

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BAKTERİYEL ENFEKSİYONLARA KARŞI KAHVERENGİ ALABALIKLARDA  
GEN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Seçil TURGUT**

**EKİM 2017  
TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BAKTERİYEL ENFEKSİYONLARA KARŞI KAHVERENGİ ALABALIKLARDA**  
**GEN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

**Seçil TURGUT**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**“BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ YÜKSEK MÜHENDİSİ”**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.10.2017**  
**Tezin Savunma Tarihi : 23.10.2017**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK**

**Trabzon 2017**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında  
Seçil TURGUT Tarafından Hazırlanan**

**BAKTERİYEL ENFEKSİYONLARA KARŞI KAHVERENGİ ALABALIKLARDA GEN  
EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

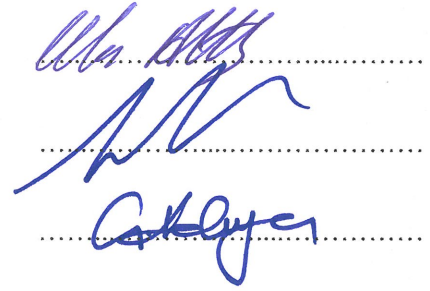
başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 02 / 10 / 2017 gün ve 1721 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof.Dr. İlhan ALTINOK**

**Üye : Prof.Dr. Erol ÇAPKIN**

**Üye : Yrd.Doç.Dr. Gökhan KALAYCI**

  
.....  
.....  
.....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Çalışmanın giderleri TÜBİTAK tarafından desteklenen 214O595 nolu “Anadolu’da dağılım gösteren bazı kahverengi alabalık (*Salmo trutta labrax*, *S. t. fario* ve *S. t. abanticus*) ve hibritlerinin büyüme, gelişme özellikleri ve Mikrosatelit DNA belirteçlerine dayalı parental analizi” adlı projeden karşılanmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasında yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlhan ALTINOK’a, çalışmalarına yardımcı olan Prof. Dr. Erol ÇAPKIN, deney düzeneğinin hazırlanmasında ve örneklemelerdeki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Rafet Çağrı ÖZTÜRK’e ve çalışmamın her aşamasında desteğini hissettiğim aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Seçil TURGUT  
Trabzon 2017

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bakteriyel Enfeksiyonlara Karşı Kahverengi Alabalıklarda Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 23.10.2017

Seçil TURGUT

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Kahverengi Alabalıklar .....	3
1.2.1. Karadeniz Alabalığı ( <i>Salmo trutta labrax</i> , Pallas, 1811).....	3
1.2.2. Aras Alabalığı ( <i>Salmo trutta caspius</i> ).....	4
1.2.3. Abant Alabalığı ( <i>Salmo trutta abanticus</i> , Tortonesse, 1954).....	5
1.3. Bakteriyel Balık Hastalıkları .....	6
1.4. Gen Ekspresyonu .....	7
1.5. RT-PZR ve Evagreen Yöntemi .....	8
1.6. Housekeeping Genler .....	10
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	13
2.1. Materyal.....	15
2.2. Metot .....	16
2.2.1. Balıkların Bakterilerle Enfekte Edilmesi .....	16
2.2.2. RNA İzolasyonu .....	17
2.2.3. cDNA Sentezi.....	18
2.2.4. Real Time PZR.....	18
2.2.5. Rölatif Gen Ekspresyonun Değişimlerinin Hesaplaması .....	19
2.2.6. Hedef Genlerin ve İnternal Kontrol Geninin PZR Etkinliğinin Belirlenmesi.....	19
3. BULGULAR .....	20
3.1. Hastalıklara Karşı Bağışıklık Sistemi Tepkisinin Belirlenmesi .....	20
3.1.1. <i>Lactococcus garvieae</i> .....	20

3.1.2. <i>Yersinia ruckeri</i> .....	25
4. TARTIŞMA.....	32
5. SONUÇ .....	38
6. ÖNERİLER .....	41
7. KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans

ÖZET

BAKTERİYEL ENFEKSİYONLARA KARŞI KAHVERENGİ ALABALIKLARDA  
GEN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ

Seçil TURGUT

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Balıkçılık Teknolojisi Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. İlhan ALTINOK  
2017, 45 Sayfa

Bu çalışmada, kahverengi alabalıkların (*Salmo trutta labrax*, *S. t. caspius* ve *S. t. abanticus*) ve bunların hibritlerinin *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae*'nin sebep oldukları hastalıklara karşı gösterdikleri tepkilerin gen ekspresyonu yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Antioksidan ve bağışıklık sistemi ile alakalı 12 farklı genle [Catalase (*CAT*), Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPx*), Glutathione reductase (*GR*), Cold-inducible RNA-binding protein (*CIRBP*), Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*), Prothymosin alpha 1 (*ProT* alpha 1), Transforming protein RhoA (*RhoA*), Immunoglobulin light chain (*AL*), Major histocompatibility complex class I (*MHC* class I), Hemoglobin subunit beta (*HBB*), Stanniocalcin precursor (*STC*)] birlikte internal kontrol olarakta bata aktin geninin ekspresyonundaki değişimler, Real-Time PZR ile EvaGreen kullanılarak analiz edilmiştir. Balıklar *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra oksidatif stres genleri ve bağışıklık sistemiyle ilgili genlerin rölatif gen ekspresyonu bazen artış bazen de azalış göstermesine rağmen, genel olarak CC grubu dışında ki gruplarda 14. günden sonra rölatif gen ekspresyonu azalmıştır. *Lactococcus garvieae* enfeksiyonuna en fazla tepki veren CC grubu olmasına rağmen *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı ise en az tepki veren grup olduğu tespit edilmiştir. Balıklarda görülen gen ekspresyonu farklılıkları balıklara ve hastalık etkenine göre farklılıklar göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kahverengi Alabalık, Hibrit, Gen Ekspresyonu, RT-PZR.



Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF BROWN TROUT GENE EXPRESSION AFTER BACTERIAL  
INFECTION

Seçil TURGUT

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Fisheries Technology Program

Supervisor: Prof. Dr. İlhan ALTINOK

2017, 45 Pages

In the present study, brown trout species (*Salmo trutta labrax*, *S. t. caspius* and *S. t. abanticus*) and their hybrids were exposed to *Yersinia ruckeri* causative agent of yersiniosis disease and *Lactococcus garvieae* causes lactococcosis diseases to test antioxidant and immune related genes expression. For this purpose, Catalase (*CAT*), Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPx*), Glutathione reductase (*GR*), Cold-inducible RNA-binding protein (*CIRBP*), Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*), Prothymosin alpha 1 (*ProT* alpha 1), Transforming protein RhoA (*RhoA*), Immunoglobulin light chain (*AL*), Major histocompatibility complex class I (*MHC* class I), Hemoglobin subunit beta (*HBB*) and Stanniocalcin precursor (*STC*) gene of the fish were tested with EvaGreen based real-time PCR. After exposing fish to *L. garvieae*, oxidative stress genes and immunity related genes relative gene expression sometime down-regulated and sometime up-regulated in 14 days of post exposure (dpe). Furthermore, all relative gene expressions were downregulated after 14 dpe in all fish groups except *S. t. caspius* (CC). Although CC one of the most reacted fish after infecting with *L. garvieae*, *Y. ruckeri* infected CC was the least affected group. Therefore, gene expression was depending on fish and pathogenic bacteria.

**Key Word:** Brown Trout, Hybrid, Gene Expression, RT-PCR.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Salmo trutta labrax</i> .....	4
Şekil 2. <i>Salmo trutta caspius</i> .....	5
Şekil 3. <i>Salmo trutta abanticus</i> .....	5
Şekil 4. EvaGreen® boyası "isteğe bağlı bırakma" mekanizması ile çift zincirli DNA bağlanma mekanizması .....	9
Şekil 5. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>CAT</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	21
Şekil 6. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>SOD</i> (A) ve <i>GPx</i> (B) genlerinin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	21
Şekil 7. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>GR</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	22
Şekil 8. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>CDKN2A</i> (A), <i>CIRBP</i> (B), <i>HBB</i> (C) ve <i>RhoA</i> (D) genlerinin zamana bağlı rölatif ekspresyonu .....	22
Şekil 9. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>AL</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	23
Şekil 10. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>MHC</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu .....	23
Şekil 11. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>ProT</i> alpha 1 geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu .....	24
Şekil 12. Balıkların <i>L. garvieae</i> ile enfekte edildikten sonra <i>STC</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	24
Şekil 13. Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>CAT</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	25
Şekil 14. Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>SOD</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	26
Şekil 15. Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>GPx</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	26
Şekil 16. Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>GR</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	27
Şekil 17. Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>CDKN2A</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu .....	27
Şekil 18. Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>CIRBP</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu .....	28
Şekil 19. Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>HBB</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	28

Şekil 20.	Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>RhoA</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	29
Şekil 21.	Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>AL</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	29
Şekil 22.	Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>MHC</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	30
Şekil 23.	Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>ProT</i> alpha1 geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu .....	31
Şekil 24.	Balıkların <i>Y. ruckeri</i> ile enfekte edildikten sonra <i>STC</i> geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu.....	31



## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. <i>Salmo trutta labrax</i> (L), <i>S. t. caspius</i> (C), <i>S. t. abanticus</i> (A) türlerinin çaprazlanmasıyla elde edilen gruplar.....	15
Tablo 2. <i>Salmo trutta labrax</i> (L), <i>S. t. caspius</i> (C), <i>S. t. abanticus</i> (A) türlerine ait balıkların ortalama boy ve ağırlıkları .....	17
Tablo 3. Gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılan genlere ait primerler, genin GenBank'taki kodu ve primerlerin baz dizilimi .....	18



## SEMBOLLER DİZİNİ

<b>ABI</b>	: Aplied Biosystems
<b>AL</b>	: Immunoglobulin Light Chain
<b>APPs</b>	: Acute Phase Proteins
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>Cd</b>	: Kadmiyum
<b>cDNA</b>	: Komplementer (Tamamlayıcı) DNA
<b>CDKN2A</b>	: Cylin Dependent Kinase Inhibitör 2A
<b>CFU</b>	: Colony Forming Unit
<b>CIRBP</b>	: Cold İnducible RNA Binding Protein
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>C<sub>T</sub></b>	: Treshold cycle
<b>Cu</b>	: Bakır
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiriboz Nükleik Asit
<b>E</b>	: Amplifikasyon etkinliği
<b>ERM</b>	: Enterik Kızılğız Hastalığı
<b>GP<sub>x</sub></b>	: Glutathione Peroxidaz x
<b>gr</b>	: Gram
<b>GR</b>	: Glutathione Peroxidaz
<b>HBB</b>	: Hemogloblin Subunit Beta
<b>HMR</b>	: Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi
<b>HSB</b>	: Hemoglobin Subunit Beta
<b>IGF-1</b>	: Insulin-Like Growth Factor-1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: Interleukin 1 Beta
<b>m</b>	: Metre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>MHC class 1</b>	: Major Histocompatibility Complex Class1
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mRNA</b>	: Messenger RNA
<b>MT</b>	: Metallathionein

<b>ng</b>	: Nanogram
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>Prot alpha1</b>	: Prothymosin alpha
<b>RhoA</b>	: Transformin protein RhoA
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>RT-RZR</b>	: Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>s</b>	: Saat
<b>SAA</b>	: Serum Amyloid A
<b>sn</b>	: Saniye
<b>SOD</b>	: Superoksit Dismutaz
<b>STC</b>	: Staniocalcin Precursor
<b>TE</b>	: Tris EDTA
<b>TLR5</b>	: Toll-Like Receptor 5
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	: Tumor Necrosis Factor Alpha
<b>tRNA</b>	: Taşıyıcı RNA
<b>vd.</b>	: ve diğerleri
<b>Zn</b>	: Çinko
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b><math>\mu</math></b>	: Mikron
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b>%</b>	: Yüzde
<b>AA</b>	: <i>Salmo trutta abanticus</i> x <i>Salmo trutta abanticus</i>
<b>AC</b>	: <i>Salmo trutta abanticus</i> x <i>Salmo trutta caspius</i>
<b>CC</b>	: <i>Salmo trutta caspius</i> x <i>Salmo trutta caspius</i>
<b>LA</b>	: <i>Salmo trutta labrax</i> x <i>Salmo trutta abanticus</i>
<b>LC</b>	: <i>Salmo trutta labrax</i> x <i>Salmo trutta caspius</i>
<b>LL</b>	: <i>Salmo trutta labrax</i> x <i>Salmo trutta labrax</i>

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Su ürünleri dünyada ve ülkemizde insan beslenmesinde önemli bir protein kaynağı oluşturmaktadır. Artan dünya nüfusunun su ürünlerine olan talebini karşılamada sürdürülebilirliği sağlamak için ülkeler su ürünleri yetiştiriciliğine daha fazla önem verir hale gelmiştir (Şahin, 2003). Su ürünleri üretimi arttıkça balıklarda görülen bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıkların oranında da artış olmaktadır. Yetiştiricilikte optimum koşullar sağlanarak kaliteli üretim yapılabilir. Balık sağlığının önemi, balıkçılık biliminde çalışan profesyonellerle sınırlı değildir. Filogenetik bir bakış açısıyla nispeten basit bir sisteme sahip oldukları için omurgalı bağışıklık sistemini incelemek için balıklar iyi bir model oluşturmaktadır (Iwama ve Nakanishi, 1996).

Koruyucu önlemler olarak balıkları hastalıklara karşı korumak, hastalığın tedavisinden daha ucuz ve kaliteli üretime olanak sağlayacaktır. Balıklarda bağışıklık sistemi, enfeksiyonun meydana gelmesini engelleyen ve enfeksiyona karşı vücudun direnç göstermesini sağlayan faktörlerin birçoğunu içermektedir (Altınterim, 2011).

Hastalık etkenlerinin yoğun olarak bulunabileceği su ortamında bulunan balıklar güçlü bağışıklık sistemleri sayesinde hastalıklardan korunur. Balıkların bağışıklık sistemleri memelilerin bağışıklık sistemlerine benzemektedir. İmmün organ ve hücrelerin çoğu aynı yapı ve işleve sahiptir. Fakat sıcak kanlıların aksine balıkların içinde yaşadığı sucul ortamın sahip olduğu fiziksel (sıcaklık, pH, çözülmüş O<sub>2</sub>) ve kimyasal özellikler, balığın bağışıklık sistemi üzerinde etkilidir (Altınterim, 2011). Balıkların hastalıklara karşı korunmak için doğuştan gelen (spesifik olmayan) bağışıklık ve edinsel (spesifik) bağışıklık mekanizmaları vardır (Ellis, 1998).

Doğal immunité: Omurgalılar, omurgasızlar hatta bitkiler gibi tüm çok hücreli canlılar, evrimleri sürecinde, mikroorganizmaların yol açacağı enfeksiyonlara karşı kendilerini korumak ve zedelenmiş ya da nekroza uğramış hücrelerden arınmak amacıyla savunma mekanizmaları geliştirirler. İlk olarak geliştirdikleri savunma sistemi organizmalarda doğal olarak var olan, mikropları ve ölü hücreleri tanımaya ve uzaklaştırmaya hazır durumdaki yapılardır. Bundan dolayı bu konak savunma mekanizmalarına doğal bağışıklık adı verilmektedir. Doğal bağışıklığı oluşturan tüm

hücreler ve moleküller doğal immün sistemi oluştururlar. Doğal bağışıklık, enfeksiyonlara karşı konağın savunmasındaki ilk kritik basamağı oluşturur (Abbas vd., 2015).

Edinsel immunité: Antikorların içinde yer aldığı humoral sistem ile T ve B lenfositlerinin yer aldığı hücrel sistem olarak tanımlanabilir. Edinsel bağışıklık sistemi yaşam boyu gelişimini sürdürür, farklı patojenlere ve maddelere özelmş gibi yanıt verir ayrıca antijene spesifik olmasının yanında hafıza oluşturması gibi iki temel özelliğı barındırır. Bu sistem bir antijen ile tekrar karşılaştığında hafızası olduğundan onu tanıyacak ve daha güçlü bir şekilde yanıt verecek özelliğı sahiptir (Anonim, 2017a).

