



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***GALLERIA MELLONELLA* (LEPIDOPTERA)'DA  
BEYİN NÖROSEKRESYON HÜCRELERİNDE  
MİKROSKOBİK (FLORESAN VE ELEKTRON) VE  
ANALİTİK (Cap LC-ESI-MS/MS) YÖNTEMLERLE  
SİALİK ASİT BELİRLENMESİ**

**Sanaz NAGHAVİ**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 401.02.00**

**Sunuş Tarihi : 11.02.2011**

**Bornova-İZMİR**

**2011**

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

***GALLERIA MELLONELLA* (LEPIDOPTERA)'DA  
BEYİN NÖROSEKRESYON HÜCRELERİNDE  
MİKROSKOBİK (FLORESAN VE ELEKTRON) VE  
ANALİTİK (Cap LC-ESI-MS/MS) YÖNTEMLERLE  
SİYALİK ASİT BELİRLENMESİ**

**Sanaz NAGHAVİ**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 401.02.00**

**Sunuş Tarihi : 11.02.2011**

**Bornova-İZMİR**

**2011**

**ÖZET**

***GALLERIA MELLONELLA* (LEPIDOPTERA)'DA  
BEYİN NÖROSEKRESYON HÜCRELERİNDE  
MİKROSKOBİK (FLORESAN VE ELEKTRON) VE  
ANALİTİK (Cap LC-ESI-MS/MS) YÖNTEMLERLE  
SİALİK ASİT BELİRLENMESİ**

NAGHAVİ, Sanaz

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sabire KARAÇALI  
Şubat 2011, 50 sayfa

Bu çalışma da *Galleria mellonella*'nın Pars İnterserebralis (PIC) bölgesi ve nörosekresyon hücrelerinde (NSC) sialik asidin varlığı aranmıştır. Bu amaçla mikroskopik (Floresan ve elektron mikroskoplar, sırasıyla FM ve TEM) ve analitik (cap ESI-LC-MS/MS) yöntemler kullanılmıştır.

Mikroskopik yöntemler lektinlerin şekerleri seçici tanınmasına dayanır. FM'de, frozen kesitlere ve lowicryl'e gömülmüş örneklerden alınan yarı ince kesitlere tüm sialik asit (Sia) tiplerini tanıyan *Limulus polyphemus* agglutinin (LPA) lektini uygulanmıştır. 3., son ve ergin evre beyinlerinden alınan frozen kesitlerde floresan ışığa PIC bölgesinde geniş bir alanda ve beyni dıştan saran nöral lamella veya stromada görülmüştür. Lowicryl'e gömülmüş beyinlerden alınan yarı ince kesitlere Sia'ların glikozidik bağ tipini de tanıyan altın bağlı lektinler *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) uygulanmıştır.

Eldede edilen floresan ışımalar  $\alpha$ -2,3 ve  $\alpha$ -2,6 glikozidik bağla bağlanan Sia'ların PIC bölgesinde bulunduğunu işaret etmektedir.

3.evre, son evre larva ve 6.gün pupa'nın lowicryl'e gömülmüş örneklerinden alınan ince kesitlere TEM de incelemek amacıyla glikozidik bağ tipini tanıyan altın bağlı lektinler uygulanmıştır. MAA-bağlı altın partikülleri 3. ve son evre larva NSC hücrelerinin nukleuslarında kromatine bağlı, sitoplazmalarında ise sitosolde, nörosekresyon granüllerinde mitokondrilerde ve lipid vakuollerde yer almaktadır. NSC'leri incelenen iki evrede de, MAA-bağlı altın partikülleri SNA-bağlı altın partiküllerinden daha fazla bulunmuştur. Genç (3.evre larva) ve yaşlı (son evre larva) evreler karşılaştırıldığında hem MAA ve hem de SNA-bağlı altın partikülleri genç hücrelerde daha boldur. TEM incelemeleri sonucunda son evre larva NSC'lerinde;  $\alpha$ -2,6 bağlı Sia'ların yok denecek kadar azaldığı,  $\alpha$ -2,3 bağlı Sia'ların ise yine azaldığı fakat bulunmaya devam ettiği gözlemlenmiştir.

Analitik yöntemle elde edilen sonuçlar mikroskopik yöntemlerle elde edilen sonuçları desteklemektedir. Belirlenen Sia tipi Neu5Ac ve Neu5Gc9Ac dir. Neu5Ac 7.6 ng/mg ile en fazla 3. evre PIC bölgesinde saptanmıştır. Son evre larva'da PIC bölgesi için bu değer 1.1 ng/mg ve 6.gün pupa'da 1.5 ng/mg ölçülmüştür. Ergin yapılanmanın devam ettiği pupal evrenin ikinci yarısındaki böceklerde, 3. evrede bulunanlardan önemli ölçüde az olmakla birlikte, son evre larvaya göre hafif bir artış görülmüştür. Sonuç olarak; NSC'de sialik asit bulunmaktadır. İlerleyen yaşla hücrelerde  $\alpha$  2,6 bağlı Sia yok denecek kadar azalırken  $\alpha$  2,3 bağlı Sia azalarak bulunmaya devam eder. PIC bölgesinde ise yaşlanan dokuda Sia tipleri ve konsantrasyonları azalmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Sialik asit, Nörosekresyon hücreler, Lektin, Transmisyon elektron mikroskobu, LC-MS/MS, Floresan mikroskobu, Altın işaretleme, *Galleria mellonella*, Böcek

**ABSTRACT****DETERMINATION OF SIALIC ACID IN *GALLERIA MELLONELLA* BRAIN NEUROSECRETORY CELLS WITH MICROSCOPIC (FLORESCENCE AND ELECTRON) AND ANALYTICAL (Cap LC-ESI-MS/MS) METHODS**

NAGHAVI, Sanaz

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

February 2011, 50 pages

In this study, presence of sialic acid in *Galleria mellonella*'s Pars Intercerebralis (PIC) zone and neurosecretory cells (NSC) has been investigated. For this purpose, microscopy (Fluorescence and Transmission Electron microscope; FM and TEM respectively) and analytical (Cap ESI-LC-MS/MS) methods were used.

Microscopic methods is based on selective recognition of sugars with lectins. For FM, frozen sections and semi-thin sections from lowicryl-embedded specimens, were applied with *Limulus Polyphemus* agglutinin (LPA) lectin which identifies the all types of sialic acid (Sia). Frozen sections from 3th, last and adult instar brains shows a large area fluorescence radiation in the PIC zone and surrounding outside the brain, neural lamella or stroma. Semi-thin sections from Lowicryl-embedded brains were labeled to recognize Sia's depending on the type of glycosidic bond with gold conjugated *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) and *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) lectins.

Obtained fluorescent radiations, indicate the presence of  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6 glycosidic-linked Sia's in PIC zone.

For TEM investigation, thin sections from lowicryl-embedded specimens of 3th, last larval instar and 6th day pupa were applied with gold conjugated lectins which recognize the type glycosidic of bond. MAA-bound gold particles in NSC's of 3th and last instar nucleus: connected to chromatin, and cytoplasm: mitochondria, lipid vacuoles and neurosecretion granules, are located. MAA-bound gold particles were found more than SNA-gold particles in both instar of examined NSC's. Young (3. evre larvae) and old (last larval) instars when compare, in both MAA and SNA-bound gold particles shows more abundant in young cells. As a result of the TEM investigations, in NSC's of last larval stage;  $\alpha$ -2,6 linked Sia's decreased almost non-existent,  $\alpha$ -2,3 linked Sia's decreased but continue to observe.

Results of analytical method supports obtained results from microscopic methods. Neu5Ac and Neu5Gc9Ac Sia types determined. Neu5Ac was found at most in the PIC's zone of 3th stage with amount 7.6 ng/mg. This amount for PIC zone of last stage larvae is 1.1 ng/mg and 1.5 ng/mg for 6th day pupa. In second half of pupal stage insects that continue to make adult structure, Sia is significantly less than those found in 3th stage and according to last stage larvae this amount shows slight increase. In conclusion, in NSC there are sialic acid. Advancing age of cells  $\alpha$  2.6 linked Sia decreases by almost non-existent while  $\alpha$  2.3 linked Sia decreases but continue to be observe. In aging tissue of PIC zone Sia types and concentrations decreases.

