyte development. *J. Fish Biol.*, 33: 609-622.
- MAYER, I., SHACKLEY, S.E. and WITTHAMES, P.R. 1990. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. II. Fecundity and pattern of oocyte development. *J. Fish Biol.*, 36: 141-148.
- McDOWELL, E.M. and TRUMP, B.F. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 100: 405-414.
- MOLD, D.E., KIM, I.F., TSAI, C.M., LEE, D., CHANG, C.Y. and HUANG, R.C. 2001. Cluster of genes encoding the major egg envelope protein of zebrafish. *Mol. Reprod. Dev.*, 58: 4-14.

- MOMMSEN, T.P. and WALSH, P.J. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: W.S. Hoar and D.J. Randall. Fish Physiology. Vol. 11A. Academic Press, New York, NY. pp. 347-406.
- MOUCHEL, N., TRICHET, V., BETZ, A., Le PENNEC, J.P. and WOLFF, J. 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene*, 174: 59-64.
- MURATA, K., SASAKI, T., YASUMASU, S., IUCHI, I., ENAMI, J., YASUMASU, I. and YAMAGAMI, K. 1995. Cloning of cDNAs for the precursor proteins of low-molecular-weight subunit of the inner layer of the egg envelope (chorion) of the fish *Oryzias latipes*. *Dev. Biol.*, 167: 9-17.
- MURATA, K., SUGIYAMA, H., YASUMASU, S., IUCHI, I. YASUMASU, I. and YAMAGAMI, K. 1997. Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2050-2055.
- NAGAHAMA, Y. 1997. 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62:190-196.
- NAVAS, J.M., MAÑANÓS, E.L., THRUSH, M., RAMOS, J., ZANUY, S., CARILLO, M., ZOHAR, Y. and BROMAGE, N. 1998. Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 β -estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 165: 65-79.
- NDIAYE, P., FORGUE, J., LAMOTHE, V., CAUTY, C., TACON, P., LAFON, P., DAVAIL, B., FOSTIER, A., LE MENN, F. and NÚÑEZ, J. 2006. Tilapia (*Oreochromis niloticus*) vitellogenins: development of homologous and heterologous ELISAs and analysis of vitellogenin pathway through the ovarian follicle. *J. Exp. Zool.*, 305A: 576-593.
- NIMPF, J. and SCHNEIDER, W.J. 1998. The VLDL receptor: an LDL receptor relative with eight ligand binding repeats, LR8. *Atherosclerosis* 1998, 141: 191-202.
- OHKUBO, N. and MATSUBARA, T. 2002. Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. *Mar. Bio.*, 140 (1): 187-196.
- OHKUBO, N., MOCHIDA, K., ADACHI, S., HARA, A., HOTTA, K., NAKAMURA, Y. and MATSUBARA, T. 2003. Development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 131: 353-364.

- OHKUBO, N., ANDOH, T., MOCHIDA, K., ADACHI, S., HARA, A. and MATSUBARA, T. 2004. Deduced primary structure of two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 137: 19-28.
- OHKUBO, N., SAWAGUCHI, S., HAMATSU, T. and MATSUBARA, T. 2006. Utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Fish Sci.*, 72: 620-630.
- OKABAYASHI, K., SHOJI, H., NAKAMURA, T., HASHIMOTO, O., ASASHIMA, M. and SUGINO, H. 1996. cDNA cloning and expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224: 406-413.
- PATIÑO, R. and PURKISS, R.T. 1993. Inhibitory effects of n-alkanols on the hormonal induction of maturation in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes: implications for gap junctional transport of maturation-inducing steroid. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91: 189-198.
- PATIÑO, R. and KAGAWA, H. 1999. Regulation of gap junctions and oocyte maturational competence by gonadotropin and insulin like growth factor-I in ovarian follicles of red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 115: 454-462.
- PATIÑO, R. and SULLIVAN, C.V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 57-70.
- PATIÑO, R., YOSHIZAKI, G., BOLAMBA, D. and THOMAS, P. 2003b. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker. *Biol. Reprod.*, 68: 516-523.
- PERAZZOLO, L.M., COWARD, K., DAVAIL, B., NORMAND, E., TYLER, C.R., PAKDEL, F., SCHNEIDER, W.J. and Le MENN, F. 1999. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol. Reprod.*, 60: 1057-1068.
- PIFERRER, F., BLÁZQUEZ, M., GONZÁLEZ, A., NAVARRO, L. and LÓPEZ, L. 2004. Update on sex determination and sex differentiation in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Perciformes, F. Moronidae). *Taiwan J. Fish.*, 31: 13-21.
- POLZONETTI-MAGNI, A.M., MOSCONI, G., SOVERCHIA, L., KIKUYAMA, S. and CARNEVALI, O. 2004. Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates. *International Review of Cytology*, 239: 1-46.