Doğal bağışıklık sistemi, omurgasızların tek savunma silahı ve balıkların ise temel savunma mekanizmasıdır. Doğuştan olan sistem aynı zamanda edinsel bağışıklık tepkisinde ve homestasisde öğretici bir rol oynar ve aynı zamanda bu bağışıklık yüksek omurgalılarda da eşit derecede önemlidir (Magnadottir, 2006).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde istenen sonucun elde edilmesi; yetiştiriciliğı yapılan türün tüm üretim döngüsünün kontrol edilebilmesi, anaç bireylerin iyi bir genetik yapıya sahip olması, hastalıkların etkili bir şekilde kontrolü ve bulaşmanın önlenmesi, büyüme ve gelişme için optimal fizyolojik, çevresel, beslenme koşullarının bilinmesi, üretimin yapıldığı ortama kaliteli ve yeterli su temin edilmesi, yenilikçi yönetim tekniklerinin uygulanmasına bağlıdır. Bu faktörlerin geliştirilmesi ve uygulanması sayesinde su ürünleri yetiştiriciliğı son yıllarda oldukça iyi bir gelişme kaydetmiştir.

Canlı organizmaları kullanarak ürünleri, bitki ve hayvanları değiştiren, farklı ürünler, bitki ve hayvanlar üreten bir teknik olan biyoteknoloji; 1970'li yılların sonunda genetik mühendislik, hücre kültürü ve hücre füzyonu alanlarında sağlanan gelişmelerin sonucunda yeni bir endüstri olarak ortaya çıkmış, tarımsal alanda “yeşil devrim” olarak adlandırılan değişimi gerçekleştirmede en büyük etken olmuştur (Şahin, 2003).

Biyoteknoloji kullanımının yaygın şekli, hibridizasyon, tek cins ve steril (triploid) balık üretmede kullanılan genetik manipülasyonlardır. Hibridasyon, farklı cins ve türlerin eşleştirilmesi ile yeni bireyler elde edilmesidir. Balık yetiştiricileri tarafından bu tekniğın uygulanmasındaki ana amaç, üstün özelliklerin (çevresel şartlara uygunluk, büyüme, yem değerlendirme, hastalıklara direnç, yüksek et verimi, vb.) ön plana çıkarıldığı bireylerin üretilmesidir. Yaygın olarak yavrular, ebeveynlerine göre daha iyi karakterler göstermektedir (Bartley vd., 2001). Hibridasyon üzerine ilk yapılan çalışmalar çoğunlukla Salmonidler üzerinedir, ancak bu türler yetiştiricilik açısından ticari avantaj



sağlayamamıştır. Ancak ilerleyen biyoteknolojik teknikler sayesinde bu türlerin öne çıkan özellikleri üzerine çalışmalar sürmektedir (Başçınar ve Delihasan Sonay, 2009).

Bu çalışmada, kahverengi alabalıkların (*Salmo trutta labrax*, *S. t. caspius* ve *S. t. abanticus*) ve bunların hibritlerinin *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* etkenlerinin sebep oldukları hastalıklara karşı gösterdikleri tepkilerin gen ekspresyonu yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 1.2. Kahverengi Alabalıklar

Kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) somon, kaynak/Alp alası ve diğer alabalık türleri gibi *Salmonidae* familyasına dahil bir türdür. Yüksek derecede polipolik tür olduğu düşünülür. Bu nedenle ekolojik ve fenotipik farklılıklarına bağlı olarak önceleri değişik türler, alt türler ve morflar altında sınıflandırılmıştır. *Salmonidae* ailesinin diğer bireyleri gibi, kahverengi alabalıklar da anadrom (deniz alası) ve anadrom olmayan formlara sahiptir.

Kahverengi alabalık, paleoartik bölgenin doğasında en fazla dağılım gösteren tatlı su balığıdır. Doğal olarak çok farklı ve uzak formları Avrupa, Orta Asya, Batı Asya ve Kuzey Afrika'nın bir kısmında gözlenir. Kuzeyden güneye balığın dağılımı Kuzey-Doğu Rusya ve Kuzey Norveç'ten Kuzey Afrika'nın Atlas Dağlarına kadar yayılım gösterir. Batıdan doğuya dağılımı İzlanda'dan Afganistan'daki Aral Denizi'ne dökülen sulara kadar uzanır. Dünyanın birçok bölgesine götürülerek aşılama yapılmıştır. Ülkemizde hemen her akarsuda kaynağa yakın kirlenmemiş bölgelerde dağılım göstermektedir (Çakmak ve Aksungur, 2010).

### 1.2.1. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*, Pallas, 1811)

Ülkemizdeki doğal yayılım alanı, sadece Karadeniz bölgesinde ve Karadeniz'e dökülen akarsulardır. Preoperkulum üzerindeki deri içindeki gizlenmiş gümüşü gri benek, bu ekotip için karakteristiktir. Vücutları üzerinde düzensiz siyah beneklerin bulunuşu ve kırmızı ve siyah beneklerin etrafında belirgin beyaz halkaların olmasıyla diğer alt türlerden ayırt edilebilir. Diğer ekotiplere nazaran daha büyük hacimli ve tıknaz bir vücuda sahiptirler. Balık büyüdükçe vücut sırta ve karın kısmına doğru şişkinlik yapmaz.

Ülkemizdeki en fazla büyüyen formu bu ekotipte olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Kocabaş, 2009).

Cinsi olgunluk yaşı 3-4 yaşında olup, kış aylarında Karadeniz'e akan tatlı sulara girerek akarsuyun yukarı kısımlarında yumurtalarını kumlara ya da çakıllar arasında açtıkları yuvalara bırakırlar. Yumurtadan çıkan yavrular bir yıl kadar tatlı suda kaldıktan sonra denizlere göçerler (Çelikkale, 2002).



Şekil 1. *Salmo trutta labrax*

### 1.2.2. Aras Alabalığı (*Salmo trutta caspius*)

Aras alabalığı veya Kafkas alası yurdumuzun Kuzey Doğu ve Doğu Anadolu bölgesindeki nehir ve akarsularda bulunur. Kuzey menşeli bir balıktır. Aras nehri ve çevresindeki ırmaklarda bol miktarda mevcuttur (Çelikkale, 2002). Kırmızı benekler yan çizgi boyunca ve üçlü sıralı baştan kuyruğa doğru şekilsiz ve halesiz olarak yayılmıştır. Solungaç kapağının ön tarafı üzerinde benek mevcuttur. Vücut koyu renkli olup, vücudun ön tarafı ve baş üzerinde koyu benekler bulunur. Sırt yüzgecinde de benekler vardır. Kuyruk yüzgeci çatallıdır. Diğer ekotiplerine nazaran renkleri daha koyu ve esmerdirler. İran kaynaklarında Hazar gölü ve buraya bağlantılı akarsulara girdiği ve 200 km'den fazla üreme göçü yapabildiği ve 50 kg'a kadar büyüebildiği rapor edilmesine rağmen, ülkemizde yakalanan bireylerin çok daha küçük bireylerden oluştuğu tespit edilmiştir (Kocabaş, 2009).



Şekil 2. *Salmo trutta caspius*

### 1.2.3. Abant Alabalığı (*Salmo trutta abanticus*, Tortonesse, 1954)

Abant alabalığı (*Salmo trutta abanticus*) yurdumuzda yalnız Abant gölünde, Yedigöller ve civarındaki derelerde bulunan, genel özellikleri bakımından dere alabalığına benzeyen, aslında dere alabalığının Abant gölünde izole olmuş bir varyetesidir (Çelikkale, 2002). İnsan eliyle Almus Baraj Gölü'ne de (Tokat) aşılannmış bir stoku mevcuttur (Kocabaş, 2009).

Abant alabalığı diğer türlere benzese de vücudunun yan taraflarında kırmızı benekler kuyruğa yakın bölgede birkaç tane ya da hiç bulunmayabilir. Vücudu daha kaba ve burun daha kısa ve küttür. Maksimum ağırlıkları 1500 grama ve ortalama ağırlıkları 300 grama ulaşabilir (Kocabaş, 2009).



Şekil 3. *Salmo trutta abanticus*

### 1.3. Bakteriyel Balık Hastalıkları

Balık yetiştiriciliği, sağlıklı bir besin kaynağı, istihdam ve önemli bir ihraç ürünü durumu olması nedeniyle, büyük kazanç geliri olan önemli bir sektördür. Balık hastalıkları, yetiştiricilikte önemli bir sorun oluşturmaktadır (Önalın vd., 2016).

Balıklarda aquatik ortam şartlarının bozulması ve strese maruz kalmasına bağlı olarak fizyolojik yapılarının bozulması sonucunda hastalık meydana gelmektedir. Bu hastalıklar etkenine göre değişiklik göstermektedir (Balta, 2016). Balıklarda ve kabuklu deniz hayvanlarında hastalık yapabilen çok sayıda bakteri türü vardır. Bu bakterilerin birçoğu çok iyi bilinirken bazı bakteriler hakkında yeterli bilgi yoktur (Snieszko, 1978).

Bakteriler su ortamında çok yaygındır. Çoğu bakteriyel hastalık etmenleri, suyun normal florasının bir parçasıdır. Kötü çevre koşulları, yetersiz diyet ve uygun olmayan yetiştirme teknikleri balıklarda bakteriyel hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Tendencia ve Lavilla-Pitogo, 2004). Bu yüzden patojenik bakterilerin virulans mekanizmalarını anlamak çok önemlidir çünkü konakçı-patojen etkileşiminin doğasının bilincine varmak kontrol önlemlerinin ve özellikle aşıların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Ka Yin, 2004).

Bakteriyel balık hastalıklarına etken olan *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* türleri ülkemizde alabalıklarda en fazla görülen iki hastalığın etkenidir. *Y. ruckeri* ilk kez 1950'lerin başında ABD'nin İdoha eyaletinde bulunan Hagerman Vadisi'nde izole edildi. Daha sonra 1966 yılında Ross ve arkadaşları ve Rucker tarafından tam olarak tanımlanmıştır (Woo ve Bruno, 1999). Hastalığın daha sonra Kanada, Danimarka, İngiltere, Fransa, Almanya, İtalya, Norveç, Avusturalya, Yunanistan ve Türkiye'ye yayılarak salmonid balıklarda ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003). Enterik kızıl ağız (ERM) ya da yersiniosis hastalığı, Gram-negatif, hafif kıvrık, 1.0 x 2.0-3.0 µm büyüklüğünde enterik bir bakteri olan *Y. ruckeri*'nin neden olduğu akut veya kronik bir enfeksiyondur. Taşıyıcı durumda birçok balık türünde mevcuttur ve yetiştiricilikte özellikle yoğun kültür, kötü su kalitesi ve stres ile ilişkili olarak ortaya çıkar. Acil müdahale gerektirilen bu hastalık ağır kayıplara neden olmaktadır (Woo ve Bruno, 1999).

*Lactococcus garvieae* ise ilk kez 1950'lerin sonunda Japonya'da sarıkuyruk balıklarından izole edilerek tanımlanmıştır. O zamandan beri *L. garvieae* giderek çok fazla ülkeye yayılmış ve farklı balık türlerini etkilemiştir (Ferrario vd., 2013). Çiftlik balıklarına

ek olarak kabuklu su ürünlerini ve deniz memelilerinde de *L. garvieae*'ya rastlanmıştır. *Lactococcus garvieae*'nin konakçı aralığı sudaki canlılar ile sınırlı değildir (Aguado-Urda vd., 2010). Türkiye'de ise *L. garvieae* ilk kez 2001 yılında Ege bölgesinde gökkuşağı alabalıklarında gözlemlenmiş (Didinen vd., 2014) ve sonraki yıllarda birçok bölgeye yayılmıştır (Öztürk ve Altınok, 2014). *Lactococcus garvieae*; Gram-pozitif, fakültatif anaerobik, hareketsiz, katalaz ve oksidaz negatif, çift veya kısa zincirler halinde büyüyen laktik asit üreten bir bakteri olarak tanımlanmıştır (Hirakawa vd., 2011; Austin ve Austin, 2013). Sarıkuyruk ve alabalık gibi balıklarda ölümcül hemorojik septisemiye neden olan önemli bir balık patojenidir (Morita vd., 2011). *Lactococcus garvieae*'nin neden olduğu enfeksiyonlar genellikle yüksek morbidite ve mortaliteye neden olur ve çiftlik balıklarında uzun süre devam eder (Didinen vd., 2014).

#### 1.4. Gen Ekspresyonu

30 yıl önce ilk ökaryotik genin bulunmasından bu zamana kadar binlerce ökaryotik gen izole edildi. Halen devam etmekte olan genom projeleri, çok çeşitli organizmalarda genomun tüm unsurlarının tanımlanmasına öncülük etti. Yeni bir genin klonlanmasından sonraki adım, genin yapısını, ekspresyonunun nasıl regüle edildiğini ve kodlanan gen ürününün biyolojik fonksiyonlarını belirlemektir. Gen ekspresyonu (ifadesi), genlerde kodlanan genetik bilgiden fonksiyonel bir protein ya da RNA üretimidir. Gen ifadesi, en yaygın anlamıyla, hem transkripsiyon hem de translasyonu kapsayan bir terimdir, fakat sıklıkla sadece transkripsiyon sürecini ifade etmek için kullanılır (Allison, 2014). DNA'da saklanan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) sentezi suretiyle kopyalanması veya yazılmasına transkripsiyon adı verilir. Transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan, bir protein molekülüne ait genetik bilgilerin okunması veya bir protein molekülü haline çevrilmesine translasyon adı verilir. Transkripsiyon ve translasyon olaylarının toplamı, gen ekspresyonu olarak tanımlanır (İşler, 2012).

Gen ekspresyonu tek bir hücreden çok hücreli bir organizmanın gelişimini regüle eden ve normal bir hücreyi kanser hücresinden ya da bir deri hücresini karaciğer hücresinden ayıran genlerin ifade farklılığıdır (Allison, 2014). Yani gen ekspresyonunun genel ölçüm amacı karşılaştırmadır. Farklı hücrelerdeki mRNA düzeylerini karşılaştırma, bir organdaki tümör hücresiyle normal bir hücrenin karşılaştırılması gibi amaçlar ile yapılmaktadır (Ulutaş, 2015).

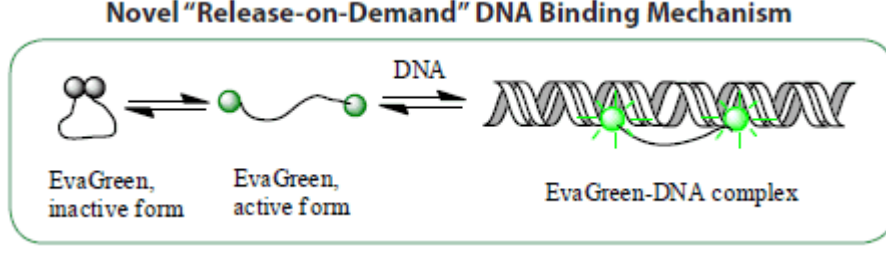
### 1.5. RT-PZR ve Evagreen Yöntemi

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR), Kary Mullis tarafından 1980'lerde geliştirilen, araştırmacıların belirli DNA parçalarını bir milyondan fazla arttırabilen devrimci PZR yöntemine dayanmaktadır (Valsek ve Repa, 2005).

Real-time PZR teknolojisi ilk olarak Higuchi ve arkadaşlarının her amplifikasyon ürününü etidyum bromür ile görüntülemek için oluşturdukları sistem ile ortaya çıkmıştır (Higuchi vd., 1992). Bu teknoloji floresan işaretli ya da boyalı PZR ürünlerinin, ışık kaynağının oluşturduğu ışımlar ile uyarılması sonucu ışımaya yayması ve yaydığı ışımaların algılanarak izlenebilir hale getirilmesi ile oluşan bir sistemdir. PZR'ın kinetik kazanması ile oluşan bu teknolojinin PZR'dan en önemli farkı hedef bölgenin lineer olarak logaritmik artışının eş zamanlı olarak gözlenebilmesi ve buna bağlı olarak kantitatif analiz yapabilme imkanı sunmasıdır (Valsek ve Repa, 2005). PZR karışımında floresan olarak işaretlenen primerlerle ya da floresan boyaların bağlanması ile PZR ürünlerinin real-time (gerçek zamanlı=anlık) ölçümü yapılabilir. Orijinal mRNA'nın miktarının oldukça hassas ve doğru olarak ölçülmesini sağlar. Bu yaklaşım, kantitatif real-time PZR ya da real-time PZR olarak adlandırılır (Allison, 2014). Gerçek zamanlı PZR'nin amacı, örnek çok küçük bir miktar olsa bile örnekteki belirli nükleik asit sekanslarını tam olarak ayırt etmek ve ölçmektir. Gerçek zamanlı PZR, bir numunede hedef sekansı çoğaltır ve ardından floresan teknolojisini kullanarak amplifikasyonun ilerlemesini monitörüne eder (Valsek ve Repa, 2005). Gerçek zamanlı PZR testleri amplifikasyon sonrası manipülasyona ihtiyaç duyulmadığından hızla tamamlanabilir. Gerçek zamanlı prob algılama ile amplifikasyon ürünlerinin tanımlanması, jeller üzerinde boyut analizi ile karşılaştırıldığında oldukça doğrudur. Reaksiyonun ilerlemesinin analizi, uygun standartların mevcut olması koşuluyla hedef dizinin çok geniş aralıkta dinamik doğru şekilde ölçülmesini sağlar.