**Key words:** Sialic acid, Neurosecretory cells, Lectin, Transmission electron microscope, LC-MS/MS, Fluorescence microscope, Gold labeling *Galleria mellonella*, Insect

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince manevi desteğini her zaman hissettiğim, Çalışma konumun belirlenmesinde, tez aşamasında değerli bilgilerini, katkılarını ve sabrını esirgemeyen, talebesi olmaktan her zaman gurur ve mutluluk duyduğum hocam Prof. Dr. Sabire KARAÇALI'ya sonsuz sevgi ve tesekkürlerimi sunuyorum.

Ders sürecinde ve çalışmam sırasında her zaman görüşleriyle bana destek olan hocam Doç. Dr. Remziye DEVECİ'ye, sadece çalışmalarımı ilgili bilgi, deneyim, öneri, fikir ve eleştirileri değil aynı zamanda güçlü bir dostluğu paylaştığım Dr. Mehmet Salih YIKILMAZ'a, sabrı ve sevgisiyle her zaman yanımda olan Araş. Gör. Dr. Savaş İZZETOĞLU'na, hayatımın her döneminde var olmasından büyük onur duyacağım, çeşitli konularda yardımlarını gördüğüm, LC MS/MS konusunda büyük bir sabırla bana yardım eden Yüksek Kimyager Uzman Umut ŞAHAR'a, yüksek lisans dönemim boyunca çeşitli konularda yardımlarını gördüğüm, tezi gözden geçirme zahmetine katlanan değerli arkadaşım Hüseyin ÖZAYDIN'a sonsuz sevgi ve desteği ile her zaman yanımda olup beni hiç yalnız bırakmayan canım arkadaşım Merve AÇIKEL'e, ve hayatımı borclu olduğum, aldığım her kararda arkamda duran, hiçbir zaman maddi, manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme özellikle, yardımları kelimelere sığmayacak canım abim Atabak NAGHAVİ'e sonsuz şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.





**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
1.1 <i>Galleria mellonella</i> .....	1
1.1.1 <i>Galleria mellonella</i> 'da nörosekresyon hücreleri .....	1
1.2 Karbohidratların Biyolojik Önemi .....	3
1.2.1 Sialik asitler .....	5
1.2.2 Karbohidratların belirlenmesi .....	10
2. MATERYAL ve YÖNTEM .....	12
2.1 Materyal .....	12
2.1.1 Böcek kültürünün yetiştirilmesi .....	12
2.1.2 Uygulamalar için materyalin hazırlanması .....	13
2.2 Yöntemler .....	13
2.2.1 Mikroskopik yöntemlerle sialik asit belirlenmesi .....	13

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.2.2 Analitik yöntemle (Cap LC-ESI-MS/MS) sialik asit belirlenmesi.....	16
3. BULGULAR .....	21
3.1 Mikroskopik Yöntemlerle Sialik Asit Belirlenmesi .....	21
3.1.1 Floresan mikroskopta lektin işaretlemeleri ile sialik asit belirlenmesi.....	21
3.1.2 Transmisyon elektron mikroskopunda lektin işaretlemeleri ile sialik asit belirlenmesi .....	24
3.2 Analitik Yöntemle Sialik Asitlerin Belirlenmesi.....	31
3.3 Bulgulardan elde edilen sonuçlar .....	36
4. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	38
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	50

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>Galleria mellonella</i> 'da beyin.....	2
1.2 <i>Galleria mellonella</i> son evre larva'da beyin .....	2
1.3 Sialik asitlerin farklı modifikasyonları.....	7
2.1 Sentetik besin içinde <i>G.mellonella</i> kültürü .....	12
2.2 <i>G.mellonella</i> 'nın hayat döngüsü ve çalışma sürecinde incelenen evreleri. a, 3.evre larva; b, son evre larva; c, 6. gün pupa; d, ergin.....	14
2.3 “Automatic Freeze Substitution System” cihazı .....	17
2.4 Kapiler HPLC - Elektro Sprey İyonizasyon - Kütle Spektroskopisi.....	17
2.5 Sialik asidin, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxy-benzene (DMB) ile türevlendirilme reaksiyonu .....	18
2.6 Neu5Gc ve Neu5Ac için standart kromatogram ve spektrumları .....	20
3.1 3.evre beyin, frozen kesit.....	22
3.2 Son larval evre beyin Frozen kesit .....	22
3.3 Ergin beyin. Frozen kesit.....	22
3.4 Son larval evre beyin, lowicryl kesit MAA uygulaması .....	23
3.5 Son larval evre beyin, lowicryl kesit SNA uygulaması.....	23
3.6 3.evre larval beyin, MAA lektin uygulaması .....	26
3.7 3.evre larval beyin, MAA lektin uygulaması .....	26

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.8 3.evre larval beyin, MAA lektin uygulaması .....	27
3.9 3.evre larval beyin, MAA lektin uygulaması .....	27
3.10 3.evre larval beyin, MAA lektin uygulaması .....	28
3.11 3.evre larval beyin, MAA lektin uygulaması .....	28
3.12 3.evre larval beyin, SNA lektin uygulaması.....	29
3.13 3.evre larval beyin, SNA lektin uygulaması.....	29
3.14 3.evre larval beyin, SNA Lektin uygulaması .....	29
3.15 Son evre larval beyin, MAA lektin uygulaması .....	30
3.16 Son evre larval beyin, SNA lektin uygulaması .....	30
3.17 <i>Galleria mellonella</i> beyinin PIC bölgesinde bulunan DMB türevli Sia'ların CapLC-ESI-MS/MS kromatogram ve kütle spektrumları.....	33
3.18 <i>Galleria mellonella</i> beyinin PIC bölgesinde bulunan DMB türevli Sia'ların CapLC-ESI-MS/MS kromatogram ve kütle spektrumları.....	34
3.19 Neu5Ac'nin 3.evre larva, son evre larva ve 6.gün pupa PIC örneklerinde mutlak pik alanlarına göre karşılaştırılması .....	34
3.20 Neu5Ac'nin 3.evre larva, son evre larva ve 6.gün pupa PIC örneklerinde mutlak pik alanlarına göre karşılaştırılması .....	35
3.21 Neu 5Ac'nin 3.evre larva, son evre larva ve 6.gün pupa PIC örneklerinde konsantrasyonların karşılaştırılması .....	35

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Sialik asitlerin temel tipleri .....	6
2.1 Çalışmada kullanılan lektinlerin şeker spesifikliği ve uygulanan tamponları .....	14
3.1 DMB türevlerine ait ana iyonlar ve parçalanma iyonları .....	31

## 1. GİRİŞ

### 1.1 *Galleria mellonella*

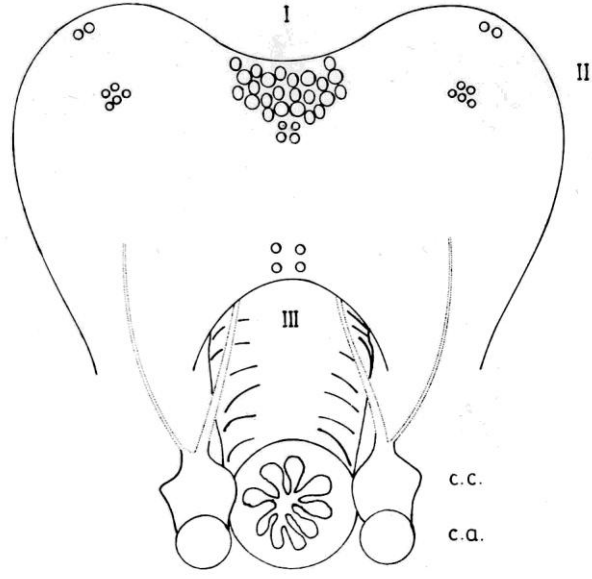
Büyük mum gövesi *Galleria mellonella*, *Pyralidae* familyasından bir güvedir. *Galleria mellonella* Holometabol böceklerdendir ve larval evre (instar) sayısı kültür koşullarına bağlı olarak 5-7 arasında değişir. Arı yuvaları içinde galeriler açar. *Galleria mellonella* bütün dünyada yaygın şekilde kullanılan bir laboratuvar böceğidir.