- POUSIS, C., DE GIORGI, C., MYLONAS, C.C., BRIDGES, C.R., ZUPA, R., VASSALLO-AGIUS, R., DE LA GÁNDARA, F., DILEO, C., DE METRIO, G. and CORRIERO, A. 2011. Comparative study of liver vitellogenin gene expression and oocyte yolk accumulation in wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Animal Reproduction Science*, 123: 98-105.
- PRAT, F., COWARD, K., SUMPTER, J.P. and TYLER, C.R. 1998. Molecular characterization and expression of two ovarian lipoprotein receptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol. Reprod.*, 58: 1146-1153.
- RAHMAN, M.A., OHTA, K., YOSHIKUNI, M., NAGAHAMA, Y., CHUDA, H. and MATSUYAMA, M. 2002. Characterization of ovarian membrane receptor for 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation inducing hormone in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 127: 71-79.
- RALDÚA, D., FABRA, M., BOZZO, M.G., WEBER, E. and CERDÁ, J. 2006. Cathepsin B-mediated yolk protein degradation during killifish oocyte maturation is blocked by an H⁺-ATPase inhibitor: effects on the hydration mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 290: R456-R466.
- READING, B.J., HIRAMATSU, N., MATSUBARA, T., HARA, A. and SULLIVAN, C.V. 2008. Deduced primary structures of three vitellogenins and specific binding to putative multiple ovarian receptors in white perch (*Morone americana*). *Cybiurn International Journal of Ichthyology*, 32 (2) suppl. 159-161.
- READING, B.J., HIRAMATSU, N., SAWAGUCHI, S., MATSUBARA, T., HARA, A., LIVELY, M.O. and SULLIVAN, C.V. 2009. Conserved and variant molecular and functional features of multiple vitellogenins in white perch (*Morone americana*) and other teleosts. *Marine Biotechnology*, 11: 169-187.
- READING, B.J. and SULLIVAN, C.V. 2011. Vitellogenesis in Fishes, Chapter 257. In: A.P. Farrell, E.D. Stevens, J.J. Jr. Cech and J.G. Richards (editors). *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Academic Press. 2272 p.
- READING, B.J., HIRAMATSU, N. and SULLIVAN, C.V. 2011. Disparate binding of three types of vitellogenin to multiple forms of vitellogenin receptor in white perch. *Biol. Reproduction*, 84(2): 392-399.
- REES, R.A. and HARRELL R.M. 1990. Artificial spawning and fry production of striped bass and hybrids. In: R.M. Harrell, J.H. Kerby R.V. and Minton (editors). *Culture and Propagation of Striped Bass and its Hybrids*. *American Fisheries Society*, pp. 43-72.
- REITH, M., MUNHOLLAND, J., KELLY, J., FINN, R.N. and FYHN, H.J. 2001. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.*, 291: 58-67.