Gerçek zamanlı PZR kavramının biyolojik bilimlerin birçok dalında uygulamaları bulunmuştur. Uygulamalar arasında gen ekspresyonu analizi, bulaşıcı hastalıkların teşhisi ve insan genetik testi yer alır (Logan vd., 2009).

EvaGreen<sup>®</sup> boya, kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR) ve diğer pek çok uygulamada kullanım için ideal özellikleri olan yeni nesil DNA bağlayıcı bir boyadır. EvaGreen, SYBR<sup>®</sup> Green I ve diğer ticari PZR veya yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM) boylarından daha etkin özelliğe sahiptir.



Şekil 4. EvaGreen® boyası "isteğe bağlı bırakma" mekanizması ile çift zincirli DNA bağlanma mekanizması

EvaGreen toksik ve mutajenik değildir. Maksimum sinyal ve yüksek çözünürlüklü DNA erime analizi için doygunluk boya konsantrasyonunun kullanılmasına izin veren düşük PZR inhibisyonuna sahiptir.

**PZR Performansı:** Bir PZR boya-DNA kompleksi oluşturarak floresan yayar. DNA ile etkileşim kaçınılmaz olarak bazı PZR girişimine yol açar. Boya ile PZR inhibisyonu, DNA-boya oranı yüksek olduğunda PZR'nın erken safhasında özellikle ciddi olabilir. Öte yandan iyi bir sinyal üretmek için yeterli bir boya konsantrasyonu önemlidir. Bu nedenle, güvenilir PZR performansı elde etmek için optimal bir boya konsantrasyonu kullanılmalıdır.

SYBR® Green I gibi mevcut DNA bağlayıcı PZR boyaları için optimum boya konsantrasyonu oldukça düşük olabilir bu da PZR sinyalini sınırlar ve aynı zamanda yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM) analizi için boyaları uygunsuz hale getirir. Bir master karışımı ile düşük SYBR® Green konsantrasyonu küçük amplikasyondan büyük amplikasyona erime zirvesine doğru boya göçü çoklu amplifikasyonu belirlemekte başarısız olabilir, PZR için temiz tek bir amplikon yerine yanlış sonuç verebilir gerçekte birkaç ürün üretebilir.

EvaGreen® DNA bağlayıcı boya "talep üzerine serbest bırakma" mekanizması yoluyla yeni bir DNA bağlama kavramı kullanılarak tasarlanmıştır (Şekil 4). Boya, esnek bir ara parçası ile bağlanan iki monomerik DNA bağlayıcı boyadan oluşur. DNA yokluğunda, dimerik boya, DNA bağlanmasında pasif olan dögüsel bir konformasyon varsayar. DNA mevcut olduğunda, dögüsel konformasyon bir denge vasıtasıyla floresans yaymak için DNA'ya bağlanabilen rastgele bir konformasyona geçer. Bu kimyasal denge, bir PZR işlemi sırasında daha fazla DNA oluştuğundan, "rezerv" den aktif formdaki boyayı sürekli olarak tedarik etmek için benzersiz bir mekanizma sağlar. Sonuç olarak, EvaGreen® master karışımı, PZR inhibisyonu olmaksızın floresans sinyalini en üst düzeye çıkarmak

için nispeten yüksek boya konsantrasyonu ile formüle edilebilir, bu karışım hem qPZR hem de HRM amplikasyonu için uygundur.

PZR ana karışımlarının taşınması ve bertaraf edilmesi, sağlık ve çevre meselesi olabilir. Nitekim SYBR<sup>®</sup> Green I, bilinen en iyi mutajenlerden biri olan etidyum bromüre göre daha çevreye zararlıdır. SYBR<sup>®</sup> Green I'in hücrelerdeki DNA tamir mekanizmalarına müdahale etmesi ve sonuçta UV ışığı ile DNA hasarının yanı sıra kimyasalların genotoksitesini de güçlendirdi.

Diğer PZR ve HRM boyalarında (örneğin SYTO9, LC Green, BRYT Green ve ResoLight) emniyet verileri bulunmamakla birlikte, bu boyaların bir kaç dakika içinde hücrelere girdiği bilinmektedir ve bu nedenle potansiyel genotoksite riski taşır. EvaGreen<sup>®</sup> boyası, canlı hücrelerde genomik DNA ile etkileşime girmediğinden diğer boyalara göre daha güvenlidir (Anonim, 2017b).

## 1.6. Housekeeping Genler

Bir hücrenin temel işlevsel ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan, hücrelerin tümünde ekspres olan ve ekspresyon seviyesi dokudan dokuya değişmeyen genlere housekeeping genler adı verilir (Yüzbaşıoğlu, 2008). Bu genler, nükleik asit ve protein sentezi, besinlerin taşınması ve kullanımı, hücresel iskeletin ve organellerin biosentezi gibi temel hücresel ve metabolik işlevler için gereklidir. Housekeeping genler hücrenin işleyişini düzenleyen genler olarak da ifade edilmektedir. Bu housekeeping genler sürekli eksprese olarak belli bir hücredeki gen ekspresyonunun %80-90'ından sorumlu olabilirler (Nussbaum vd., 2006).

Beta actin; hücre göçü, hücre bölünmesi ve gen ifadesinin düzenlenmesi de dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçlerde kritik rolleri olan hücre iskeletinin vazgeçilmez bir bileşenidir (Bunnell vd., 2011). Bu işlevler, hücrenin ihtiyaçlarına göre hızlı bir şekilde toplanabilen ve parçalanabilen filamentler oluşturan aktin yeteneğine atfedilir (Anonim, 2017c).

Hemoglobin subunit beta (*HBB*); protein kodlayıcı bir genidir. Metabolizma ve bağışıklık sistemi ile ilgisi vardır. Bu gen demir iyonunu ve oksijeni bağlamaktadır.

Katalaz (*CAT*); bu gen oksidatif strese karşı vücut savunmasında anahtar bir antioksidan enzim olan katalazı kodlamaktadır. Katalaz neredeyse tüm aerobik hücrelerin



peroksizomunda bulunan bir enzimdir. Katalaz reaktif oksijen tüpündeki hidrojen peroksidi suya ve oksijene dönüştürür ve böylece hidrojen peroksidin toksik etkilerini hafifletir.

Glutathione peroksidaz (*GPx*); bu gen tarafından kodlanan gen glutathione peroksidaz ailesine aittir ve glutathione ile organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksidin indirgenmesini katalize etmektedir ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır.

Cylin dependent kinaz inhibitör 2A (*CDKN2A*); bu gen, ilk eksonlarda farklı olan birçok varyant üretir. Bu gen sıklıkla çok çeşitli tümörlerde mutasyon geçirir veya silinir. Önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak bilinir.

Superoksit dismutaz (*SOD*); bu gen tarafından kodlanan protein bakır ve çinko iyonlarını bağlar ve vücutta serbest süperoksit radikallerinin yok edilmesinden sorumlu olan iki izozimden biridir. Normal olarak hücrelerde üretilen ve biyolojik sistemlere toksik olan radikalleri yok etmektedir.

Cold inducible RNA binding protein (*CIRBP*); hücrenin hayatta kalmasında yer alan genlerin kopyalarını stabilize ederek genotoksik stres tepkisinde koruyucu bir rol oynamaktadır. Bir translasyonel aktivatördür. Soğuğa bağlı hücre çoğalmasının bastırılmasında rol oynamaktadır.

Prothymosin alpha (*ProT* alpha 1); proteini kodlayan bir gendir. Belirli fırsatçı enfeksiyonlara karşı direnç göstererek bağışıklık fonksiyonuna ara buluculuk etmektedir.

Staniocalcin precursor (*STC*); bu gen, çok çeşitli dokularda eksprese olan ve otokrin veya parakrin fonksiyonlara sahip olabilen, salgılanmış, homodimerik bir glikoproteini kodlar.

Transformin protein RhoA (*RhoA*); Rho proteinleri aktin sitoskeletonunun yeniden düzenlenmesini teşvik eder ve hücre şekli, bağlanma ve hareketliliği düzenler. Bu genin aşırı ekspresyonu, tümör hücresi çoğalması ve metastaz ile ilişkilidir.

Immunoglobulin light chain (*AL*); antikor olarak da bilinen immünoglobülin, B lenfositleri tarafından üretilen membrana bağlı veya salgılanan glikoproteinlerdir. Hümmoral bağışıklığın tanıma aşamasında, zar-bağlanmış immünoglobülinler, spesifik bir antijen bağlandığında, B lenfositlerinin immünoglobülin S salgılayan plazma hücrelerine klonal genleşmesi ve farklılaşmasını tetikleyen reseptörler olarak görev yaparlar. Salgılanan immünoglobülinler humoral bağışıklığın efektör fazına aracılık eder ve bu da bağlanmış antijenlerin ortadan kaldırılmasına yol açar.

Major histocompatibility complex class I (*MHC class I*); sınıf I molekülleri, endoplazmik retikulum lümeninden türetilen peptidleri sunarak bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynar. Neredeyse tüm hücrelerde ekspres edilirler (Anonim, 2017c).

Glutathione reductaz (*GR*); kırmızı hücre enzimleri ve biyolojik hücre zarlarını, aerobik glikoliz sürecinde indirgenmiş glutathione (*GSSGR*) seviyesini arttırarak oksidatif hasara karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır (Anonim, 2017d).

Kantitatif RT-PZR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır. Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ekspresyonu değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan housekeeping genin ekspresyon düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak housekeeping genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak housekeeping genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır (Yüzbaşıoğlu, 2008).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Hansen vd. (2006), yapmış oldukları çalışmada doğal ortamlarında bulunan üç kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) populasyonu farklı metal seviyelerine maruz bırakılmış, antioksidan metallathionein (*MT*), superoksit dismutaz (*SOD*) ve katalaz (*CAT*) gibi bunlara karşılık gelen mRNA seviyelerini incelemişlerdir. Buna ek olarak, mRNA seviyeleri glutathione peroxidase (*GP<sub>x</sub>*) ve glutathione reductase (*GR*) içinde incelenmiş. Cd/Zn'ye maruz kalmış alabalıkların solungaçlarında daha yüksek Cd, Cu ve Zn birikimine sahip ve kontamine olmayan referans bir nehirdeki alabalıkla Cu'ya maruz bırakılmış bir alabalık karşılaştırıldığında solungaçların yanı sıra böbrek ve karaciğerlerin *MT* (hem protein hem de mRNA) seviyesi yüksek bulunmuştur. Cu'ya maruz kalmış alabalıkta bulunan *MT* seviyesinin az olması, oksidatif strese duyarlılığı arttırmış olabilir ancak bu balıkların solungaçlarında daha yüksek seviyelerde antioksidan mRNA bulunamamıştır. Veriler Cd/Zn'ye maruz kalmış alabalıkta *SOD* mRNA düzeyleri daha yüksek olmasına rağmen, kahverengi alabalığın Cd, Zn ve Cu'ya kronik olarak maruz bırakılmasının, solungaçlarda yüksek *SOD* ve *CAT* enzim aktivitelerinin sürdürülmesini içermediğini göstermiştir. Metale maruz kalmış alabalık karaciğerlerinde *SOD*, *CAT* ve *GP<sub>x</sub>* mRNA seviyeleri daha yüksek ancak bu durumda *GR* sadece Cd/Zn'ye maruz kalmış alabalık böbreklerinde görülmüştür. Bununla birlikte her iki metale maruz bırakılan grupların metale maruz kalmamış alabalığa kıyasla karaciğerde *SOD* enziminin aktivitesi daha yüksek ve Cu'ya maruz kalmış alabalık böbreklerinde *CAT* aktivitesi daha yüksek bulunmuş. Cu'ya maruz kalmış alabalık solungaçlarında Cu toksisitesinin önlemek için *MT* üretimine güvenilmiyor ancak Cu alımı düşük seviyede tutularak korunabilir. Farklı stres genlerinin koordineli bir şekilde ifade edilmesi kronik metal maruziyetinde önemli olmuştur. Gözlemlenen metal etkilerinin metale maruz kalmış populasyonlarda genetik uyumdan ziyade ortama adaptasyona bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kumar vd. (2014), yapmış oldukları çalışmada Avrupa ve Kuzey Amerika'da bulunan Salmonidlerin çeşitli türlerinde proliferatif böbrek hastalığına sebep olan *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoo) enfeksiyonunun gen ekspresyonu üzerine olan etkilerini çalışmışlardır. Enfekte olmuş kahverengi alabalıkta cold-inducible RNA binding protein, cyclin-depend kinase inhibitor 2A, prothymosin alpha, transforming protein RhoA, immunoglobulin light chain ve major histocompatibility complex class I gibi genlerin

ekspresyonları belirgin derecede artarken hemoglobin subunit beta ve staniocalcin precursor gibi genlerin ekspresyon düzeylerinde önemli derecede azalma olmuştur. Bu çalışma hücre stresi ve hücre büyüme süreçlerini, sinyal iletim faaliyetlerini, konakta eritropoez ve kalsiyum homeostazı, parazit gelişiminin evreleri boyunca modüle edildiğini ve kahverengi alabalık böbreğindeki *T. bryosalmonae*'nin sporigenezi destekleyebileceğini göstermiştir.

Raida and Buchmann (2009), teleostlardaki bakteriyel enfeksiyonlara karşı tepki mekanizmalarını prosedüre uygun hazırlanan ölmüş bakteri enfeksiyonunun ardından geniş çapta incelemişlerdir. Gökkuşuğu alabalığındaki (*Oncorhynchus mykiss*) *Y. ruckeri* O1'e karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisi,  $5 \times 10^5$  CFU'luk *Y. ruckeri* ile birincil intra-peritoneal enfeksiyondan 35 gün sonra ikinci bir enfeksiyon sonrasında incelenmiştir. Enfeksiyon süresince karaciğerdeki patojenlerin sayısı ile *Y. ruckeri* spesifik 16S ribozomal RNA nicel gerçek zamanlı RT-PZR'da (q-PZR) ölçülmüştür. Birincil enfeksiyon sırasında 3. günde bakteri sayıları pik yapmış ve tekrar enfeksiyon süresince belirgin olarak daha düşükmüş. Enfeksiyona yeniden meydan okuyan balıklar, balıkta bu bakteriyel patojene karşı adaptif bağışıklığın gelişimini gösteren birincil bir enfeksiyon alan saf balıkla karşılaştırıldığında hayatta kalma oranının oldukça yüksek olduğunu gösterdi. Adaptif immünite monte edilmeden önce konakçıların hayatta kalmasına katılan molekülleri aydınlatmak için enfeksiyon sırasında karaciğerdeki doğuştan gelen bağışıklık faktörlerinin gen ifadesini araştırmışlar. mRNA'nın transkripsiyonu q-PZR kullanılarak enfeksiyondan 8 saat, 1, 3, 7, 14 ve 28 gün sonra karaciğerden alınan örneklerde ölçülmüştür. Araştırmada toll-like receptor 5 (*TLR5*), pro-inflamatuar sitokinler IL-1b, IL-6 ve TNF-a, acute phase proteins (*APPs*), serum amyloid protein a (*SAA*), alabalık C polisakkarit bağlama proteini, a CRP/SAP like pentraxin, precerebellin, transferrin, hepcidin ve son olarak da complement faktörler C3, C5 ve faktör B gibi kodlayıcı genler üzerine yoğunlaşmıştır. Enfeksiyon, tüm sitokinlerin (IL-6 > 1000 fold), bazı akut faz proteinlerinin (*SAA* > 3000 kat) gen ekspresyonunda belirgin artış ve komplement faktörlerin (C3, C5 ve faktör B) regülasyonunun azaldığını ortaya koymuştur. *SAA* ekspresyonu, birincil enfeksiyona kıyasla yeniden enfeksiyon esnasında belirgin olarak daha erken aktif hale gelmiştir.