Böceklerde deri değişimi ve metamorfoz nöroendokrin sistem tarafından sentezlenen hormonlarla kontrol edilir. Bu sistem, beyinde bulunan nörosekresyon hücreleri ile beyine bağlı nöroendokrin bezler corpus cardiacum-corpora allatum ile protorasik bezlerden oluşur. Nörosekresyon hücreleri nöroendokrin bezleri kontrol ederek hiyerarşinin başında bulunurlar.

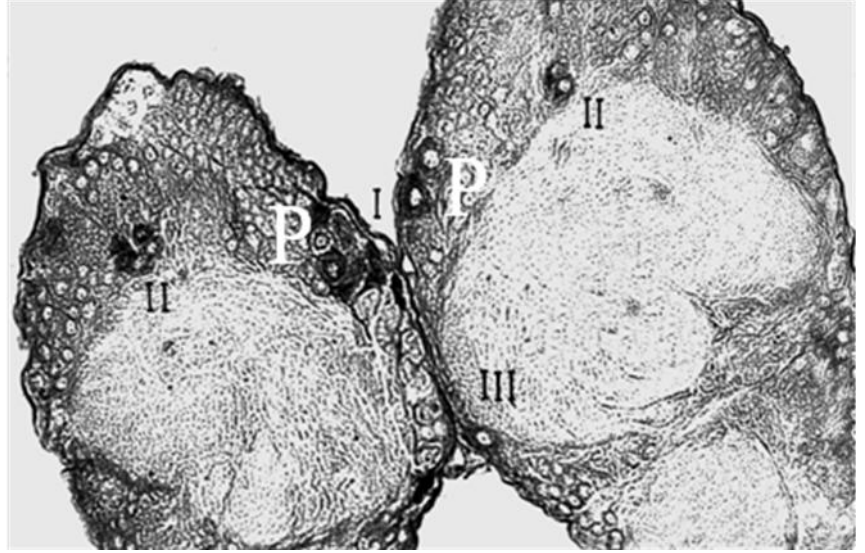
#### 1.1.1 *Galleria mellonella*'da nörosekresyon hücreleri

Böcek metamorfozunu düzenleyen faktörün hormonlar olduğunu ilk olarak Kopec (1922) tarafından ileri sürülmüştür. Nörosekresyon hücreleri de ilk olarak Weyer (1935), tarafından bal arısı beyninde saptanmıştır. Daha sonra bu hücreler bütün böcek ordolarında beynin protorserebrumunun pars interserebralis bölgesinde gruplar halinde gösterilmiştir. Bu bölgede metamorfozu kontrol eden hormonu salgılayan hücreler bulunduğu için özel önem taşır. Lepidoptera'da nörosekresyon hücrelerini ilk olarak Schroder (1938), *Ephestia kühniella*'da göstermiştir.

*Galleria mellonella*'nın pars interserebralisinde ışık mikroskobu ile iki esas tip (A ve B) ve elektron mikroskobunda beş tip hücre ayırt edilmiştir (Karaçalı, 1973, 1976). Nörosekresyon hücreleri morfolojik olarak perikaryonlarında salgı granüllerinin varlığı ile diğer sinir hücrelerinden ayrılırlar. Bu granüller ile Golgi paralel zarları ve vakuolleriyile devamlılığı gösterilmiştir (Hagardorn et al., 1963; Bloch et al., 1966; Girardie and Girardie, 1967; Unnithan et al., 1970; Geldiay ve Edwards, 1973) (Şekil 1.1, Şekil 1.2).



**Şekil 1.1:** *Galleria mellonella*'da beyin, corpus cardiacum (c.c) ve corpus allatum sistemi, beynin orta (I), yan (II), arka (III) grup nörosekresyon hücreleri (Karaçalı, 1973).



**Şekil 1: 2** *Galleria mellonella* son evre larva'da beyin. (P) Pars interserebralis bölgesi, beynin orta (I), yan (II), arka (III) grup nörosekresyon hücreleri (Karaçalı, 1973).

## 1.2 Karbohidratların Biyolojik Önemi

Karbohidratlar uzun süre hücrelerde ikinci sınıf vatandaşlar olarak enerji sağlayan, yüksek molekül ağırlıklı destek veya koruyucu yapıları oluşturan ve besin depolayan moleküller olarak biliniyorlardı. Ondokuzuncu yüzyılın ortasından itibaren karbohidratlara daha çok ilgi duyulmaya başlanmıştır. 1960'lı yıllarda şekerlerin diğer moleküllere bağlı yapısal kısımlar olduğu ortaya çıkmıştır (Reuter et al., 1988).

Diğer moleküllere (lipit ve proteinler) bağlı karbohidratlar, hibrit moleküllerdir ve glikokonjugatları oluştururlar. Glikokonjugatlar sitoplazma ya da organellerde, hücre zarlarında ve hücreler arası alanlar ile sıvılarında bulunabilirler (Reuter, 1988; Allen, and, Kisailus,1992; Lehninger et al., 1993) . Karbohidratlar proteinlere N-bağlı ve O-bağlı olmak üzere iki şekilde bağlanıp glikoprotein veya proteoglikanları oluştururlar. N-glikanlar proteinlere asparagin amino asidinin amino grubundaki azot atomu üzerinden kovalent bağla bağlanırlar. Bu işlem endoplazmik retikulumda başlar. Hayvanlarda asparagin bağlı karbohidrat molekülü N-asetilglikozamin (GlcNAc)'dir ve bağ daima  $\beta$  yapıdadır. O-Glikanlar ise serin, treonin ve tirozin aminoasitlerine hidroksil gruplarındaki oksijen atomu üzerinden GalNAc Transferaz enzimi ile GalNAc'a  $\alpha$ -bağla bağlanırlar ve negatif yük oluştururlar (Fukuda and Hindsgaul, 1994; Varki et al., 1999; Tsuboi and Fukuda, 2001; Brooks et al., 2002; Taylor and Drickamer, 2003). Genel olarak yüklü yüzeyler, biyolojik sistemlerde hücrel organizasyonun her düzeyinde ve her yerde bulunan temel yapıları oluştururlar (Schnitzer, 1988). Glikolipitler ise karbohidratların seramit üzerinden O-glikozit bağ ile lipitlere bağlanması ile meydana gelir (Poirier and Kimber, 1997). Glikokonjugatlar hücre tutunmasında, hareketinde, hücreler arası ve hücre içi sinyal iletiminde, moleküler tanıma olaylarında rol oynamaktadırlar. Bu biyolojik görevlerini yapısal proteinler, taşıma proteinleri, hormonlar, immünoglobulinler, hücre tutunma molekülleri, toksinler ve lektinler gibi makromoleküllerin yapısında bulunarak yaparlar (Baum, 2002; Haltiwanger and Lowe, 2004). Karbohidratların en önemli görevi moleküller ve hücreler arası tanıma olaylarında görülür (Feizi, 1991; Varki, 2001; Karaçalı, 2003). Hücreler arası tanıma



olaylarının çeşitli örnekleri; embriyonik, otoimmün-alloimmün ilişkiler ve metastazlarda olduğu gibi hücre-hücre tanınmasında, virüs, bakteri ve protozoa gibi zararlıların enfeksiyon ilişkilerinde, hücreler arası trafikte, enfeksiyon bölgelerine kan hücrelerinin göçünde bilinmektedir (Baum, 2002; Karaçalı, 2003). Karbohidratların önemli görevlerinden biri de tanımayı engellemedir. Tanıma reseptörlerinin tanımada sorumlu karbohidratları başka bir karbohidrat tarafından kapatılarak (maskeleyme) tanıma ilişkilerinin kurulması engellenir. Karbohidratlar; hormonlar veya bilgi taşıyan diğer moleküllerin tanınması veya maskeleyme sonucu tanınmaması yoluyla sinyal iletimini düzenleyerek biyolojik olayların gerçekleşmesinde kilit faktör olarak rol oynarlar. Karbohidratların tüm bu görevlerini glukoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, glukoronik asit, idoronik asit, ksiloz ve sialik asit gibi monosakaritler ile gerçekleştirirler (Varki et al., 1999; Karaçalı, 2003).