- RETZEK, H., STEYRER, E., SANDERS, E.J., NIMPF, J. and SCHNEIDER, W.J. 1992. Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. *DNA Cell Biol.*, 11: 661-672.
- RODRÍGUEZ, L., ZANUY, S. and CARRILLO, M. 2001. Influence of daylength on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 196: 159-175.
- ROCHA A., ZANUY S., CARRILLO M. and GÓMEZ A. 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *General and Comparative Endocrinology*, 162 (3): 265-275.
- ROMANO, M. and LIMATOLA, E. 2000. Oocyte plasma membrane proteins and the appearance of vitellogenin binding protein during oocyte growth in the lizard *Podarcis sicula*. *Gen. Comp. Encocrinol.*, 118: 383-392.
- ROMANO, M., ROSANOVA, P., ANTEO, C. and LIMATOLA, E. 2004. Vertebrate yolk proteins: A review. *Molecular Reproduction and Development*, 69:109-118.
- RØNNESTAD, I., KOVEN, W.M., TANDLER, A., HAREL, M. and FYHN, H.J. 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 162: 157-170.
- SAWAGUCHI, S., KOYA, Y., YOSHIZAKI, N., OHKUBO, N., ANDOH, T., SULLIVAN, C.V., HIRAMATSU, N., HARA, A. and MATSUBARA, T. 2005a. Multiple Vitellogenins (Vgs) in Mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and Characterization of Three Functional Vg Genes and Their Circulating and Yolk Protein Products. *Biol. Reprod.*, 72 (4) : 1045-1060.
- SAWAGUCHI, S., OHKUBO, N., KOYA, Y. and MATSUBARA, T. 2005b. Incorporation and utilization of multiple forms of vitellogenin and their derivative yolk proteins during vitellogenesis and embryonic development in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zool. Sci.*, 22: 701-710.
- SAWAGUCHI, S., KAGAWA, H., OHKUBO, N., HIRAMATSU, N., SULLIVAN, C.V. and MATSUBARA, T. 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 719-736.
- SAWAGUCHI, S., OHKUBO, N., AMANO, H., HIRAMATSU, N., HARA, A., SULLIVAN, C.V. and MATSUBARA, T. 2008. Controlled accumulation of multiple vitellogenins into oocytes during vitellogenesis in the barfin flounder, *Varasper moseri*. *Cybium, the International Journal of Ichthyology*, 32 (2) suppl.: 262.

- SCHNEIDER, W.J. 1996. Vitellogenin receptors: Oocyte-specific members of the low density lipoprotein receptor supergene family. *International Rev. Cytology*, 166: 103-137.
- SELMAN, K. and WALLACE, R.A. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.*, 6: 211-231.
- SHIMIZU, M., FUJIWARA, Y., FUKADA, H. and HARA, A. 2002. Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of medaka (*Oryzias latipes*) treated with estrogen. *J. Exp. Zool.*, 293: 726-735.
- SIRE, M.F., BABIN, P.J. and VERNIER, J.M. 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. *J. Exp. Zool.*, 269: 69-83.
- SOLA, R.J. and GRIEBENOW, K. 2009. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, 98: 1223-1245.
- SORBERA, L.A., ASTURIANO, J.F., CARRILLO, M., CERDÁ, J., KIME, D.E. and ZANUY, S. 1999. *In vitro* oocyte maturation in the sea bass: effects of hCG, pituitary extract and steroids. *J. Fish Biol.*, 55: 9-25.
- SORBERA, L.A., ASTURIANO, J.F., CARRILLO, M. and ZANUY, S. 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. Reprod.*, 64: 382-389.
- SPECKER, J.L. and SULLIVAN, C.V. 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: K.G. Davey, R.E. Peter, S.S. Tobe (editors). *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council, pp. 304-315.
- STIFANI, S., LE MENN, F., RODRIGUIZ, J.N. and SCHNEIDER, W.J. 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochem Biophys Acta*, 1045: 271-279.
- SUGIYAMA, H., YASUMASU, S., MURATA, K., IUCHI, I. and YAMAGAMI, K. 1998. The third egg envelope subunit in fish: cDNA cloning and analysis, and gene expression. *Dev. Growth Differ.*, 40: 35-45.
- SULLIVAN, C.V., BERLINSKY, D.L. and HODSON, R.G. 1997. Reproduction. In: R.M. Harrell (Editor). *Striped Bass and Other *Morone* Culture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. Volume 30, Chapter 2, pages 11-74.
- THOMPSON, J., HIGGINS, D. and GIBSON, T. 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.