Monica vd. (2012), doğaya kaçan kültüre alınmış ve seleksiyonla bazı özellikleri iyileştirilmiş Atlantik salmonu (*Salmo salar*) ile yabani salmonlar arasındaki ırk karışımı, yabani popülasyonunun gen bütünlüğünü etkileyip etkilemediğini ve çevresel kaynaklı

strese maruz kalan yabancı türlerin, hibritlerin ve çiftliklerdeki salmonların ön böbreğindeki stres ile ilişkili 7 geni çalışmışlardır. Genel olarak, kontrole göre stok yoğunluğuna bağlı strese maruz bırakılmış balıklarda insulin-like growth factor-1 (*IGF-1*) azalırken, diğer genlerin ekspresyonunda önemli bir etkiye sahip olmadığını bulmuşlardır. Glutathione reductase (*GR*), Cu/Zn superoksit dismutaz (*Cu/Zn SOD*), Mn superoksit dismutaz (*Mn SOD*), glutathione peroksidaz (*GP*) ve *IGF-1* mRNA ekspresyon seviyeleri genetik köken tarafından etkilenmiştir bu nedenle çiftlikteki yabancı ve hibrit kökenli salmonlar arasında belirgin ifade farklılıklarına rastlanmıştır. Her iki ortamda da, *IGF-1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi ve yabancı salmonun vücut büyüklüğü arasında olumlu bir ilişki tespit edilmiştir. Hibrit ve çiftlik salmonları için böyle bir ilişki gözlemlenmemiştir. Bu çalışmada, her iki muamelede de hibritler kalıtsal olmayan bir yapı sergilerken, çiftlik salmonları *IGF-1* geninin mRNA düzeyi yabancı salmone kıyasla önemli derecede yüksek bulunmuş. Her iki ortamda da, yabancı somon balığının boyutu ile *IGF-1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi arasında pozitif bir ilişki tespit edilirken, hibrit veya çiftlik somonları için böyle bir ilişki gözlenmemiştir.

## 2.1. Materyal

Bu çalışmada Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ Araştırma ve Uygulama Ünitesinde TÜBİTAK destekli 214O595 nolu projeden elde edilen *Salmo trutta labrax*, *Salmo trutta caspius*, *Salmo trutta abanticus* ve bunların hibritleri kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. *Salmo trutta labrax* (L), *S. t. caspius* (C), *S. t. abanticus* (A) türlerinin çaprazlanmasıyla elde edilen gruplar

Gruplar	Grupların kısaltılması
<i>S. t. labrax</i> X <i>S. t. labrax</i>	LL
<i>S. t. labrax</i> X <i>S. t. abanticus</i>	LA
<i>S. t. labrax</i> X <i>S. t. caspius</i>	LC
<i>S. t. abanticus</i> X <i>S. t. abanticus</i>	AA
<i>S. t. abanticus</i> X <i>S. t. caspius</i>	AC
<i>S. t. caspius</i> X <i>S. t. caspius</i>	CC

Enfeksiyon işleminde kullanılacak olan *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* bakterileri aynı fakülteye ait Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

## 2.2. Metot

Bu çalışmada farklı genlere ait yeni primerler dizayn edildi. Hazır SyberGreen premiksi yerine Neb'in hot start *Taq* polimeraz master miksi ve floresan boya olarak da SyberGreen yerine daha hassas olan EvaGreen kullanıldı ve bu bağlamda yeni protokol geliştirildi.

### 2.2.1. Balıkların Bakterilerle Enfekte Edilmesi

Çalışmada kullanılan balık grupları (Tablo 1) 40 litrelik akvaryuma 15 adet balık/akvaryum olacak şekilde stoklandı. Kontrol ve her bir balık grubu, deneysel hataları ve farklılıkları ortadan kaldırmak amacıyla 3 paralel olarak oluşturuldu. Balıklar akvaryumlara aktarıldıktan bir hafta sonra enfekte işlemine geçildi.

Bir gece öncesinden sıvı besi yerinde inkübe edilen *L. garvieae* 10 dk 1000 x g'de santrifüj edilerek üst kısmı atıldı. Sonrasında üzerine 20 ml PBS eklenip tekrar 10 dk 1000 x g'de santrifüj edilerek yıkandı. Pelet halindeki bakteriye PBS eklenerek spektrofotometrede (Shimadzu, Uv-2550 UV-Visible Spectrophotometer) 600 nm dalga boyunda yoğunluğu ölçülerek bakteri yoğunluğu  $10^6$  CFU olacak şekilde seyreltildi. Balıklar benzokayn (0,2 ml/L) kullanılarak bayıltıldıktan sonra intraperitoneal enjeksiyon yöntemi kullanılarak 0,1 ml *L. garvieae* ( $1 \times 10^5$ /balık) balıklara enjekte edildi. Enjeksiyon işleminden 24 saat sonra günde iki kere balıklar yemlendi ve su sıcaklıkları ölçüldü. Su sıcaklıkları deney süresince 15-18°C aralığında seyretmiştir.

Deney, balıklar *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra 28 gün boyunca sürmüştür. Balıkları enfekte etmeden hemen önce örnekleme yapılarak sıfıncı saat kontrol grubu oluşturuldu. Balıklar enfekte edildikten sonra ilk örnekleme 8. saatte yapıldı. Sonrasında 24. saat, 72. saat, 7. gün, 14. gün ve 28. günde örnekleme tekrarlanarak deney sonlandırılmıştır. Her bir örnekleme de 4 balık örneklenerek her bir balıktan 100 mg karaciğer ve 100 mg böbrek alınarak apendorf tüpüne kondu ve hemen -80°C'de RNA izolasyonuna kadar stoklandı.

Tablo 2. *Salmo trutta labrax* (L), *S. t. caspius* (C), *S. t. abanticus* (A) türlerine ait balıkların ortalama boy ve ağırlıkları

Gruplar	<i>Lactococcus garvieae</i>		<i>Yersinia ruckeri</i>	
	Boy (cm)	Ağırlık (g)	Boy(cm)	Ağırlık (g)
LL	16,36	56,41	17,74	54,18
LA	17,22	53,39	16,50	46,95
LC	16,20	60,85	17,16	51,72
AA	15,54	40,31	16,01	45,07
AC	14,55	33,12	13,51	25,25
CC	13,18	34,02	11,20	15,50

Yukarıda *L. garvieae*'da belirtilen işlemlerin aynısı *Y. ruckeri* için tekrarlandı. Ancak bakteri yoğunluğu  $10^3$  CFU/balık olacak şekilde balıklara enjekte edildi.

### 2.2.2. RNA İzolasyonu

Deney balıklarından alınarak -80'de stoklanan örneklerden 50 mg karaciğer ve 50 mg böbrek alınarak küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 1 ml Trizol ilave edildi ve Bioprep-24 homejenizer kullanılarak 700 m/s, 30 sn ve 3 döngüde homojenize edildi. Bu işlem sonrasında örnekler yeni bir tüpe aktarıldı ve 5 dk bekletildi. Üzerine 250 µl kloroform eklenerek 5 dk bekletilip 14,000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından üst faz kısmı pipet yardımıyla yeni bir tüpe aktarıldı, içerisine 550 µl izopropil alkol eklenerek 5 dk karıştırıldıktan sonra 14,000 x g'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant ayrı bir tüpe aktarıldı, final oranı %70 olacak şekilde soğuk etanol ilave edildi ve 9,600 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Tüplerdeki etanol boşaltıldı, içerisine tekrardan %70'lik soğuk etanol ilave edildi ve 9,600 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Peletler kuruduktan sonra üzerine 40 µl TE (Tris EDTA) tamponu eklendi ve +4°C'de 2 saat beklendikten sonra RNA konsantrasyonları nükleik asit analizörü (Nano200) kullanılarak ölçüldü. RNA kalitesinin (260/280) 1,8-2,1 aralığında olan örnekler kullanıldı. Bu aralıkta olmayanlar örneklerden yeniden RNA izolasyonu yapıldı.

### 2.2.3. cDNA Sentezi

Balık dokularından izole edilmiş RNA'ları komplementer DNA'ya (cDNA) çevirmek için ABI cDNA Revers Trankriptaz (Applied Biosystems, ABD) kiti kullanıldı. Bu amaçla, örneklerin final konsantrasyonu 850 ng/μl olacak şekilde ultrapure su kullanılarak ayarlandı. PZR tüplerine 5 μl seyreltilmiş kalıp RNA ve 5 μl revers transkripsiyon karışımı (1 μl 10X RT Buffer, 0,4 μl 10 nM dNTP, 0,5 μl RNase inhibitör, 0,5 μl Revers Trankriptaz, 1 μl 50 μM Random primer, 1,6 μl DEPC-treated su ve 5 μl RNA) ilave edildikten sonra örnekler 10 dakika 25°C'de ön inkübasyondan sonra 2 saat 37°C'de inkübe edildi ve enzimler 85°C'de 15 dakika inkübe edilerek inaktif hale getirildi. Elde edilen cDNA örnekleri bir sonraki işleme kadar -20°C de muhafaza edildi.

### 2.2.4. Real Time PZR

13 farklı gene ait primerler (Tablo 2) Primer Express 2.0 yazılımı (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kullanılarak dizayn edilmiştir.

Tablo 3. Gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılan genlere ait primerler, genin GenBank'taki kodu ve primerlerin baz dizilimi

Genler	GenBank Accession no	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Superoxide dismutase	BT057901	CCACGTCCATGCCTTTGG	TCAGCTGCTGCAGTCACGTT
Catalase	BE669040	GAGGGCAACTGGGACCTTACT	GGACGAAGGACGGGAACAG
Glutathione peroxidase	BG934453	GATTCGTTCCAACTTCCTGCT A	GCTCCCAGAACAGCCTGTTG
Glutathione reductase	BG934480	CCAGTGATGGCTTTTTGAACT T	CCGGCCCCACTATGAC
Cold-inducible RNA-binding protein	JZ713052	TTCTAGGCCGGGGATCCTAC	ATACAGCCAGCCAAGGGATG
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	JZ713054	CGAAATGGCCGAGGGTGATA	CCTCCTGGCCTTCCAATGTT
Prothymosin alpha 1	BT057594	CGAGCGTTTTGGAGGGAAAC	ACGGACATTGGGTGTGTGTA
Transforming protein RhoA	JZ713063	ACTACGACAGACTACGGCCT	GCTGTCCGGGCTATCTATGG
Immunoglobulin light chain Major	AF273017	CAGACTCCGGTCACCAAGAC	CTCAATCCAAGCCCCCTGTT
histocompatibility complex class I	JZ713068	TGAAGAGAGAGGGAGCCGAT	TGAAGCGATCCTTTGCCACT
Hemoglobin subunit beta	JZ713069	ATCACGGTCTTTCCGTGCTT	AGACACTTCAGCACCTTCGG
Stanniocalcin precursor	JZ713071	GCCATGACATCCCCGTTTTG	GATGTCAAACCCACCCACT
Beta-actin	BG933897	GACAGCTACGTTGGAGACGA	GTTGGCTTTGGGGTTGAGTG



RT-PZR işleminde DNA bağlayıcı florasan boya olarak Evagreen (Biotium, Inc. Parkway Fremont, CA, ABD) kullanıldı. cDNA örnekleri PZR işleminden önce 1:10 oranında seyreltildi. RT-RZR reaksiyonunda 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Her bir kuyucuğa toplam hacim 25 µl olacak şekilde 9.3 µl ultrapure su, 1 µl DNA, 1 µl Evagreen ve 12.5 µl hot start *Taq* 2 X master mix karışımı koyulduktan sonra üzerine 2 µl (0.2 µM) primer (Tablo 3) ilave edildi. Plakların üzeri şeffaf film ile kapatılarak Exicycler 96 Real-Time kantitatif PZR'ye (Bioneer, Korea) yerleştirildi. 95°C'de 60 sn ön inkübasyon işleminin ardından sırasıyla 95°C'de 20 sn denaturasyon, 58°C'de 20 sn tutunma, 68°C'de 45 sn uzama ve floresan okuma şeklinde 35 döngü yapıldı. Döngü işlemi tamamlandıktan sonra reaksiyonun başarılı olup olmadığını teyit etmek için 58°C'den 94°C'ye doğru kademeli olarak her 10 saniyede 0,5°C ısıtılarak erime eğrisi oluşturuldu. Ayrıca qPZR ürünleri %2'lik agarozda yürütülerek ürün boylarına ve spesifik olmayan amplifikasyonlara bakarak teyit edildi. Her bir reaksiyon 3 defa tekrarlandı.

### 2.2.5. Rölatif Gen Ekspresyonun Değişimlerinin Hesaplaması

Normalizasyon için internal kontrol ya da referans gen olarak beta aktin geni kullanıldı. Gen aktivitelerindeki fold ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) değişim aşağıda belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

$$2^{-\Delta\Delta CT} = [(C_T \text{ hedef gen} - C_T \text{ internal kontrol})_{\text{örnek}} - (C_T \text{ hedef gen} - C_T \text{ internal kontrol})_{\text{kontrol}}]$$

### 2.2.6. Hedef Genlerin ve İnternal Kontrol Geninin PZR Etkinliğinin Belirlenmesi

Elde edilen cDNA örnekleri 1/10 oranında seri olarak seyreltildi. Hedef gen primerleri ya da beta aktin primeri kullanılarak yukarıda açıklandığı gibi qPZR yapıldı. Elde edilen CT (y-ekseni) değerine karşılık log cDNA dilisyonu (x-ekseni) grafiğe yerleştirildi ve buradan doğrunun slopu belirlendi.

Amplifikasyon etkinliği (E) =  $10^{-1/\text{slop}}$  olarak

Amplifikasyon etkinliği yüzde olarak da; % Etkinlik =  $(E-1) \times 100$  şeklinde hesaplandı (Schmittgen ve Livak, 2008).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hastalıklara Karşı Bağışıklık Sistemi Tepkisinin Belirlenmesi

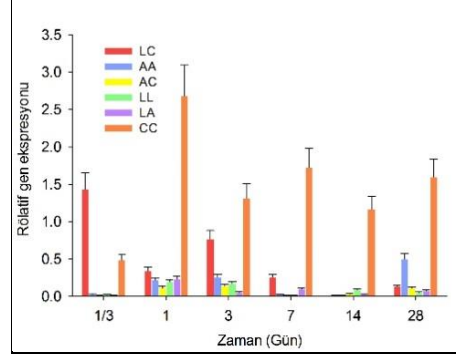
Gen ekspresyonu çalışmalarında 12 genle [katalaz (*CAT*), Superoksit dismutaz (*SOD*), Glutathione peroksidaz (*GPx*), Glutathione reductaz (*GR*), Cold-inducible RNA-binding protein (*CIRBP*), Cyclin-dependent kinaz inhibitor 2A (*CDKN2A*), Prothymosin alpha 1 (*ProT* alpha 1), Transforming protein RhoA (*RhoA*), Immunoglobulin light chain (*AL*), Major histocompatibility complex class I (*MHC* class I), Hemoglobin subunit beta (*HBB*), Stanniocalcin precursor (*STC*)] birlikte internal kontrol olarak da bata aktin geni çalışıldı. Oksidaz genleri dışındaki 8 gene ait primerler bu tezde sentezlendi ve denendi.

Erime eğrisindeki piklere bakıldığında ve her denemede sadece bir pik elde edildi. Genlere ya da primerlere bağlı olarak PZR etkinliği %96 ile %101 arasında değişmiştir.

Rölatif gen ekspresyonunda elde edilen değer 1 ise kontrol ile deneme grubu değerinin aynı olduğunu, değer birden büyükse rölatif gen ekspresyonunun arttığını (up-regulated) ve birden küçükse rölatif gen ekspresyonunun azaldığını (down-regulated) göstermektedir.