Hücre zarlarında yer alan glikolipitler de glikoproteinler gibi önemli görevler üstlenirler. Hücre zarında seramide bağlanan glikolipitler glikosfingolipitler olarak bilinir (Taylor and Drickamer, 2003). Omurgalılarda şimdiye kadar 200'den fazla glikosfingolipit tanımlanmıştır. Glikosfingolipitlerin önemli reseptör görevleri olduğu bilinmektedir. Glikosfingolipitlerin yarısından fazlası sinir dokudan izole edilmiştir ve gangliosit olarak bilinir (Yamashita et al., 1999).

Canlılarda az miktarda bulunmasına rağmen oldukça önemli görevlerini gerçekleştiren karbohidratların belirlenmesinde farklı amaçlar için farklı yöntemler tercih edilir. Karbohidratların kimyasal yöntemlerle belirlenmesinde izole edilme ve saflaştırılma aşamalarında kayıplar olmaktadır. Bir kalıba göre sentezlenmediklerinden miktarlarını artırmak için polimeraz zincir reaksiyonuna benzer bir yöntem de yoktur. Ek olarak, spektroskopik yöntemlerle belirlemek için çok pahalı ve özel aletler gerekmektedir (Towsen and Hotchkiss, 1997; Karaçalı ve Deveci, 2002; Karaçalı, 2003). Araştırılan bir şeker molekülünün çalışılan hücrelerin hangi kısımlarında (hücre yüzeyi, sitoplazma, organeller veya nükleus gibi) ve hangi yoğunlukta yerleştiğini anlamak için mikroskopik yöntemler kullanılır. Hücre yüzeylerinde yer alan glikokonjugatların belirlenmesi

için elektron mikroskobunda katyonik boyalar (Ruthenium red, Alcian blue ve diğerleri) enzimatik sindirim uygulamalarıyla birlikte kullanılmaktadır (Karaçalı et al., 1997). Oligosakkaritlerin uç şeker birimleri de Lektin'lerle belirlenmektedir (Gabijs and Gabijs, 1993; Rhodes and Milton, 1998; Karaçalı and Deveci, 2001).

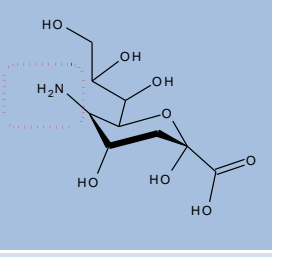
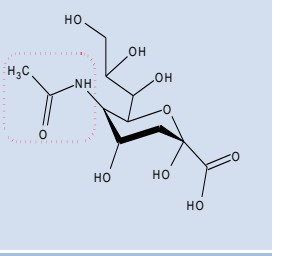
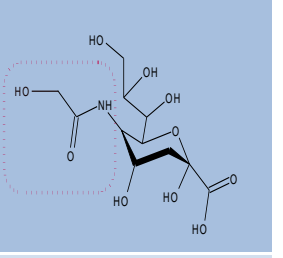
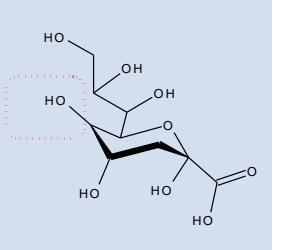
### 1.2.1 Sialik asitler

**Sialik asitler (Sia)** bir çok canlı glikokonjugatlarının oligosakkarit dizilerinde bulunurlar (Varki, 1997; Ueda et al., 1998; Brooks et al., 2002; Cerna et al., 2002; Sasaki et al., 2002). 9C'lu Sia N- ve O- bağla glikokonjugatların oligosakkarit zincirlerinin uç kısmına bağlanır. 5. pozisyonundaki karbon atomuna bağlanan farklı gruplara göre 4 tip temel Sia bulunur (Çizelge 1.1). Bu dört molekülde 4., 7., 8., ve 9. pozisyonlardaki karbonların OH gruplarına O-asetil, O-metil, O-sülfat ve O-fosfat gibi ek grupların eklenmesiyle karmaşık yapıları Sia'lar oluşur (Şekil 1.3). Şimdiye kadar 65'den fazla çeşidi tespit edilen Sia'lar glikan zincirinin en uç kısmında buldukları için bağlandıkları glikokonjugatların görevlerini belirlemede birincil derecede rol oynarlar (Schauer, 1985, 2001, 2004; Varki et al., 1999)(Şekil 1.4).

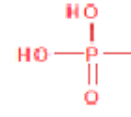
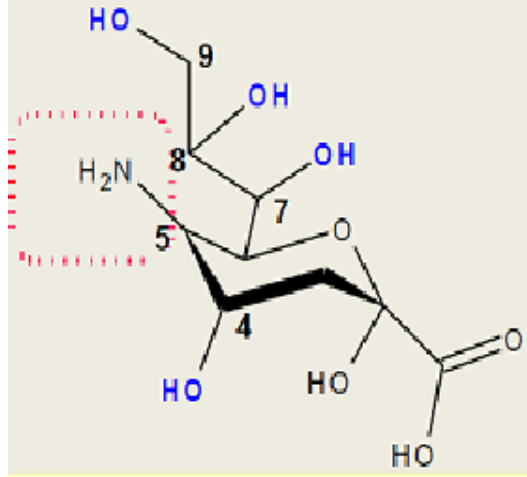
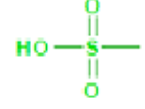
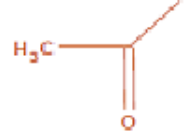
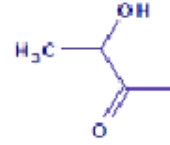
Sia moleküllerinin biyolojik seçiciliğini ve bu özelliğinin değiştirilmesini 1, 4, 5, 7, 8 ve 9. pozisyonlarında bulunan gruplar belirler (Chen and Varki, 2002). Moleküle eklenen gruplar molekülün iriliğini, şeklini, hidrofiliğini, net yükünü değiştirir ve dolayısıyla biyolojik özelliklerine etki eder. En yaygın olarak görülen Sia modifikasyonu, hidroksil gruplarına O-asetil esterlerin eklenmesidir (Varki, 2002). Sia'ların Golgi lümeninde glikokonjugatlara eklenmesinden sonra O-asetil esterazlar Sia'ların özel pozisyonlarının O-asetilasyonunda iş görürler (4., 9. pozisyonlar gibi). Farklı hücrelerde farklı O-asetillenme meydana gelir. Gelişim durumuna ve dokuya özgü düzenlenme gösterirler. Bazıları da moleküllere özel ve belirli glikokonjugatlarda bulunurlar (Schauer and Kamerling, 1997) Örneğin; 9. pozisyonunda O-asetilasyon bazı kanser hücrelerinde bir "onco-fetal" antijen olarak yeniden ifade edilir (Cheresh et al., 1984b; Sparrow and Barnsytale 1988; Manzi et al., 1990; Varki, 1992). Glikokonjugatlardan Sia'ların uzaklaştırılması ise lizozomlarda olur. Sialidazlarla bağları koparılan Sia'lar glikokonjugatlardan

uzaklaştırılırlar. Daha sonra koparılan Sia'lar sitosole taşınır ve yeniden aktif Sia vericisi oluşturmak için kullanılır.