- THORSEN, A. and FYHN, H.J. 1996. Final oocyte maturation in vivo and in vitro in marine fishes with pelagic eggs; yolk protein hydrolysis and free amino acid content. *J. Fish. Biol.*, 48: 1195-1209.
- TIAN, J., KIM, S., HEILIG, E. and RUDERMAN, J.V. 2000. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 97: 14358-14363.
- TINGAUD-SEQUEIRA, A., KNOLL-GELLIDA, A., ANDRÉ, M. and BABIN, P.J. 2011. Vitellogenin expression in white adipose tissue in female teleost fish. *Biol. Reproduction*, 86 (2): 1-11.
- TOKARZ, R.R. 1978. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In: R.E. Jones (editor). *The Vertebrate Ovary*. Plenum Press, New York. pp. 145-179.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitro cellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 4350-4354.
- TRICHET, V., BUISINE, N., MOUCHEL, N., MORAN, P., PENDAS, A.M., Le PENNEC, J.P. and WOLFF, J. 2000. Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. *Mol. Genet.*, 263: 828-837.
- TYLER, C.R. and LUBBERINK, K. 1996. Identification of four ovarian receptor proteins that bind vitellogenin but not other homologous plasma lipoproteins in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Physiol.*, 166B: 11-20.
- TYLER, C.R. and SUMPTER, J.P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 6: 287-318.
- TYLER, C.R., SANTOS, E.M. and PRAT, F. 1999. Unscrambling the egg – cellular, biochemical, molecular and endocrine advances in oogenesis. In: B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson and S.O. Stefansson (editors). *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Edited by Institute of Marine Research and University of Bergen, Bergen, Norway. pp. 273-280.
- VENKATESH, B., TAN, C.H. and LAM, T.J. 1992. Effects of neurohypophyseal and adenohypophyseal hormones, steroids, eicosanoids, and extrafollicular tissue on ovulation in vitro of guppy (*Poecilia reticulata*) embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 87: 20-27.

- WILLIAMS, V.N., READING, B.J., HIRAMATSU, N. and SULLIVAN, C.V. (2011). Characterization of three vitellogenins in striped bass (*Morone saxatilis*). Accession Numbers: HQ846509.1, HQ846510.1, and HQ846511.1 on GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM), US National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA.
- WALLACE, R.A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In: L.W. Browder (editor). *Developmental Biology*, vol. 1 Plenum Press, NY. pp. 122 -177.
- WALLACE, R.A. and BEGOVAC, P.C. 1985. Phosvitins in *Fundulus* oocytes and eggs. Preliminary chromatographic and electrophoretic analyses together with biological considerations. *J. Biol. Chem.*, 260: 11268-11274.
- WALLACE, R.A. and SELMAN, K. 1985. Major protein-changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus* oocytes. *Devl. Bio.*, 110: 492-498.
- WALLACE, R.A. and SELMAN, K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, 16: 175-201.
- WANG, H. and GONG, Z. 1999. Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1446: 156-160.
- WANG, H., YAN, T., TAN, J.T.T. and GONG, Z. 2000. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*, 256: 303-310.
- WANG, H., TAN, J.T.T., EMELYANOV, A., KORZHB, V. and GONG, Z. 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene*, 356: 9-100.
- WEBER, G.M. and SULLIVAN, C.V. 2000. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro final oocyte maturation and ovarian steroidogenesis in striped bass, *Morone saxatilis*. *Biol. Reprod.*, 63: 1049-1057.
- WEBER, G.M. and SULLIVAN, C.V. 2001. In vitro hormone induction of final oocyte maturation in striped bass (*Morone saxatilis*) follicles is inhibited by blockers of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 129B: 467-473.
- WIEGAND, M.D. 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 6: 259-286.