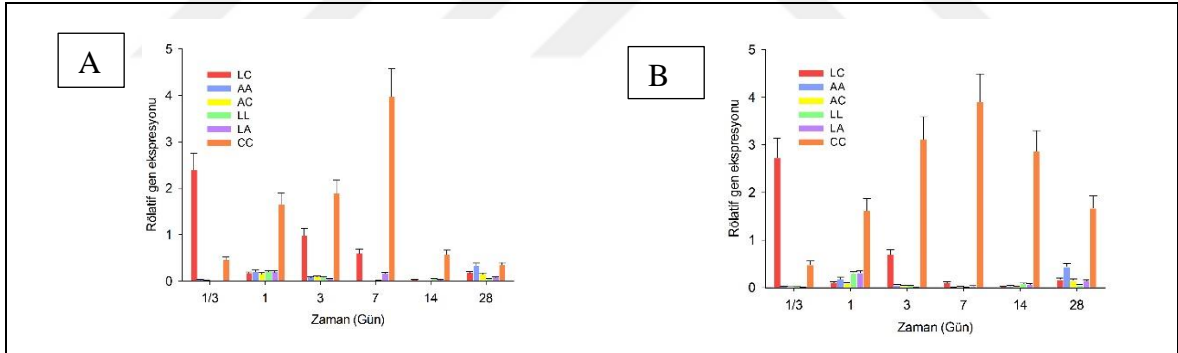
##### 3.1.1. *Lactococcus garvieae*

Balıklar bakteri ile enfekte edilmeden önce alınan sıfırinci saat kontrolü olarak kullanıldı. *L. garvieae* enfeksiyonundan sekiz saat sonra LC grubunda *CAT* rölatif gen ekspresyonu artarak (up-regulated) en yüksek seviyeye çıkmış ve birinci günden itibaren de gen ekspresyonu azalmıştır (down-regulated). CC grubunda da ilk gün gen ekspresyonu kontrol grubuna nazaran artarak en yüksek seviyeye çıkmış ve sonraki günlerde de az miktarda azalmıştır. Diğer gruplarda ise gen ekspresyon seviyesi birin altında olduğundan azalmıştır (Şekil 5).



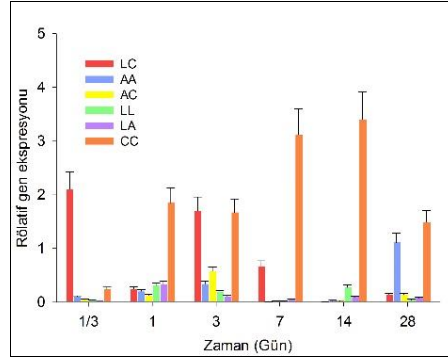
Şekil 5. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *CAT* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

*CAT* geninde olduğu gibi *SOD* ve *GPx* genlerinin rölatif ekspresyonu LC grubunda ilk 8 saat te 2 foldun üzerine çıkmış ve sonraki günlerde *SOD* geninin ekspresyonu kontrole nazaran azalmıştır. CC grubunda da ilk sekiz saate kontrole göre azalan gen ekspresyonu 24 saat sonra artarak devam etmiş ve 7 günden sonra yine azalmıştır. Diğer gruplarda da gen ekspresyonu kontrol grubuna nazaran azalmıştır (Şekil 6).



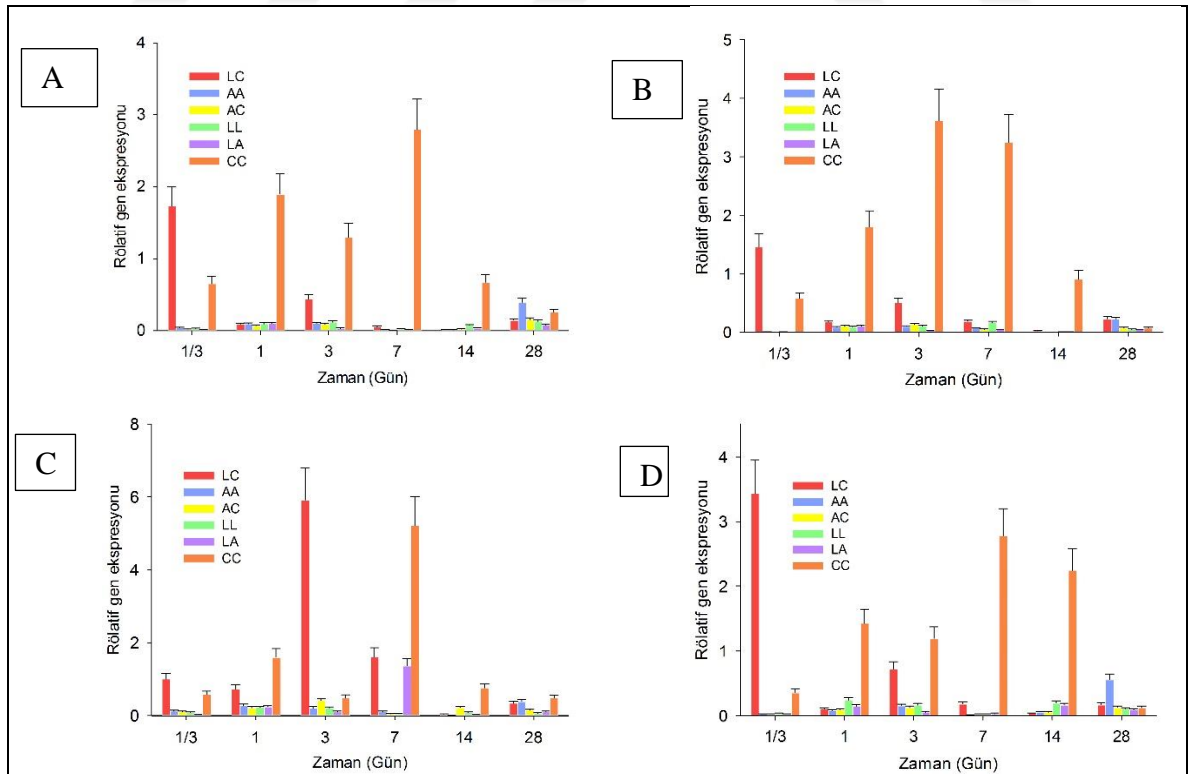
Şekil 6. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *SOD* (A) ve *GPx* (B) genlerinin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

Enfeksiyondan 8 saat sonra sadece LC grubunda rölatif *GR* gen ekspresyonu artarken, bir gün sonra CC grubunda, 3 gün sonra ise LC ve CC grubunda, 7 ve 14 gün sonra ise sadece CC grubunda gen ekspresyonu artmıştır. En fazla artış CC grubunda 14. günde 3,4 fold olarak gerçekleşirken birçok grupta gen ekspresyonu azalmış hatta 0,01 folda kadar düşmüştür (Şekil 7).



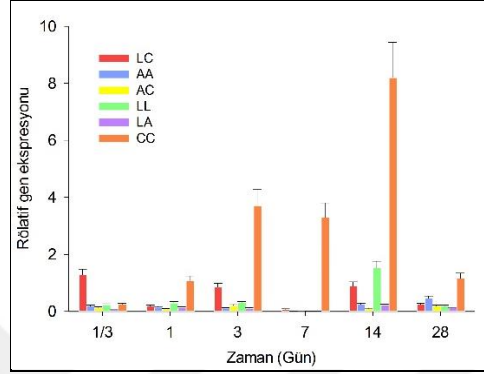
Şekil 7. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *GR* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

*Lactococcus garvieae* enfeksiyonundan 8 saat sonra *CDKN2A* gen ekspresyonunda fazla artış LC grubunda gerçekleşirken, CC grubu hariç diğer tüm gruplarda *CDKN2A* gen ekspresyonu kontrol grubuna göre istatistiki olarak azalmıştır. Sonraki 1., 3. ve 7. günlerde de tek artış CC grubunda olurken diğer gruplarda gen ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır (Şekil 8A CDKN). Her bir grupta *CDKN2A* gen ekspresyonunda zamana bağlı değişimin aynısı *CIRBP*, *HBB* ve *RhoA* gen ekspresyonunda görülmektedir (Şekil 8).



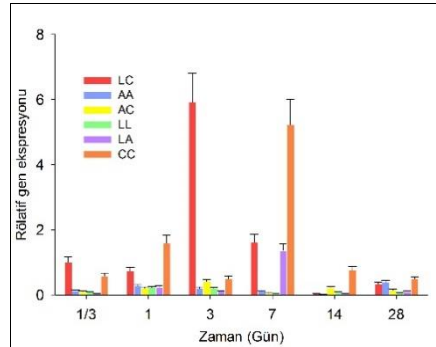
Şekil 8. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *CDKN2A* (A), *CIRBP* (B), *HBB* (C) ve *RhoA* (D) genlerinin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

*AL* gen ekspresyonu sadece CC grubunda ilk 8 saat kontrol grubuna göre azalırken 1., 3., 7. günlerde artmış ve 14. günde 8,21 folda yükseldikten sonra 28. gün tekrar azalmıştır. Diğer gruplarda ise LC grubunda 8. saatte ve LL grubunda 14. günde *AL* gen ekspresyonu artmış ve sonra azalmıştır. CC dışındaki diğer gruplarda en düşük gen ekspresyonu 7. günde sıfıra yakın bulunmuştur (Şekil 9).



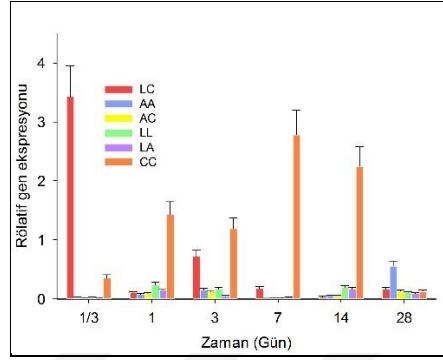
Şekil 9. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *AL* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

LC grubunda 8 saat sonraki rölatif *MHC* class I gen ekspresyonu hiç değişmemiş olup kontrol grubu ile aynı olup bir gün sonra azalmış ve 3. gün 5,92 fold artarak en yüksek seviyeye çıktıktan sonra tekrardan azalmıştır. AA, AC, LL ve LA gruplarında da tüm örnekleme zamanlarındaki rölatif *MHC* class I gen ekspresyonu azalırken sadece 7. günde LA grubunda artmıştır. CC grubunda ise 1. (1,6 fold) ve 7. günlerde (5,23 fold) artmış diğer zamanlarda azalmıştır (Şekil 10).



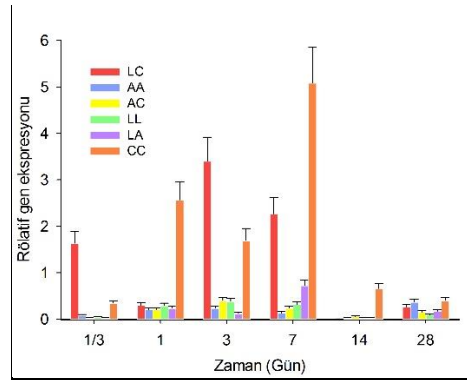
Şekil 10. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *MHC* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

Rölatif *ProT* alpha 1 gen ekspresyonu LC hariç bütün gruplarda sekiz saat sonra azalmış bir gün sonra da CC grubunda artış olmuştur. Üç gün sonra CC hariç her grupta gen ekspresyonu azalmış, CC grubunda ki artış 7. gün 2,78 folda kadar yükselmiştir. Diğer gruplardaki gen ekspresyonu 0,1 folda kadar düşmüştür (Şekil 11).



Şekil 11. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *ProT* alpha 1 geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

AA, AC, LL ve LA gruplarında rölatif *STC* gen ekspresyonu azalmıştır. LC grubunda ise 8 saat sonra 1,64 fold artmış, bir gün sonra azalmış ve üç gün sonra pik yaparak 3,4 folda yükseldikten sonra 14. günden sonra azalmıştır. CC grubunda ise 1 gün sonra artmış ve 7. gün 5,1 fold yükseldikten sonra tekrardan düşmüştür (Şekil 12).

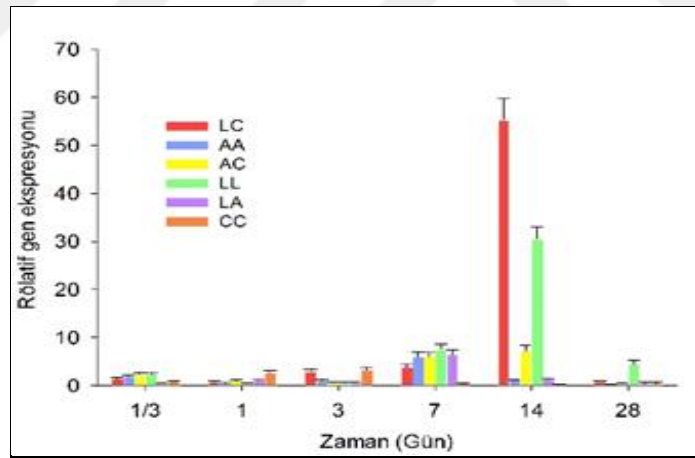


Şekil 12. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *STC* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

Balıklar *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra oksidatif stres genleri ve bağışıklık sistemiyle ilgili genlerin rölatif gen ekspresyonu bazen artış bazen de azalış göstermesine rağmen, genel olarak CC grubu dışında ki gruplarda 14. günden sonra rölatif gen ekspresyonu azalmıştır.

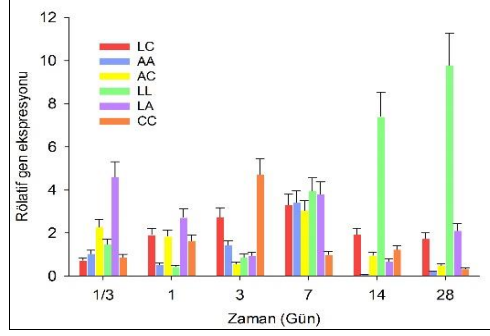
### 3.1.2. *Yersinia ruckeri*

*Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen balıklarda ilk sekiz saatte LA ve CC grubu hariç diğer gruplarda rölatif *CAT* gen ekspresyonu artmıştır. Bir gün sonra ise LA ve CC grubunda gen ekspresyonu artarken diğer gruplarda azalmıştır. Bazı gruplarda (AA ve LA) yedinci günde ve bazı gruplarda da (LC, AC ve LL) 14. günde gen ekspresyonu en çok artarken CC grubunda ise 3. günde artmıştır. Rölatif *CAT* gen ekspresyonu en fazla LC grubunda 14. günde 55 fold artarken en fazla düşüş 0,21 fold ile 14. günde CC grubunda olmuştur (Şekil 13).



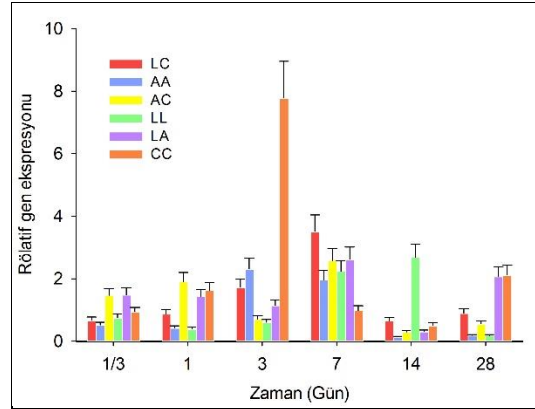
Şekil 13. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *CAT* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

İlk sekiz saat sonunda *Y. ruckeri* ile enfekte edilen balıkların rölatif *SOD* gen ekspresyonu LC ve CC grupları dışında artmıştır. Bir gün sonra ise sekizinci saate göre LC ve CC grubunun rölatif *SOD* gen ekspresyonu artarken diğer gruplarda azalmıştır. En fazla rölatif *SOD* gen ekspresyonu 3. gün ile 28. gün arasında değişmektedir. En fazla ekspresyon LL grubunda 9,79 fold olurken en az 0,33 fold ile CC grubunda görülmüştür (Şekil 14).