**Çizelge 1.1:** Sialik asitlerin temel tipleri.

	Kısaltma	Eklenen grup	
<b>Nöraminik asit</b>	Neu	H	
<b>Nöraminik asit 5-N-asetil</b>	Neu5Ac	N-asetil	
<b>Nöraminik asit 5-N-glikolil</b>	Neu5Gc	N-asetil grubu hidroksillenmiş	
<b>2-keto-3-deoxy-nonulosonik asit</b>	KDN	OH	

Sia'ların alttaki şekerlere bağlanması, 2. karbon atomu üzerinden  $\alpha$ 2,3,  $\alpha$ 2,6 veya  $\alpha$ 2,8 glikozidik bağlarla bağlanmasıyla gerçekleşir (Schauer et al., 1995; Kelm and Schauer, 1997). Sia alttaki şekerin 3. pozisyonundaki karbon atomu üzerinden bağlanıyorsa  $\alpha$ 2,3 glikozidik bağlar, 6. pozisyonundaki karbon atomu üzerinden bağlanıyorsa  $\alpha$ 2,6 glikozidik bağlar şekillenir. Sia'ların alttaki şekerin ilk önce  $\alpha$ 2,3 glikozidik bağ ile bağlanıp sonra birbirlerine  $\alpha$ 2,8 glikozidik bağla bağlanmasıyla da Polisialik asitler şekillenir.  **$\alpha$ 2,3 bağıyla** omurgalı glikoprotein ve glikolipitlerdeki galaktoza (Gal) bağlanır.  $\alpha$ 2,3 bağı Sia'larla

**9-O-fosfat****8-O-sülfat****8-O-metil****N-Asetil****4-O-Asetil****7-O-Asetil****8-O-Asetil****9-O-Asetil****9-O-laktil****N-Glikolil****Şekil 1.3:** Sialik asitlerin farklı modifikasyonları.

sonlanan glikanlar, T-limfositlerin yaşaması için gereklidir. Patojenlerin lektinleri için ve selektinlerin bağlanması için ligant olurlar. Alttaki galaktozu kep şeklinde örterek, asialoglikoprotein reseptörlerin galaktozu taşıyan glikokonjugatı tanımamasını ve dolaşımdan uzaklaştırmasını engeller.  **$\alpha$ 2,6 bağı**; omurgalıların glikolipidleri ve N-bağlı glikoproteinlerinde yaygın olarak bulunur.  $\alpha$ 2,3 bağına göre daha az görülür. Zararlıların tanıdığı ligantlardaki sia'lar  $\alpha$ 2,6 bağı ile bağlanmışlardır. Ayrıca immün sistemde sinyal aktarımında da rol oynarlar. Alttaki şekeri maskeleyen görevi de vardır.  **$\alpha$ 2,8 bağı** ise gelişmeye bağlı olarak düzenlenir. Sinir sisteminde gelişmenin düzenlenmesinde, sinyal aktarımında rol oynar (Brooks et al., 2002).

Sia'lar uç kısımda bulunmaları ve hücre yüzeyinde negatif yük sağlamaları nedeniyle hücrelerin çevreleriyle olan ilişkilerinin düzenlenmesinde oldukça önemli görevler üstlenirler. Tanıma-tutunma olayları, hücre farklılaşması, pozitif yüklü iyonların taşınması, reseptörlerin maskelenerek asıl reseptörün tanınmasının engellenmesi ve onları bozulmaya karşı koruması bunlardan bazılarıdır (Schauer

et al., 1984; Schauer, 1985; Reuter et al., 1988; Taatjes and Roth, 1990; Brooks et al., 2002).

Hücrelerde yaşlanma sürecinde; Sia miktarında azalma (Sato and Endo, 1999; Sato et al., 2001; Dai et al., 2002; Sasaki et al., 2002) ve glikozidik bağ tipinde bölgeye özel yerleşimler olduğu bildirilmektedir. Örneğin; böcek hemapoiyetik organlarda (HPO) farklılaşan kan hücrelerinin yüzeylerinde bulunan glikokonjugatlar farklılaşmanın moleküler işaretlerini oluşturabilirler (İzzetoğlu, 2006). Genel olarak Sia'lar; embriyo gelişiminde, hücre farklılaşmasında, virüs, bakteri ve protozoa enfeksiyonunda, pozitif yüklü iyonların taşınmasında, (Reuter et al., 1988; Kelm and Schauer, 1997) ve moleküler tanıma ve tanımayı maskeleyen olaylarında iş görürler (Traving and Schauer, 1998).

#### 1.2.1.1 Böceklerde sialik asit

Böceklerde ilk Sia belirlemeleri *Galleria mellonella*'nın ovaryum (Przelecka and Dutkowski, 1973), yağ dokusu (Dutkowski, 1977) ve sinir sistemini (Dybowska and Dutkowski, 1977) kuşatan bazal tabakalarında yapılmıştır. Sonraki yıllarda çeşitli optik ve analitik yöntemlerle Neu5Ac tip Sia,  $\alpha$ 2,8 glikozidik bağının da belirlenmesiyle *Drosophila* embriyonik sinir sisteminde (Roth et al., 1992), spektrofotometrik yöntemle *Galleria mellonella*'da, gelişim dönemlerinde sinir sistemi, erkek ve dişi yağ dokusunda (Karaçalı et al., 1995a), *Locusta migratoria* erginlerinde tükürük bezi, yağ dokusu, ovaryum, testis, kanat kasları ve hemolenfi içeren tüm seçilen dokularında (Karaçalı et al., 1995b) ve *Drosophila* embriyosunun pol hücresinde, blastoderm, ektoderm ve sinir sistemi hücrelerinde (D'Amica and Jacobs, 1995) Sia'ların varlığı belirlenmiştir. Bu çalışmaların ardından böceklerde sialik asit varlığını ve fonksiyonlarını gösteren çalışmalar artarak devam etmiştir. *Galleria mellonella*'nın larval protorasik bez hücreleri plazma zarlarında Neu5Gc7,9Ac<sub>2</sub> tip Sia varlığı (Karaçalı et al., 1997), *Philaenus spumarius*'un Malpigi tüplerinde  $\alpha$ 2,8 bağlı polisialik asit (Malykh et al., 1999) ile *Galleria mellonella*'nın gelişen testislerinde varlığı (Deveci, 1997) ve yedi tipinin bulunduğu (Neu5Ac, Neu5Gc, Neu4,5Ac<sub>2</sub>, Neu5,9Ac<sub>2</sub>, Neu2enAc, Neu5Gc9Ac, Neu5,8,9Ac<sub>3</sub>) (Karaçalı et al.,

1999) ve *Dociostaurus maroccanus* hemolenfinde Neu5Ac (Karaçalı et al., 2003)'nin bulunduğu bildirimleri izlemiştir.

Sialik asitler böceklerde farklı görevler üstlenmişlerdir. Örneğin çeşitli reseptörlerin işleyişinde tanıma ve maskeleyme özellikleriyle düzenleyici rol oynamaktadırlar (Karaçalı et al., 1997; Karaçalı et al., 2000; Karaçalı and Deveci, 2002). Bunun yanı sıra *Galleria mellonella*'nın larval dönemdeki protorasik bezlerine nöraminidaz uygulanarak Sia'lar uzaklaştırılmış ve yüzeyi yaşlandırılmış protorasik bezler elde edilmiştir. Larval hücrelerdeki bu yüzey karbohidrat değişimleri sonucunda larval hemositlerin tıpkı pupal dönemde olduğu gibi bu hücrelere saldırdığı ve bir kapsül şeklinde kuşattığı görülmüştür (Karaçalı et al., 2000). Aynı şekilde larval nöral doku (Özkan and Karaçalı, 2006), corpus cardiacum-corpora allatum kompleksi (Eratak and Karaçalı, 2006) ve testis (Bayro and Deveci, 2006) yüzey örtülerinde de Sia'ların maskeleyme rolü ile hemositlerin fagositik görevlerini gerçekleştirmesine olanak tanıyan reseptörlerin kapandığı ve Sia'ların uzaklaştırılması ile bu reseptörlerin açılmasına bağlı olarak bu hücrelerin tanınıp fagosite edildiği gösterilmiştir.