YAMAMURA, J.I., ADACHI, T., AOKI, N., NAKAJIMA, H., NAKAMURA, R. and MATSUDA, T. 1995. Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: The 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-ucu cysteine-rich domain of vitellogenin II. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1244: 384-394.

YOSHIZAKI, G., PATIÑO, R., THOMAS, P., BOLAMBA, D. and CHANG, X. 2001. Effects of maturation-inducing hormone on heterologous gap junctional coupling in ovarian follicles of Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 124: 359-366.

ZHANG, Z., WEN, Z., WASHBURN, M.P. and FLORENS, L. 2010. Refinements to Label Free Proteome Quantitation: How to Deal with Peptides Shared by Multiple Proteins. *Anal. Chem.*, 82: 2272-2281.

ZYBAILOV, B.L., MOSLEY, A.L., SARDIU, M.E., COLEMAN, M.K., FLORENS, L. and WASHBURN, M.P. 2006. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome. Res.*, 5: 2339-2347.

ZYBAILOV, B.L., FLORENS, L. and WASHBURN, M.P. 2007. Quantitative shotgun proteomics using a protease with broad specificity and normalized spectral abundance factors. *Mol. Biosyst.*, 3: 354-360.

<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam> (Erişim tarihi: Şubat 2012)

<http://emboss.bioinformatics.nl/> (Erişim tarihi: Şubat 2012)

<http://www.imtech.res.in/raghava/polyapred/> (Erişim tarihi: Şubat 2012)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> (Erişim tarihi: Şubat 2012)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> (Erişim tarihi: Şubat 2012)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> (Erişim tarihi: Şubat 2012)

<http://www.encorbio.com/protocols/Prot-MW.htm> (Erişim tarihi: Şubat 2012)

ÖZGEÇMİŞ

Özlem YILMAZ 1978 yılında Hatay'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Hatay'da tamamladı. 1996 yılında girdiği Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden 2000 yılında Su Ürünleri Mühendisi olarak mezun oldu. Eylül 2000-Haziran 2004 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. Bu sırada YILMAZ, 2003-2004 eğitim-öğretim yılında kullanılmak üzere Milli Eğitim Bakanlığı aracılığıyla Yunanistan Hükümeti tarafından Türk vatandaşlara verilen, 9 aylık araştırma bursunu kazanarak Yüksek Lisans tez çalışmalarını HCMR (Hellenic Centre for Marine Research, Crete, Greece)'da gerçekleştirdi. Yüksek Lisans eğitimini tamamladıktan sonra, CIHEAM (International Center for Advanced Mediterranean Agronomic Studies) tarafından verilen International Master's in Aquaculture programına katılmak üzere tam burs kazandı. Bu program için tez çalışmalarını IATS (Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Castellon de la Plana, Spain)'da gerçekleştirerek ikinci Yüksek Lisansı'nı 2006 da tamamlayan YILMAZ, 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Mayıs 2007'de aynı anabilim dalında, Araştırma Görevlisi kadrosu aldı. Kasım 2008-Ocak 2009 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Erasmus Öğrenci Değişim Programı kapsamında tez konusu üzerine araştırmalar yapmak üzere, üç ay ICMAN (Instituto de Ciencias Marinas de Andalucia, Cadiz, Spain)'da burslu olarak bulundu. YILMAZ, Kasım 2010-Ocak 2011 tarihleri arasında COST (European Cooperation in Science and Technology) LarvaNet STSM (Short Term Scientific Mission) kapsamında kazandığı üç aylık bursla yine aynı birimde, bilimsel çalışmalar yürütmek üzere bulundu. Kasım 2011'de Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevliliği'nden ayrılan YILMAZ, son olarak Temmuz 2011-Kasım 2012 tarihleri arasında Fulbright Visiting Researcher statüsünde, doktora tez konusu üzerine çalışmalar yürütmek üzere NCSU (North Carolina State University, Raleigh, NC, USA) Biyoloji Bölümü'nde bulunmuştur.