Şekil 14. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *SOD* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

Balıklar enfekte edildikten 8 saat sonra rölatif *GPx* gen ekspresyonu LC, AA, LL ve CC gruplarında azalırken AC ve LA gruplarında artmıştır. Bir gün sonrada CC grubundaki gen ekspresyon seviyesi 8. saatteki AC ve LA grubunun seviyesine yükselmiştir. Üçüncü gün CC grubu pik yaparak gen ekspresyonu 7,8 fold yükselirken sadece AC ve LL gruplarında azalmıştır. Gen ekspresyonu 7. gün sadece CC grubunda azalırken, 14. gün tek artış LL grubunda görülmüştür. *GPx* gen ekspresyonunda ki değişim gruplara göre farklılık göstermekte olup en fazla artış 7,8 fold ile CC grubunda 3. günde olurken en fazla azalışta 0,18 fold ile LL grubunda 28. gün gerçekleşmiştir (Şekil 15).

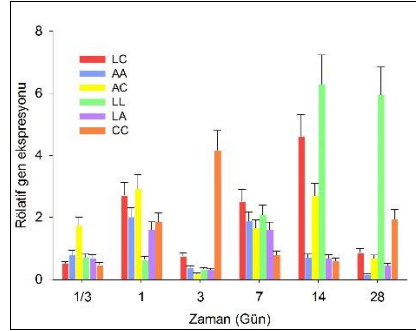


Şekil 15. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *GPx* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

Rölatif *GR* gen ekspresyonundaki artış enfeksiyondan 8 saat sonra sadece AC grubunda gözlenirken, enfeksiyondan 1 gün sonra LL grubu hariç diğer tüm gruplarda artış olmuştur. Üçüncü gün CC grubu hariç diğer gruplardaki rölatif gen ekspresyonu azalırken, 7. gün sadece CC grubunda azalmıştır. 14. günde LC, AC ve LL grubunda ve 28. günde de

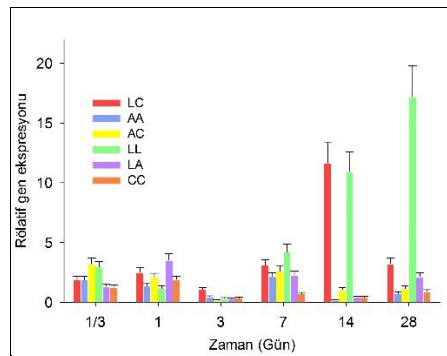


LL ve CC grubunda gen ekspresyon seviyesi artmıştır. En fazla artış LL grubunda 14. ve 28. günlerde olmuştur (Şekil 16).



Şekil 16. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *GR* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

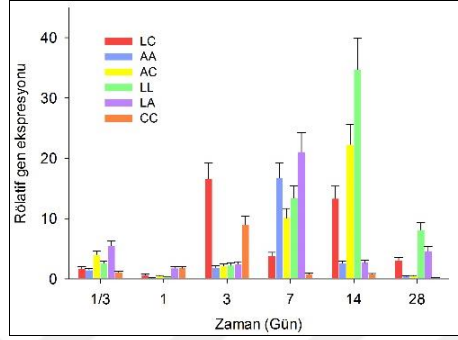
*Yersinia ruckeri* enfeksiyonundan sonra 8 saat ve bir gün sonra *CDKN2A* gen ekspresyonunda artış olmuş ve 3 gün sonra ise azalmıştır. Yedi gün sonra CC grubu hariç diğer gruplarda gen ekspresyonunda artış olmuştur. *CDKN2A* gen ekspresyonu LC grubunda 14. günde pik yaptıktan sonra tekrar azalmış fakat kontrol grubuna göre artmıştır. AA ve CC gruplarında gen ekspresyonu 14. ve 28. günlerde azalmış olmasına rağmen LL grubunda 17,2 fold artarak pik yapmıştır (Şekil 17).



Şekil 17. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *CDKN2A* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

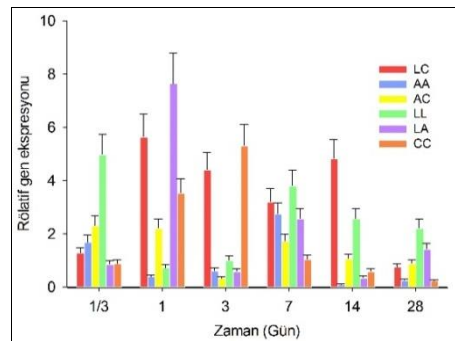
Bütün gruplarda enfeksiyondan 8 saat sonra rölatif *CIRBP* gen ekspresyonu artmıştır. Sonraki günlerde gruplara bağlı olarak bazılarında artış bazılarında da azalış olmuştur. Üçüncü gün bütün gruplarda *CIRBP* gen ekspresyonunda artış olmuştur. LC grubunda gen

ekspresyonu 3. gün 16,7 fold ve 14. gün 13,4 fold arttıktan sonra 28. gün 3,11 folda düşmüştür. En fazla artış AA (16,7 fold) ve LA (21,1 fold) gruplarında 7. gün, AC (22,3 fold) ve LL (34,7 fold) gruplarında 14. gün olmuştur. LA grubu hariç diğer gruplarda 28. gün alınan örneklerdeki rölafif *CIRBP* gen ekspresyonu 14. güne nazaran azalmıştır (Şekil 18).



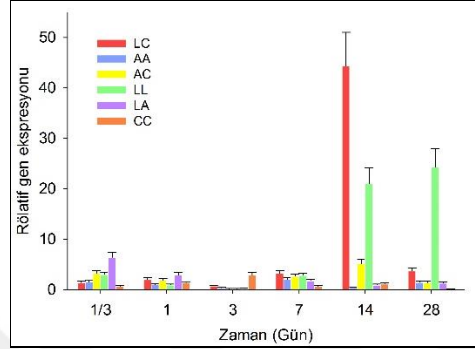
Şekil 18. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *CIRBP* geninin zamana bağlı rölafif ekspresyonu

*HBB* gen ekspresyondaki değişim gruplara göre farklılık göstermektedir. LC grubunda ilk 8. saatten başlayarak 14. güne kadar gen ekspresyonu artmış ve 28. gün ise azalmıştır. AA grubunda ise gen ekspresyonu 8. saatte artmış sonra azalmış ve 7. gün 2,8 folda çıktıktan sonra tekrardan azalmıştır. AC grubunda 3. ve 28. gün gen ekspresyonu azalırken diğer günlerde artmıştır. LL grubunda 1. gün hariç diğer günlerde gen ekspresyonu artmıştır. LA grubunda gen ekspresyonu inişli çıkışlı bir seyir izlerken CC grubunda 8. saat gen ekspresyonu azalmış ve sonraki günlerde gittikçe arttıktan sonra 7. günden sonra tekrardan azalmıştır (Şekil 19).



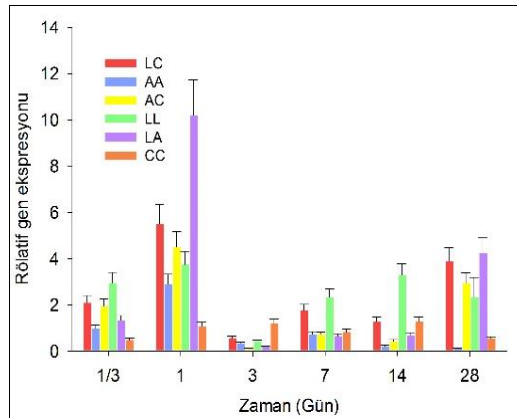
Şekil 19. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *HBB* geninin zamana bağlı rölafif ekspresyonu

Gruplara bağılı olarak rölöatif *RhoA* gen ekspresyonu değişkenlik göstermekle birlikte en fazla LC grubunda 14. gün 44,4 fold ve LL grubunda da 28. gün 24,3 fold artmıştır. LL ve LA gruplarında 3. gün 0,24 ve 0,27 fold azalırken CC grubunda da 28. gün 0,16 fold azalmıştır. Gen ekspresyonunda ki zamana bağılı değişim en az AA ve CC gruplarında gözlenmiştir (Şekil 20).



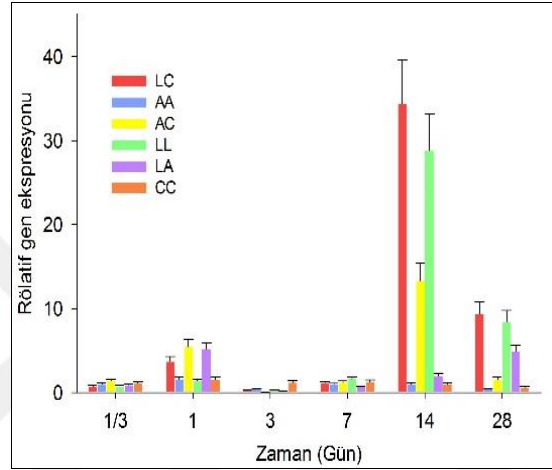
Şekil 20. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *RhoA* geninin zamana bağılı rölöatif ekspresyonu

Kontrol grubuna nazaran CC grubu hariç tüm gruplarda rölöatif *AL* gen ekspresyonu enfeksiyondan 8 saat sonraki örneklemelemlerde artmış ve bu artış tüm gruplarda bir gün sonra daha da yükselip, LC, AA, AC ve LA gruplarında pik yapmıştır. Üçüncü gün CC grubu hariç tüm gruplarda gen ekspresyonu azalmıştır. 7. gün LC ile LL grubunda, 14. gün LC, LL ve CC grubunda ve 28. gün ise AA grubu hariç tüm gruplarda gen ekspresyonu artmıştır (Şekil 21).



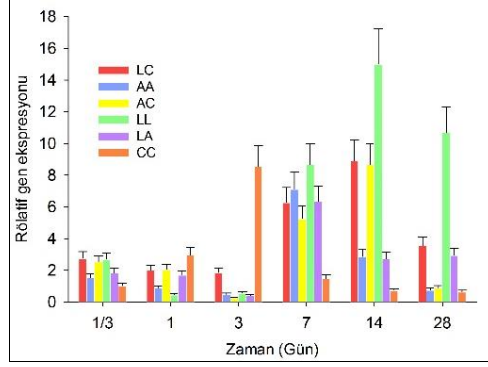
Şekil 21. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *AL* geninin zamana bağılı rölöatif ekspresyonu

*MHC* class I gen ekspresyonu ilk sekiz saat kontrol grubuna benzer seyrederken enfeksiyondan bir gün sonra tüm gruplarda artmıştır. Üç gün sonra gen ekspresyonu CC grubu (1,23 fold) hariç tüm gruplarda 0,1 folda kadar azalmıştır. Yedinci gün yine kontrol grubuna yakın seyreden *MHC* class I gen ekspresyonu, 14. gün LC (34,4 fold), AC (13,4 fold) ve LL (28,8 fold) grubunda pik yaptıktan sonra 28. gün, 14. güne nazaran azalmıştır (Şekil 22).



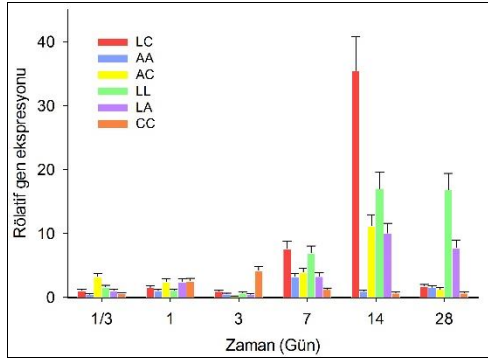
Şekil 22. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *MHC* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

LC grubuna ait rölatif *ProT* alpha 1 gen ekspresyonu 28 gün süresince artmış ve 14. gün 8,9 fold ile pik yapmıştır. CC grubunda ise ilk örneklemeden itibaren gen ekspresyonu zamanla artmış 3. gün 8,6 fold ile pik yaptıktan sonra azalmaya başlamış ve 14. günden itibaren de gen ekspresyonu 0,64 folda kadar azalmıştır. Diğer gruplarda da rölatif *ProT* alpha 1 gen ekspresyonu 7. ve 14. günde artarak pik yaptıktan sonra 28. gün azalmış yada sabit kalmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *ProT* alpha1 geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

*STC* geninin ekspresyonu LC grubunda ilk üç gün kontrol grubuna benzer seyretmiş, 7. gün 7,6 fold ve 14. gün 35 fold arttıktan sonra artış 28. gün 1,77 folda düşmüştür. LL grubunda da aynı durum söz konusu olup sadece 14. gün ve 28. gün *STC* gen ekspresyonu 17 fold da sabit kalmıştır. AC ve LA gruplarında ise 3. gün gen ekspresyonu azaldıktan sonra 7. gün artmış, 14. gün pik yaptıktan sonra 28. gün azalmıştır. CC grubunda ise birinci günden itibaren artmış 3. gün pik yaptıktan sonra gen ekspresyonu 7. gün 1,28 folda düşmüştür (Şekil 24).



Şekil 24. Balıkların *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra *STC* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu

*Lactococcus garvieae* enfeksiyonuna en fazla tepki veren CC grubu olmasına rağmen *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı ise en az tepki veren grup olmuştur.

#### 4. TARTIŞMA

Anadolu'da dağılım gösteren bazı kahverengi alabalık (*Salmo trutta labrax*, *S. t. caspius* ve *S. t. abanticus*) ve hibritlerinin farklı hastalıklara karşı gösterdikleri tepkilerin gen ekspresyonu yöntemi ile belirlenmesi Türkiye'de ilk defa yapılmıştır. Çalışmamız da kullandığımız bakteriler ve genler yönünden diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Fakat dünyada da benzer çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada farklı genlere ait yeni primerler dizayn edilmiştir. 12 gen bölgesine bakılmasından dolayı floresan boya metodu kullanılmıştır. Hazır SyberGreen premiksi yerine Neb'in hot start *Taq* polimeraz master miksi ve floresan boya olarakta SyberGreen yerine daha hassas olan EvaGreen kullanılmıştır ve bu bağlamda yeni protokol geliştirilmiştir.

EvaGreen® boya, kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR) ve diğer pek çok uygulamada kullanım için ideal özellikleri olan yeni nesil DNA bağlayıcı bir boyadır. EvaGreen, SYBR® Green I ve diğer ticari PZR veya yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM) boyalarından daha etkin özelliğe sahiptir. Çalışmamızda daha güvenilir olduğundan dolayı EvaGreen® boya kullanıldı. Geçmişte yapılan çalışmalar da SYBR® Green I'in genleri inhibe ettiğini göstermiştir (Anonim, 2017b).

Diğer omurgalı sınıflarına benzeyen spesifik olmayan immün mekanizmalar balıklarda da görülmektedir. Benzer şekilde siklostomlardan telosatlara kadar tüm evrim seviyelerinde spesifik hücre aracılı bağışıklık göstermiştir. Hüморal bir antikor sistemi de tüm sınıflarda oluşur ancak filogenetik durumla ilişkili olarak önemli derecede değişir. Balıklarda hücre aracılı immün yanıtların karakteristik bir özelliği bunların çevre sıcaklığına bağımlı olmalarıdır. Bazı türlerde en azından beslenme faktörleri ve davranış kalıplarının bağışıklık tepkisini etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır (Corbel, 1975).

Gen ekspresyonunu etkileyen DNA bölgeleri oldukça değişken olduğundan %6 oranında poliformik bölge içermektedir. Buda doğal olarak oluşan poliformik nükleotidler in vivo transkripsiyon oranlarını değiştirebilir bu nedenle bireyler arasında gen ifadesinde önemli değişiklikler görülebilir (Oleksiak vd., 2002). Yapılan bu çalışmada *Lactococcus garvieae* ve *Yersenia ruckeri*'nin hedef genlerin (*CAT*, *SOD*, *GPx*, *GR*, *CIRBP*, *CDKN2A*, *ProT* alpha 1, *RhoA*, *AL*, *MHC* class I, *HBB* ve *STC*) mRNA düzeylerinde değişimlere neden olduğu tespit edilmiştir. Bu genler kendi işlevsel özelliklerinin yanı sıra *L. garvieae* ve *Y. ruckeri*'nin yapmış olduğu hastalıkların aşamalarının izlenmesinde görev yaparlar.

$\beta$ -actin geninin ekspresyon düzeylerinin hiçbir durumda değişiklik göstermemesi hedef genlerin (*CAT*, *SOD*, *GPx*, *GR*, *CIRBP*, *CDKN2A*, *ProT* alpha 1, *RhoA*, *AL*, *MHC* class I, *HBB* ve *STC*) normalizasyonu için standart gen olarak seçilmesine olanak sağlamaktadır (Ulutaş, 2015).