Sia'ların moleküler yapısının, glikozidik bağ tipinin ve miktarının embriyonik ve post embriyonik gelişimde değişimler gösterdiği bilinmektedir (Varki, 1992; Schauer and Kamerling, 1997). Örneğin *Galleria mellonella*'nın post embriyonik dönemde, gelişen testislerinde Sia miktarının genç pupa, yaşlı pupa ve ergin dönemlerde sırasıyla 16:5:1 oranlarında azaldığı, yine Sia tiplerinin de benzer şekilde azaldığı görülmüştür (Karaçalı et al., 1999). Sonuç olarak böceklerde Sia varlığının belirlenmesinin ardından artan çalışmalarla birlikte Sia'ların görevlerini belirleme çalışmaları da hız kazanmıştır.

#### 1.2.1.2 Sinir sisteminde sialik asit

Sia'lar sinir sisteminde özellikle Nöral Hücre Tutunma Molekülleri (NCAM)'nin yapısında bulunurlar. Polisialik asit zincirleri NCAM'lar üzerindeki N-glikanlara eklenirler. Beyinde hücre göçü ve akson gelişimi sırasında NCAM'lardaki polisialik asitlerin önemli rolleri vardır. NCAM'daki polisialik

asitlerin hücre yüzeylerinde negatif yük oluşturup dolayısıyla *in vitro*da zarların birbirine tutunmasını engelledikleri gözlenmiştir (Kiss and Rougon, 1997; Bruses and Rutishauser, 2001; Decker, et al, 2002). NCAM'lardaki polisialik asit düzeyi beyin gelişimi sırasında çarpıcı şekilde azalmaktadır (Taylor and Drickamer, 2003). Sialik asit taşıyan diğer moleküller gangliositlerdir. Gangliositler birçok sinir dokularından izole edilmiştir. (Yamashita et al, 1999). Ontogenez, onkogenez ve hücre farklılaşmalarında önemli rol aldığı bilinir.

### 1.2.2 Karbohidratların belirlenmesi

Karbohidratların belirlenmesinde özel boyalarla boyama, antikorla işaretleme gibi çeşitli optik yöntemlerden yararlanılır. Miktar ve fenotipik belirlemeler için lektinler yaygın olarak kullanılmaktadır (Dybowska and Dutkowski, 1977; Lis and Sharon, 1998; Karaçalı, 2003). **Lektinler** karbohidratlara kovalent olmayan bağlarla seçici olarak bağlanan glikoproteinlerdir. Bazı lektinler zayıf seçicilikte olmasına karşın bazı lektinler ise tek bir şekere hatta onun bağ tipine özel bir seçicilikte olabilmektedir (Ambrosi et al., 2005; Deveci ve Karaçalı, 2006). Virüsten bakteriye, bitkiden hayvanlara kadar birçok canlıdan elde edilen lektinler, bu çok özel seçicilik özellikleri nedeniyle karbohidratların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Karaçalı, 2003; Deveci ve Karaçalı, 2006). Fakat lektinlerin opak yapıda olmasından dolayı yapılan lektin işaretlenmelerin görünür hale getirilmeleri gerekmektedir. Bu lektin işaretlenmeleri floresan mikroskopta görmek için çeşitli floresans boyalar, elektron mikroskobunda görmek için ise koloidal altın partiküllerinin lektinlere bağlanarak görünür hale getirilmeleri yöntemlerinden sadece birkaçıdır (Deveci ve Karaçalı, 2006).

**Hücrelerde sentezlenen proteinlerin olgunlaşmasında**, en önemli çeviri sonrası (posttranslasyonel) modifikasyonlardan birisi glikozilasyondur. Biyolojik olarak aktif birçok proteinde olduğu gibi hormon proteinlerine de oligosakkaritler bağlanır. Omurgalılarda lutropin, follitropin ve tiotropin hormonları glikoproteinlerdir. N- ve O- hormon proteinlerinin hücre içinde biyosentezi, katlanması, bir araya gelmesi (dimerizasyon) salgılanması, yarı-ömrün

belirlenmesi, bio-aktivitesinin düzenlenmesi (Ulloa-Aguirre A. ve ark. 1999, 2001) ve sinyal aktarımında önemli rol oynar. Bu hormonlardaki sülfasyon ve sializasyon farklarının da hormonların bio-aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir. Bu bilgilerin ışığında böcek nörohormonlarında glikozilasyon ve önemini belirleyen bir çalışma bulunmadığından, benzer mekanizmaları böcek hormonlarında da araştırabilmek için, bu çalışmada böcek beyin nörosekresyon hücrelerinde sialik asidin bulunup- bulunmadığı araştırılmıştır.

Bu çalışmanın planlamasının nedeni; protorasik bezlerde lektinlerle Sia belirlenmeleri sırasında bezin yapısına katılan aksonlar içinde lektin bağlı altın partiküllerinin görülmüş olmasıdır. Bu gözlem, Sia'nın aksonların onjinlendiği hücrelerde de bulunabileceğinin işaretidir. Tüm ön bilgilerin ışığında bu çalışmanın amacı; *G.melonella*'nın PIC bölgesinde ve nörosekresyon hücrelerinde mikroskopik ve analitik yöntemlerle sialik asidlerin bulunup-bulunmadığını belirlemektir. Elde edilecek bilgiler nörohormonların böcek gelişimindeki önemleri nedeniyle, zararlı böceklerle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesi yollarını açabilir.



## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Böcek kültürünün yetiştirilmesi

Çalışma materyali, tam metamorfoz geçiren *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'dır. *G.mellonella*,  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklık ve doğal nemde, karanlıkta, büyük boy (16 cm) petri kutuları içinde sentetik besinle beslenerek yetiştirildi (Fröbius vd., 2000) (Şekil 2.1). Hayat döngüsünde yumurtanın açılmasından sonra sırasıyla larva, prepupa, pupa ve ergin evreleri (instar) bulunur. Kültür koşullarına bağlı olarak larval evre sayısı 5-7 arasında değişir. Prepupa evresinde larval dokular yaşlanır ve pupa evresinin ilk yarısında yok olurlar. Pupa evresinde ergin dokuları yeniden yapılırlar. Bu dönem özel bir postembriyonik dönemdir. Pupa döneminin deri değişiminden sonra böcekler bir haftalık kısa bir ergin dönemi yaşar.



Şekil 2.1: Sentetik besin içinde *G.mellonella* kültürü.

### 2.1.2 Uygulamalar için materyalin hazırlanması

Bu çalışmada beyinin pars interserebralis (PIC) bölgesinde bulunan nörosekresyon hücrelerinin sialik asitlerin (Sia) varlığını belirlemek amacıyla 3.evre larva, son evre larva ve ergin yapılarının oluşturulduğu pupal dönemin 6.günü ve ergin evreler seçildi (Şekil 2.2). İncelediğimiz evrelere ait böcekler stereo mikroskop altında beyin diseksiyonu yapılarak kullanılan yöntemlere uygun olarak farklı solüsyonlara alındı. Binoküler altında PIC bölgesi olabildiğince küçültüldü. kullanılan *Galleria mellonella* evreleri şekil 2.2’de işaretlenmiş.