Katalaz (*CAT*), glutathione ile organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksidin indirgenmesini katalize eden ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan Glutathione peroksidaz (*GPx*), bakır ve çinko iyonlarını bağlayan ve vücutta serbest süperoksit radikallerinin yok edilmesinden sorumlu olan iki izozimden biri olan Superoksit dismutaz (*SOD*), Glutathione reductaz (*GR*); kırmızı hücre enzimleri ve biyolojik hücre zarlarını, aerobik glikoliz sürecinde indirgenmiş glutathione (*GSSGR*) seviyesini arttırarak oksidatif hasara karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır (Anonim, 2017c).

Hansen vd. 2006, farklı metal seviyeleri olan nehirlerde yaşayan üç kahverengi alabalık populasyonunda *MT*, *SOD*, *CAT*, *GPx* ve *GR* genlerinin aktivitelerini belirlediler. Yapılan bu çalışmada ne *SOD* ne de *CAT* aktivitesi üç nehirden alınan balıkların solungaçlarında farklı bulunmamıştır. Bu durum Naustebekken ve Rugla nehirlerinde bulunan ROS-indükleyici metallerin yüksek maruz kalma seviyeleri göz önüne alındığında şaşırtıcıdır. Bununla birlikte bakır (Cu)'ya maruz kalmış alabalığın solungaçlarında *CAT* mRNA seviyeleri artarken kadminyum/çinko (Cd/Zn)'ye maruz kalmış alabalığın solungaç ve karaciğerinde *SOD* mRNA seviyeleri yüksek bulunmasına rağmen referans alabalık ile karşılaştırıldığında düşük olduğu bulunmuştur. Beklendiği gibi metal kirlenmiş nehirlerden alınan kahverengi alabalıkların karaciğerlerinde *GPx* daha yüksek ekspresyon göstermiştir. Zn en azından hidrojen peroksit ile aynı anda verildiğinde oksidatif stres oluşturabilir, ancak *MT*, *SOD*, *CAT* ve *GPx*'in transkripsiyonunda da önemlidir. Naustebekken Irmağı'ndaki Cd/Zn'ye maruz kalmış alabalıkta bulunan yüksek Zn seviyesi *GR*'in mRNA seviyesini arttırmıştır. Bu genlerin cinsiyete bağlı olmadığı da bu araştırmada bulunmuştur. Ancak bazı araştırmacılar da oksidatif stres tepkilerinin cinsiyete bağlı olabileceğini iddia etmektedirler (Chen vd., 2017). Yapmış olduğumuz çalışmada ise balıklar küçük olduğundan cinsiyetleri belli değildi fakat grup içi farklılıklar çok düşük olduğundan, çalıştığımız genlerin aktiviteleri cinsiyete bağlı değildir sonucuna varılabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz veriler *L. garvieae* ile enfekte olan kahverengi alabalık gruplarında *CAT* aktivitesi LC ve CC grupları dışında genel olarak arttığını göstermektedir. Diğer gruplarda artış sadece bir zaman noktasında görülmüştür. *Y.*

*ruckeri* ile enfekte edilen balık gruplarında ise *CAT* aktivitesinde artış tüm gruplarda gözlemlenmiştir. *L. garvieae* ile enfekte edilmiş balık gruplarında *CAT* geninde olduğu gibi *SOD* ve *GPx* genlerinin ekspresyonu LC ve CC gruplarında artış gösterirken diğer gruplarda ekspresyon azalmıştır. *Y. ruckeri* ile enfekte edilmiş balık gruplarında *SOD* geninin ekspresyonu hemen hemen tüm zaman noktalarında artış göstermiştir. *GPx* ekspresyonu gruplara göre farklılık göstermekte olup en fazla artış CC grubunda görülmüştür. *L. garvieae* enfeksiyonundan sonra LC ve CC gruplarında *GR* ekspresyonu artarken diğer gruplar azalış göstermiştir. Balıkların *Y. ruckeri* enfeksiyonundan sonra tüm gruplarda zaman noktalarının bir kaç kısmında azalış göstermesine rağmen genel olarak artış göstermiştir.

Kumar vd. 2014, tarafından kahverengi alabalık böbrekleri üzerinde test edilen 9 transkriptin ortalama göreceli gen ekspresyonu analiz edilmiş ve *Tetracapsuloides bryalsmonea* enfeksiyonundan sonraki 6 ve 12 hafta sonuçları karşılaştırılmıştır. Cold-inducible RNA-binding protein (*CIRBP*), cyclin-dependent kinase inhibitor 2A protein (*CDKN2AIP*), prothymosin alpha (*PTMA- $\alpha$* ), transforming protein RhoA (*TPRA*) ve ribosomal protein L6 (*RPL6*) parazit gelişimi sırasında kahverengi alabalık böbreklerinde farklı şekilde ekspresyonun arttığı gözlemlenmiştir. Enfekte edilmiş kahverengi alabalıkta hem *CIRBP* hem de *CDKN2A*'nın ifadesi, tüm zaman noktalarında belirgin biçimde yukarı doğru artmıştır. Immunoglobulin light chain ekspresyonu, tüm zaman noktalarında enfekte kahverengi alabalıkta artmıştır. *MHC-I*'in ekspresyonu belirgin bir biçimde ekspresyon artmıştır ancak 12 hafta sonra genin ekspre olduğu görülmemiştir. Hemoglobin subunit beta (*HBB*) ve stanniocalcin precursor (*STC*) parazit gelişimi sırasında kahverengi alabalık böbreklerinde farklı şekilde ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir. *CDKN2AIP* kahverengi alabalık böbreklerinde önemli derecede ekspre olmuştur. Sonuçlar, *T. bryalsmoneae* enfeksiyonunun kahverengi alabalık böbreklerinde hücre büyümesi regülasyonunun ekspresyonunu stimüle ettiğini ve bununda siklin bağımlı kinazların inhibasyonuna ve renal hücre büyümesinin azalmasına neden olabileceğini düşündürürken böbrek dokusunda parazit gelişimini destekleyebilir. *CIRBP*, koruyucu hücresele aktivitelere kritik rol oynayan ve strese tepki olarak geniş moleküler değişim yelpazesıyla bağlantılı olan bir stres proteindir. *CIRBP* ifadesi parazitin sporogenik evrelerinde önemli derecede ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Yapmış olduğunuz çalışmada, *L. garvieae* enfeksiyonundan sonra LC ve CC grubunda ekspresyon artış gösterirken diğer tüm gruplarda *CDKN2A* gen ekspresyonu kontrol grubuna nazaran azalmıştır. Her bir grupta



*CDKN2A* gen ekspresyonunda zamana bağlı değişimin aynısı *CIRBP*, *HBB* ve *RhoA* gen ekspresyonlarında da görülmektedir. *Y. ruckeri* enfeksiyonundan sonra tüm kahverengi alabalık gruplarında *CDKN2A* ekspresyonu önemli derecede artmıştır. Enfeksiyondan sonra *CIRBP* gen ekspresyonu genel olarak artış göstermiştir. *CIRBP* ekspresyonu gruplara bağlı olarak bazı zaman noktalarında artış ve azalış göstermiştir. Gruplara bağlı olarak *RhoA* ekspresyonu değişkenlik göstermekle birlikte en fazla artış LC ve LL gruplarında görülmüştür. Gen ekspresyonunda ki zamana bağlı değişim en az AA ve CC gruplarında tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında balıklar *L. garvieae* ve *Y. ruckeri* ile enfekte edildiğinde, *CDKN2A*, *CIRBP*, *HBB* ve *RhoA* genlerinin aktivitelerinde değişiklikler olmuştur. Bu durum bu genlerin bağışıklık sistemiyle alakalı olduğunu göstermektedir.

*Tetracapsuloides bryosalmonae* ile enfekte olmuş kahverengi alabalık böbreklerinde hemoglobin subunit beta'nın ekspresyonu azalmıştır (Kumar vd., 2014). Bir başka çalışmada Abd-Elfattah vd. (2014), *T. bryosalmonae* ile enfekte olmuş kahverengi alabalığın böbreklerinde ekspresyonun azaldığı bulunmuş, enfeksiyon bulaşmış balıklarda eritropoezin parasitemia ve anemiye sebep olabileceği öne sürülmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmada ise *HBB*'nin ekspresyon seviyeleri gruplara göre farklılık göstermektedir. Tüm zaman noktalarında belirli gruplarda artış söz konusudur. Bu da *Y. ruckeri* ve *L. garvieae*'nin hemoglobine zarar vermediğini göstermektedir.

Eschenfeldt and Berger (1986), Prothymosin alpha, hücre proliferasyonu, apoptoza karşı koruma ve kromatin yeniden biçim verme aktivitesi ile ilişkilendirilmiş olup, bol miktarda asidik nükleer küçük bir proteindir. Kumar vd. (2014)'deki çalışmasında *PTMA- $\alpha$*  ifadesi, kahverengi alabalıkta artarken, parazitik enfeksiyon sırasında gökkuşaağı alabalığında ekspresyonun azaldığı görülmüştür. Enfekte olmuş kahverengi alabalıkta *PTMA- $\alpha$* 'nin ekspresyonunun farklı şekilde arttığı görülmektedir. Enfekte kahverengi alabalığın böbreklerinde *PTMA- $\alpha$* 'nin artması bu konakçıda hücre proliferasyonunun ve hücre çoğalmasının, *T. bryosalmonae*'nin sporogonik aşamalarını engellemediğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada *L. garvieae* ekspresyonundan sonra LC ve CC balık grubu hariç *ProT* alpha 1 gen ekspresyonunda tüm zamanlarda azalma olmuştur. *Y. ruckeri* ile enfekte olmuş balık gruplarının tümünde genel bir artış söz konusudur fakat bazı zaman noktalarında *ProT* alpha 1 ekspresyonunda azalışlar meydana geldiği görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında balıklar *Y. ruckeri* ile ve LC ve CC'nin *L. garvieae* ile enfekte

edildiğinde, *ProT* alpha 1 genlerinin aktivitelerinin azalması, bu genin aktivitesinin inhibit edildiğini göstermektedir.

Staniocalcin böbrek ve bağırsakta kalsiyum\fosfat homestazında ve metabolizmasında yeralan bir glikoproteindir (McCudden vd., 2001). *STC1*, protozoon parazit *Entamoeba histolytica* enfeksiyona yanıt olarak insan kolonunda daha yüksek seviyelerde ekspre edilmektedir (Zhang and Stanley, 2004). Kumar vd. (2014)'de ki çalışmasında *STC1* zayıflatılmış bulaşıcı hemotopietik nekroz virüsü ile mücadele eden gökkuşağı alabalığının ön böbreklerinde ekspresyon azalmış ve ardından artış göstermiştir. *STC*'nin ekspresyonu, enfekte kahverengi alabalık böbreğinde 6 hafta da değişmemiş ve 8-12 hafta sonra bu genin aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. *T. bryosalmonae* enfeksiyonunun ana böbrek hücrelerinde kalsiyum\fosfat metabolizma aktivitesinin kademeli olarak azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada ise *L. garvieae* enfeksiyonundan sonra AA, AC, LL ve LA gruplarında rölatif *STC* ekspresyonu azalmıştır. *Y. ruckeri* enfeksiyonundan sonra ekspresyon tüm gruplarda artış göstermiştir. Yapılan bu çalışmada ise *Y. ruckeri*'nin balıkların böbrek hücrelerindeki kalsiyum\fosfat metabolizmasını azalttığı söylenebilir. *L. garvieae*'nin ise bazı balıklarda böbrek hücrelerindeki kalsiyum\fosfat metabolizmasını azaltırken bazılarında ise artırmıştır.

Antikor olarak bilinen immunoglobulinler B hücre zarında bulunan ve mikroorganizmaları tanımlamak ve etkisiz hale getirmek için bağışıklık sistemi tarafında üretilen antijen bağlayıcı proteinlerdir (Gorgoglione vd., 2013). Kumar vd., (2014)'de ki çalışmasında immunoglobulin'nin *T. bryosalmonae* ile enfekte olmuş kahverengi alabalıkta gen ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca Gorgoglione vd., (2013)'de ki çalışmasında *T. bryosalmonae* ile enfekte olmuş gökkuşağı alabalığının böbreklerinde de IgM ve IgT salgılayıcı formlar belirgin bir biçimde up-regüle olmuştur. Bu çalışmada da *L. garvieae* ile enfekte edilmiş balık gruplarında CC grubu dışındaki diğer tüm gruplarda *AL* gen ekspresyonunda belirgin bir azalış görülmüştür. LL ve LC grupları zaman noktalarının bir kaçında artış göstermiştir. *Y. ruckeri* ile enfekte olmuş balıkların ekspresyonunda artış ve azalışlar kaydedilmiştir. Bununla birlikte CC ve AC grupları dışında artış gözlemlenmiştir. *L. garvieae*'nin CC grubu hariç diğer gruplarda antijen bağlayıcı protein miktarı azalırken, *Y. ruckeri*'nin ise CC ve AC grupları dışında antijen bağlayıcı protein miktarı artmıştır.

*MHC* class 1 hemen hemen tüm hücreler tarafından ifade edilen antijenik peptitin sitotoksik T hücrelerine sunumunda yer alan bir hücre yüzeyi molekülüdür (Kumar vd.,

2014). Kumar vd. (2014)'de ki çalışmada *MHC class 1 T. bryosalmonae* ile enfekte olmuş kahverengi alabalıkta ekspresyon artış göstermiştir. *MHC class 1*'in *T. bryosalmonae* ile enfekte edilmiş kahverengi alabalıkta farklı şekilde yukarı regüle edildiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada bulgular bağışıklık yanıtının artmış olarak verilmesine rağmen kahverengi alabalık böbreklerinde *T. bryosalmonae*'nin sporogenik evrelerinde ki gelişimi etkilemez ancak bağışıklık genlerinin aktivitelerinin yukarı yönlü artması, özellikle de koordinasyonsuz bir şekilde ortaya çıktıklarında bazı patojenlere karşı her zaman koruyucu tepki oluşturmayabilir. Bu çalışmada *L. garvieae* ile enfekte olmuş AA, AC, LL ve LA balık gruplarında tüm zamanlarda *MHC class I* gen ekspresyonu azalırken LC ve CC gruplarında artış gözlemlenmiştir. *Y. ruckeri* ile enfekte edilmiş gruplardan LC, AC, LL ve AA genel olarak artış göstermiştir. LA ve CC gruplarında belirli zaman noktaları dışında belirgin bir azalış gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında balıklar *L. garvieae* ve *Y. ruckeri* ile enfekte edildiğinde, *MHC class I* geninin aktivitesinde değişiklikler olmuştur. Bu durum bu genin bağışıklık sistemiyle alakalı olduğunu göstermektedir.

Türkiye'de daha önce bu gruplarla bu alanda çalışma yapılmaması karşılaştırma ve tartışma yapmayı kısıtlamıştır. Başka araştırmacılarında bu gruplarla çalışmalar yapması karşılaştırma imkânını artıracak ve tartışmalara yeni boyutlar kazandıracaktır. Bu çalışmada elde edilen veriler gösterdi ki *Y. ruckeri* ile enfekte olmuş balık gruplarının rölatif gen ekspresyonunda ki mRNA seviyeleri *L. garviae* ile enfekte olmuş gruplara göre daha yüksektir. Yapılan bu çalışma ile bakteriyel hastalık etkenlerinin hangi genler üzerinde etkili olduğu ve hastalığın gelişimine bağlı olarak gen ekspresyonu ve bu hastalık ile hangi genlerin ilişkili olduğu belirlenebilecektir. Dolayısıyla hasta balıkların ekspresyon seviyelerine bakılarak hastalığın hangi aşamada olduğu tespit edilebilecektir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada hazır SyberGreen premiksi yerine Neb'in hot start *Taq* polimeraz master miksi ve floresan boya olarak SyberGreen yerine daha hassas olan EvaGreen kullanıldı ve bu bağlamda yeni protokol geliştirildi.

Gen ekspresyonu çalışmalarında 12 genle [Catalase (*CAT*), Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPx*), Glutathione reductase (*GR*), Cold-inducible RNA-binding protein (*CIRBP*), Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*), Prothymosin alpha 1 (*ProT* alpha 1), Transforming protein RhoA (*RhoA*), Immunoglobulin light chain (*AL*), Major histocompatibility complex class I (*MHC* class I), Hemoglobin subunit beta (*HBB*), Stanniocalcin precursor (*STC*)] birlikte internal kontrol olarak sitoiskeletal sistemde görev alan hücre yapısı, bütünlüğü ve hareketlerinden sorumlu olan proteinini kodlayan  $\beta$ -actin geni çalışıldı.