## 2.2 Yöntemler

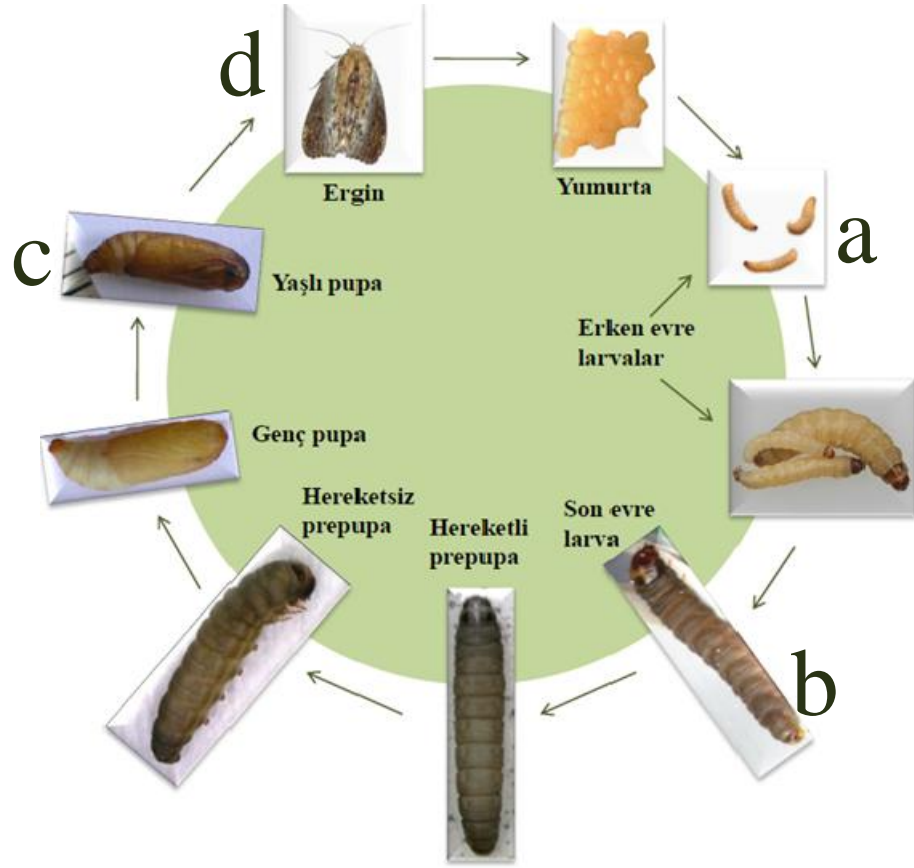
Nörosekresyon hücrelerinin böcek beyinde en geniş bölge olarak yer aldığı PIC bölgesinde sialik asitlerin bulunup-bulunmadığı iki mikroskobik biri analitik olmak üzere üç yöntemle aranmıştır.

### 2.2.1 Mikroskobik yöntemlerle sialik asit belirlenmesi

Bu yöntemler, lektinlerin şekerleri glikozidik bağ tipini de çok seçici olarak tanınmasından faydalanarak uygulanır. Çalışmada floresan ışığa veren lektinler ile altın işaretlenmiş lektinler sırasıyla floresan mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu incelemeleri için kullanılmıştır.

#### 2.2.1.1 kullanılan Lektinler

Lektinler, oligosakkarit dizilerinin en uç kısmında yer alan şekerleri, alttaki şekerle oluşturulan glikozidik bağ tipini de seçici olarak tanıyarak bağlanırlar. Sialik asitleri işaretlemek için bütün sialik asit tiplerine bağlanan *Limulus polyphemus* agglutinin (LPA) lektini ile, Sia’ları alttaki şekerle bağlayan glikozidik bağ tipini de tanıyan lektinlerden, *Maackia amurensis* agglutinin (MAA, Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc dizisi için özel) ve *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, Neu5Ac $\alpha$ 2,6Gal/GalNAc dizisi için özel) seçildi. Floresan mikroskopta ve Elektron mikroskobunda incelemek için; bu lektinlerin sırasıyla floresan işaretli (FITC) ve altın işaretli olanları kullanıldı (Çizelge 2.1).



**Şekil 2.2:** *Galleria mellonella* 'nın hayat döngüsü. (çalışma sürecinde incelenen evreleri. a, 3.evre larva; b, son evre larva; c, 6. gün pupa; d, ergin).

**Çizelge 2.1:** Çalışmada kullanılan lektinlerin şeker spesifikliği ve uygulanan tamponları.

Lektin Adı	Kısaltması	Şeker Spesifiği	Tampon
<i>Limulus polyphemus</i> agglutinin	LPA	Bütün Sialik Asitler	TBS
<i>Maackia amurensis</i> agglutinin	MAA	Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc dizisi için özel	PBS
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	SNA	Neu5Ac $\alpha$ 2,6Gal/GalNAc dizisi için özel	PBS

### 2.2.1.2 Floresan Mikroskop (FM) Yöntemleri

**Frozen kesitlerde işaretleme** için; diseksiyonu yapılan beyinler frozen mikrotoma özel gömme ortamına alınıp  $-25^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu. Frozen mikrotomda 5  $\mu\text{m}$  kalınlığındaki kesitler lizinli lamalar üzerine alınarak işaretleme serisi uygulandı. İşaretleme için kesitler TBS yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra bloklama tamponuna alındı. Ardından oda sıcaklığında ve nemli odacıkta aynı tamponda hazırlanmış floresan işaretli (FITC) LPA lektin ile karşılaştırıldı. Üç kez TBS ile yıkandıktan sonra gliserin ile kapatılarak Leica DM 4000B floresan ataçmanlı araştırma mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

**Lowicryl kesitlerde işaretleme** için; elektron mikroskobu için paraformaldehit (PA) ile tesbit edilip Lowicryl'e gömülmüş örneklerden lizinli lamalar üzerine alınan 0.75  $\mu\text{m}$ 'lik kesitler kullanıldı. Kesitler PBS yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra bloklama tamponuna alındı. Ardından oda sıcaklığında ve nemli odacıkta aynı tamponda hazırlanmış floresan işaretli (FITC) MAA ve SNA lektinleri ile karşılaştırıldı. Üç kez PBS ile yıkandıktan sonra gliserin ile kapatılarak Leica DM 4000B floresan ataçmanlı araştırma mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

### 2.2.1.3 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Yöntemi

Sialik asitlerin TEM de gösterilmesi için akrilik reçinelere gömülmüş materyalden alınan ince kesitler üzerine lektin uygulaması (post-embedding labeling) yöntemi uygulandı. Bunun için; dokuların diseksiyonu PBS ile hazırlanmış %4'lük paraformaldehit içinde yapıldı. Aynı solüsyonda ( $+4^{\circ}\text{C}$ 'de) tespit edilmiş ve PBS ile tespit solüsyonunun uzaklaştırılmasından sonra  $0^{\circ}\text{C}$ 'den başlayarak  $-20^{\circ}\text{C}$  ve  $-35^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar düşürülen sıcaklıklarda, yükselen etil alkol serileri ile dehidratasyon gerçekleştirildi. Değişen oranlarda alkol-Lowicryl HM20 reçine karışımlarında bekletilerek saf reçinenin nüfusunun (infiltrasyon) tamamlanmasının ardından örnekler aynı reçineye gömüldü. Daha sonra sırası ile  $-35^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat ve  $20^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat süre ile 360 nm uzun dalga UV ışık altında polimerize edildi. Bu işlemler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den itibaren "Automatic Freeze Substitution System" cihazında (Leica EM AFS) gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Polimerize olan

bloklardan gritler üzerine alınan ince kesitlere 10 nm koloidal altın bağılektinler uygulandı. Bunun için, kesitler PBS ile yıkandıktan sonra bloklama tamponuna alındı ve ardından aynı tamponda hazırlanmış olan Sia'ya özgün altın bağı lektinlerle (MAA ve SNA) oda sıcaklığında ve nemli odacıkta karşılaştırıldı (Deveci vd., 2004; Deveci ve Karaçalı, 2006). Üç kez PBS ile yıkamanın ardından kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat (Reynolds, 1963) ile boyandı. Jeol 100C TEM'de incelenen örneklerde altın partikülleri aranarak mikrografları çekildi.

### **2.2.2 Analitik yöntemle (Cap LC-ESI-MS/MS) sialik asit belirlenmesi**

Sialik asitlerin tiplerini ve miktar değişimlerini belirlemek için Kapiler HPLC - Elektro Sprey İyonizasyon - Kütle Spektroskopisi (CapLC-ESI-MS/MS) sistemi ile çalışıldı (Şekil 2.4). İncelenen her bir evre için ortalama 80 böcek insect salin içinde disekte edildi ve çıkarılan beyinler olabildiğince küçültülerek PIC bölgeleri metanole alındı. Ardından örnekler kuruyuncaya kadar azot gazı ile metanolleri uçuruldu. İşlem sonrasında her bir evre için ortalama 4 mg örnek elde edildi.



Şekil 2.3: "Automatic Freeze Substitution System" cihazı.