Erime eğrisindeki piklere bakıldığında ve her denemede sadece bir pik elde edildi. Genlere ya da primerlere bağlı olarak PZR etkinliği %96 ile %101 arasında değişmiştir.

Rölatif gen ekspresyonunda elde edilen değer 1 ise kontrol ile deneme grubu değerinin aynı olduğunu, değer birden büyükse rölatif gen ekspresyonunun arttığını (up-regulated) ve birden küçükse rölatif gen ekspresyonunun azaldığını (down-regulated) göstermektedir.

*Lactococcus garvieae* enfeksiyonundan 8 saat sonra LC grubunda *CAT* rölatif gen ekspresyonunun en yüksek seviyeye çıktığı ve sonraki günlerde ise gen ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüştür. LC ve CC grubu dışındaki diğer gruplarda ise gen ekspresyonu 1 fold'un altında düştüğü için azalmıştır. *SOD* ve *GPx* genlerinin rölatif gen ekspresyonunda CC grubunda yedinci gün sonrasında en yüksek seviye çıkarken AA, AC, LL ve LA gruplarında gen ekspresyonu kontrol grubuna nazaran azalmıştır. Enfeksiyondan 14 gün sonra rölatif *GR* gen ekspresyonu en fazla artışı CC grubunda 3,4 fold olarak gerçekleşirken birçok grupta gen ekspresyonu azalmış hatta 0,01 folda kadar düşmüştür. *L. garvieae* enfeksiyonundan sonra *CDKN2A* ve *CIRBP* gen ekspresyonunda en fazla artış CC grubunda gerçekleşirken, *HBB* ve *RhoA* gen ekspresyonunda LC grubunda gerçekleşmiştir. Diğer tüm gruplarda *CDKN2A*, *CIRBP*, *HBB* ve *RhoA* gen ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. *AL* gen ekspresyonu CC grubunda enfeksiyondan sonra 14. gün en yüksek seviyeye çıkmıştır. CC dışındaki diğer gruplarda en düşük gen

ekspresyonu 7. günde sifıra yakın bulunmuştur. LC grubunda rölatif *MHC* class I gen ekspresyonu 3. gün 5,92 fold artarak en yüksek seviyeye çıkarken CC ve yedinci gün LA grubu hariç diğer tüm gruplarda *MHC* class I rölatif gen ekspresyonu azalmıştır. Balıkların *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra *ProT* alpha 1 geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonunda en fazla artış 8. saatte gerçekleşmiştir. 3. günden itibaren ise CC grubu hariç diğer tüm gruplarda gen ekspresyonu düşüş göstermiştir. LC grubunda *STC* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu tüm zamanlarda AA, AC, LL ve LA gruplarında azalırken diğer gruplarda artmış ve CC grubunda yedinci gün en yüksek seviyeye çıkmıştır.

Balıklar *L. garvieae* ile enfekte edildikten sonra oksidatif stres genleri ve bağışıklık sistemiyle ilgili genlerin rölatif gen ekspresyonu bazen artış bazen de azalış göstermesine rağmen, genel olarak CC grubu dışında ki gruplarda 14. günden sonra rölatif gen ekspresyonu azalmıştır.

*Yersenia ruckeri* ile enfekte edilen balıklarda *CAT* rölatif gen ekspresyonunu en fazla artış enfeksiyondan 14 gün sonra LC grubunda 55 fold olarak görülmüştür. *SOD* gen ekspresyonu en fazla değişikliği 3. ve 28. günler arasında göstermiştir. En fazla ekspresyon LL grubunda 9,79 fold olurken en az 0,33 fold ile CC grubunda görülmüştür. Balıklar enfekte edildikten 8 saat sonra rölatif *GPx* gen ekspresyonu Rölatif *GR* gen ekspresyonundaki en fazla artış LL grubunda 14. ve 28. günlerde olmuştur. *Y. ruckeri* enfeksiyonundan sonra 8 saat ve bir gün sonra tüm gruplarda *CDKN2A* gen ekspresyonunda artış olmuş ve 3 gün sonra ise azalmıştır. LL grubunda en yüksek artış 28. günde olmuştur. Bütün gruplarda enfeksiyondan 8 saat sonra rölatif *CIRBP* gen ekspresyonu artmıştır. En fazla artış AA (16,7 fold) ve LA (21,1 fold) gruplarında 7. gün, AC (22,3 fold) ve LL (34,7 fold) gruplarında 14. gün olmuştur. *HBB* gen ekspresyondaki değişim gruplara göre farklılık göstermektedir. LA grubunda gen ekspresyonu inişli çıkışlı bir seyir izlerken birinci gün en yüksek seviyeye çıkmıştır. Gruplara bağlı olarak rölatif *RhoA* gen ekspresyonu değişkenlik göstermektedir. *RhoA* geninin zamana bağlı rölatif ekspresyonu en çok LC grubunda 14. günde 44,4 fold ve LL grubunda da 28. gün 24,3 fold artarken CC grubunda da 28. gün 0,16 fold azalmıştır. Rölatif *AL* gen ekspresyonu CC grubu hariç tüm gruplarda enfeksiyondan 8 saat sonra artmış ve bu artış bir sonraki gün daha da yükselip pik yapmıştır. *MHC* class I gen ekspresyonu genelde kontrol grubuna benzer seyretmiştir. 14. gün LC (34,4 fold), AC (13,4 fold) ve LL (28,8 fold) grupları pik yapmıştır. *ProT* alpha 1 gen ekspresyonu LC grubunda 28 gün boyunca artmış ve en fazla

ekspresyon 14. gün LL görülmüştür. CC grubunda ise sekizinci saatten itibaren gen ekspresyonu zamanla artmış 3 gün 8,6 fold ile pik yaptıktan sonra azalmaya başlamış ve 14 günden itibaren de gen ekspresyonu 0,64 folda kadar azalmıştır. *STC* geninin ekspresyonu LC grubunda en fazla 14. gün 35 fold artmıştır ve 28. gün 1,77 folda düşerken CC grubunda ise 7. gün 1,28 folda düşmüştür.

*Lactococcus garvieae* enfeksiyonuna en fazla tepki veren CC grubu olurken *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı ise en az tepki veren grup olmuştur.

## 6. ÖNERİLER

Diğer omurgalı sınıflarına benzeyen spesifik olmayan immün mekanizmalar balıklarda da görülmektedir. Benzer şekilde siklostomlardan telosatlara kadar tüm evrim seviyelerinde spesifik hücre aracılı bağışıklık göstermiştir. Hümorale bir antikor sistemi de tüm sınıflarda oluşur ancak filogenetik durumla ilişkili olarak önemli derecede değişir.

Ülkemizde ilk kez yapılan bu çalışma daha sonra yapılacak çalışmalar için örnek teşkil edebilir. Bu duruma istinaden aşağıdaki öneriler sunulabilir.

1. Çalışmaya başlamadan önce primer dizaynı yapılmalı ve denemeler yapıp uygun protokol oluşturulmalı ve uygulanan yöntemin her aşamasında titizlikle çalışılmalıdır.
2. RT-PZR'de referans olarak kullanılacak housekeeping genin doğru seçilmesi önemlidir. Çalışmalarda kullanılacak housekeeping genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır.
3. RT-PZR'de daha güvenilir sonuçlar elde etmek için SyberGreen yerine daha hassas ve çevre için mutajenik olmayan EvaGreen kullanılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. ve Pıral, S., 2015 (Çeviri Editörleri: Camcıoğlu, Y. ve Deniz, G.). Temel İmmünoloji İmmün Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları, Güneş Tıp Kitapevi, 4.Baskı, İstanbul/Ankara
- Abd-Elfattah, A., Kumar, G., Solima, H. and El-Matbouli, M. 2014. Persistence of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) in chronically infected brown trout *Salmo trutta.*, Diseases of Aquatic Organisms, 111, 41–49.
- Aguado-Urda, M., López-Campos, G. H., Fernández-Garayzábal, J. F., Martín-Sánchez, F., Gibello, A., Domínguez, L. and Blanco, M. M., 2010. Analysis of the genome content of *Lactococcus garvieae* by genomic interspecies microarray hybridization, BMC Microbiology, 10, 79, 2-8.
- Allison, L. A., 2014. Bölüm 9: Gen ekspresyonu Analiz Araçları, Temel Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, 227-245, Ankara
- Altınterim, B., 2011. Balık İmmünolojisi, Bitkisel ve Kimyasal İmmünostimulantlar, İğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / İğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech., 1, 4, 69-76.
- Anonim, <http://bagisiklik.com/bagisiklik/edinsel-bagisiklik-sistemi>, 09.05.2017a.
- Anonim, <https://biotium.com/product/evagreen>, 20.05.2017b.
- Anonim, <http://www.genecards.org/>, 21.07.2017c
- Anonim, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/623427>, 02.08.2017d
- Austin, Brian. and Austin, D. A., 2013. Gram-Positive Bacteria (Anaerobes and ‘Lactic Acid’ Bacteria), Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish, 17-57, DOI 10.1007/978-94-007-4884-2.
- Balta, F., 2016. Balık Hastalıkları. T. C Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Ders Notları.
- Başçınar, N. ve Delihasan Sonay, F., 2009. Balıklarda Biyoteknolojik Uygulamalar ve Hibridasyon, Doğal Alabalık Çalıştayı.
- Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y. and Ervasti, J. M., 2011.  $\beta$ -actin Specifically Controls Cell Growth, Migration and The G-actin pool, Moleküler Biology of the Cell, 22, 4047-4058.
- Chen, Q. L., Sun, Y. L., Liu, Z. H. ve Li, Y. W., 2017. Sex-dependent effects of subacute mercuric chloride exposure on histology, antioxidant status and immune-related



gene expression in the liver of adult zebra fish (*Danio rerio*), *Chemosphere* 188, 1-9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.148.

- Corbel, M. J., 1975. The immune response in fish: a review, 539-563.
- Çakmak, E. ve Aksungur, M., 2010. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*) Yetiştiriciliği El Kitabı, T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon
- Çelikkale, M. S., 2002. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği, Trabzon Karadeniz Teknik Üniversitesi Matbaası, I, 3. Baskı.
- Didmen, B. I., Yardımcı, B., Onuk, E. E., Metin, S. ve Yıldırım, P., 2014. Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification, *Revue Méd. Vét.*, 165, 1-2, 12-19.
- Ellis, A. E., 1999. Immunity to bacteria in fish, *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 291–308.
- Eschenfeldt, W. H. and Berger, S. L., 1986. Biochemistry The human prothymosin a gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: Evidence using a cloned cDNA (thymosin a1/sigxi peptide/mitogen-stimulated lymphocyte), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9403-9407.
- Ferrario, C., Ricci, G., Milani, C., Lugli, G. A., Ventura, M., Eraclio, G., Borgo, F. and Fortina, M. G., 2013. *Lactococcus garvieae*: Where Is It From? A First Approach to Explore the Evolutionary History of This Emerging Pathogen, *Plos One*, 8, 12, 1-11.
- Gorgoglione, B., Wang, T., Secombes, C. J. and Holland, J. W., 2013. Immune gene expression profiling of Proliferative Kidney Disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals a dominance of anti-inflammatory, antibody and T helper cell-like activities, *Veterinary Research*, 55.
- Hansen, B. H., Rømme, S., Garmo, Ø. A., Olsvik, P. A. and Andersen, R. A., 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143, 263–274.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA, *Sequences/. Bio/Technology*, 3, 413-417.
- Hirakawa, T. F., Alves da Costa, F. A., Vilela, M. C., Rigon, M., Abensur, Henry. and Elmor de Araújo, M. R., 2011. *Lactococcus garvieae* Endocarditis: First Case Report in Latin America, *Arq Bras Cardiol*, 97, 5, 108-110.

- İşler, O., 2012. Primer Prostat Kanserine Bağlı Kaspaz-2 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya
- Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996. The fish immune system:organism, pathogen and environment, Elsevier Science
- Ka Yin, L., 2004. Current Trends in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Molecular Aspects of Fish and Marine Biology, 3, 1.
- Kocabaş, M., 2009. Türkiye Doğal Alabalık (*Salmo Trutta*) Ekotiplerinin Kültür Şartlarında Büyüme Performansı ve Morfolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması, Trabzon.
- Kumar, G., Abd-Elfattah, A. and El-Matbouli, M., 2014. Differential modulation of host genes in the kidney of brown trout *Salmo trutta* during sporogenesis of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa), Veterinary Research, 45, 101.
- Logan, J., Edward, K. and Sounders, N., 2009. Bölüm 1. An Introduction to Real-Time PCR, Real-time pcr ;current technology and applications, Caister Academic Press.
- Magnadottir, B., 2006. Innate Immunity of Fish (overview), Fish & Shellfish Immunology, 20, 137-151.
- McCudden, C. R., Kogon., M. R., DiMattia, G. E. and Wagner, G. F., 2001. Novel expression of the stanniocalcin gene in fish, Journal of Endocrinology, 171, 33-44.
- Miyauchi, E., Ishii, Y., Tanabe, S., Murakami, M. and Hattori, M., 2011. Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae*, Plos One, 6, 8, 2-8.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R. and Willard, H. F., 2006. Gelişimin Genetik Yönleri, Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitapevi, 335-359, İstanbul/Ankara
- Oleksiak, M. F., Churchill, G. A. and Crawford, D. L., 2002. Variation in Gene Expression Within and Among Natural Populations.
- Önal, Ş., Çağırğan, M., Arabacı, M. and Çağırğan, H., 2016. Bakteriyel Balık Patojenlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler, Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 1, 3, 77-82.
- Öztürk, R. Ç. ve Altınok, İ., 2014. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14, 275-297.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sup>(T)</sup> method, Nature Protocol 3(6):1101-1108.

- Smieszko, S. F., 1978. Bacterial Diseases of Fishes and Their Control, *Marine Fisheries Review*, 1328.
- Raida, M. K. and Buchmann, K., 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 35-45.
- Solberg, M. F., Kvamme, B. O., Nilsen, F. and Glover, K. A., 2012. Effects of environmental stress on mRNA expression levels of seven genes related to oxidative stress and growth in Atlantic salmon *Salmo salar L.* of farmed, hybrid and wild origin, *BMC Research Notes*, 5, 672.
- Şahin, T., 2003. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Biyoteknoloji, *Sümae Yunus Araştırma Bülteni*, 3, 1,
- Tendencia, E. A. and Lavilla-Pitogo, C. R., 2004. Chapter 2. Bacterial Diseases, Diseases of Cultured Groupers, 19-28, Tigbauan / Philippines
- Timur, G. ve Timur, M., 2003. Salmonid balıklarda enterik kızıl ağız hastalığı (ERM) Yersiniosis, Bölüm:5 Enfeksiyon, Balık Hastalıkları, 142-146, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü, İstanbul.
- Ulutaş, Gökay., 2015. Çinko Oksit (ZnO) nanopartiküllerinin Zebra Balığı (*Danio rerio*) Larvaları Üzerine Genotoksik Etkileri ve Gen Ekspresyon Değişimlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize
- Valsek, M. A. and Repa, J. J., 2005. The Power of Real-Time PCR, *Adv Physiol Educ*, 29, 151–159.
- Woo, P. T. K. and Bruno, D. W., 1999. Viral, Bacterial and Fungal Infections, Fish Diseases and Disorders, 3, 455-479, Cabı Publishing.
- Yüzbaşıoğlu, A., 2008. 28. Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, , Ankara
- Zhang, Z. and Stanley, S. L., 2004. Stereotypic and specific elements of the human colonic response to *Entamoeba histolytica* and *Shigella flexneri*, *Cellular Microbiology*, 6, 535–554.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Balıkesir'in Manyas ilçesinde doğdu. Lise öğrenimini 2006 yılında Bandırma'da tamamladıktan sonra 2007 yılında Atatürk Üniversitesi, İspir Hamza Polat Meslek Yüksekokulu, Su Ürünleri Bölümü'ne başladı. 2009 yılında mezun oldu. 2010 yılında yapılan Dikey Geçiş Sınavı ile KTÜ, Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümüne geçiş yaptı ve 2014 yılında öğrenimini tamamladı. 2014 yılında KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.