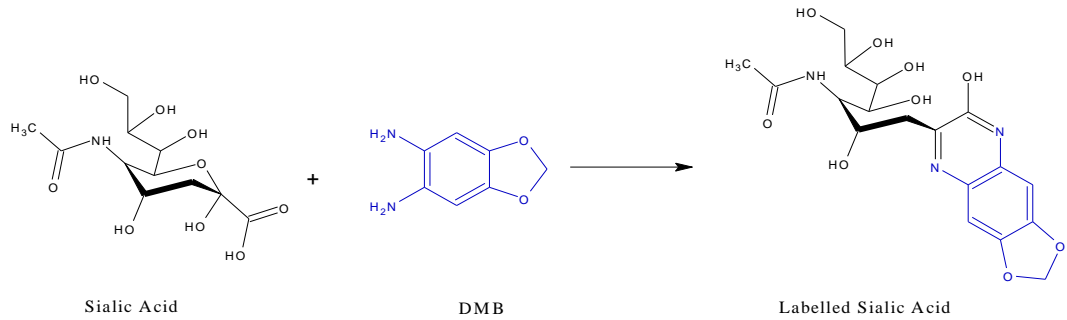
Şekil 2.4: Kapiler HPLC - Elektro Sprey İyonizasyon - Kütle Spektroskopisi.

### 2.2.2.1 Homojenizasyon ve Hidroliz:

Hidroliz için yaygın olarak kullanılan asit hidroliz yöntemi uygulandı. Bu yöntem hücrelerdeki glikokonjugatlara bağlı sialik asitlerin bağlarının ortaderecede kuvvetli asidik ortamda koparılıp serbest bırakılmasını sağlar. 1 mg/5µl olacak biçimde 2M asetik asit solüsyonu ilave edilip sonikatörde 15 dak. homojenize edildi. Ardından hidroliz edilmek üzere 80°C’de 3 saat bekletildi.

### 2.2.2.2 Örneklerin Türevlendirilmesi:

DMB (4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich) çözeltisi (1,4 M asetik asit, 0,75 M β-mercaptoethanol, 18 mM sodyum hidrosulfit) taze olarak hazırlanarak kullanıldı. DMB çözeltisi yukarıda elde edilen homojenata 1:2 oranında ilave edildi. Serbest kalan sialik asit çeşitlerinin DMB ile türevlenme reaksiyonuna girmesi amacıyla örnekler 60°C de 2.5 saat karanlıkta inkübe edildi (Şekil 2.5). Türevlendirme reaksiyonu sona erdikten sonra örnekler 16300 rpm ile 20 dakika 4°C’de santrifüj (Sigma 3K30) yapıldıktan sonra CapLC-ESI-MS/MS de analiz edildi. Sialik asit standartları hidroliz yapılmadan doğrudan türevlendirilerek cihaza verildi. (Referans olarak standart sialik asit türlerinden N-asetil nöraminik asit (Neu5Ac Sigma A-9646) ve N-glikolil nöraminik asit (Neu5Gc Sigma G9793) kullanıldı (şekil 2.6).



**Şekil 2.5:** Sialik asidin, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxy-benzene (DMB) ile türevlendirilme reaksiyonu.

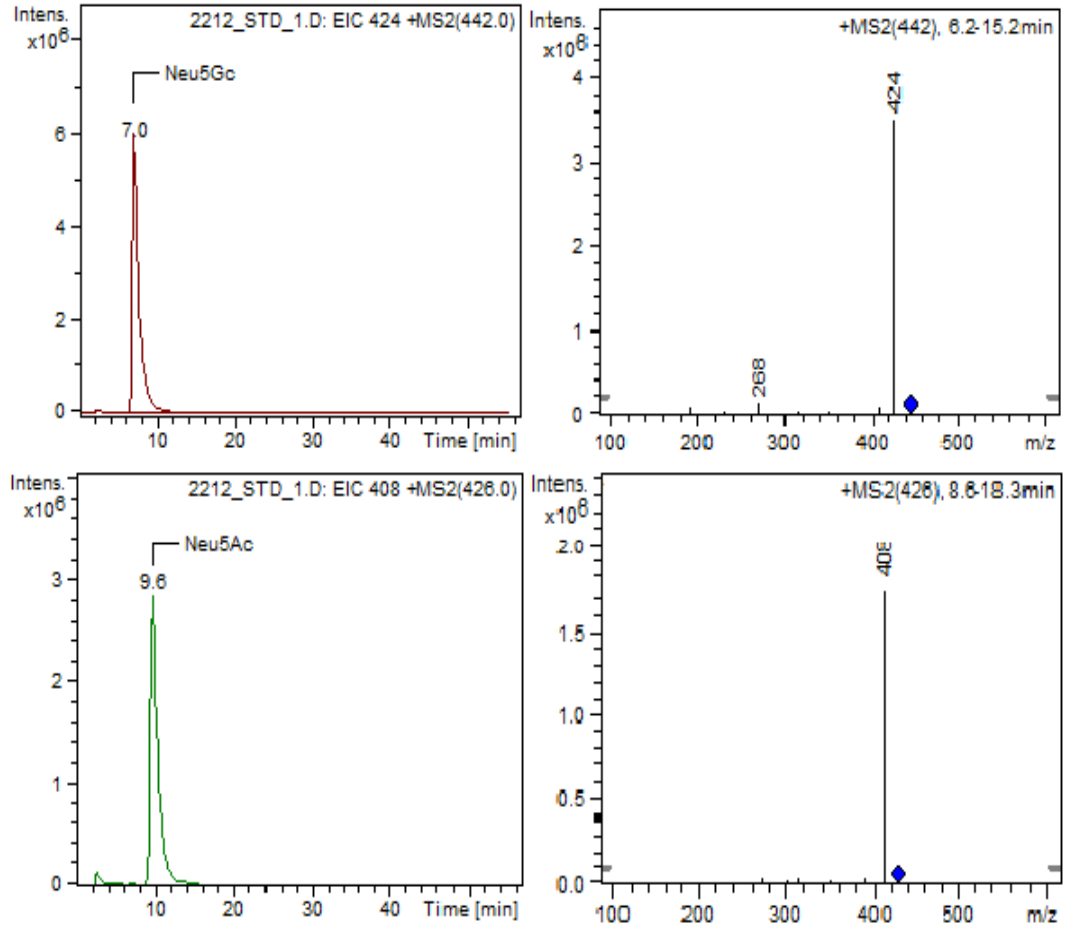
### 2.2.2.3 Kapiler LC-ESI-MS/MS iyon trap parametreleri:

Sıvı kromatografi sistemi Agilent 1200 Capillary seri ikili pompa, degaser, soğutmalı oto örnekleyici birimlerinden oluşmuştur (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Kütle spektrometresi ölçümleri HCT Ultra iyon trap sisteminde (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) pozitif modda yapıldı. Analitik ayırma işlemleri için ODS Analitik kolon (Agilent ZORBAX SB-C18 150 x 0.5 mm, 5µm, USA) kullanıldı.

Örnekler analiz boyunca 5°C'ye soğutulmuş otomatik örnekleyicide saklı tutuldu. 1.0 µl sialik asit örneği, mobil faz bileşimi metanol- asetonitril- su (7,5: 5: 87,5 v/v) şeklinde olan kolon sistemine enjekte edilmiştir. Mobil faz akış hızı 20µl/dk ve kolon sıcaklığı oda koşullarıdır. Toplam analiz süresi 50 dakikadır.

LC sistem elektro sprey iyonizasyon ara yüzeyine bağlıdır. Spektrometrik koşullar Esquire Control 6.1 yazılımı ile otomatik olarak ayarlandı. Nebulizer ve kurutma gazları azot ve iyon trap parçalama gazı olarak helyum (% 99,9 saflıkta) kullanıldı. Kurutma gazı 310°C Nebulize basıncı 15.0 psi ve kurutma gazı akışı 5l/dk olarak belirlendi. Kütle spektrumları 200-600 m/z aralığında 26000 m/z/sn tarama hızında gerçekleştirildi.





Şekil 2.6: Neu5Gc ve Neu5Ac için standart kromatogram ve spektrumları.

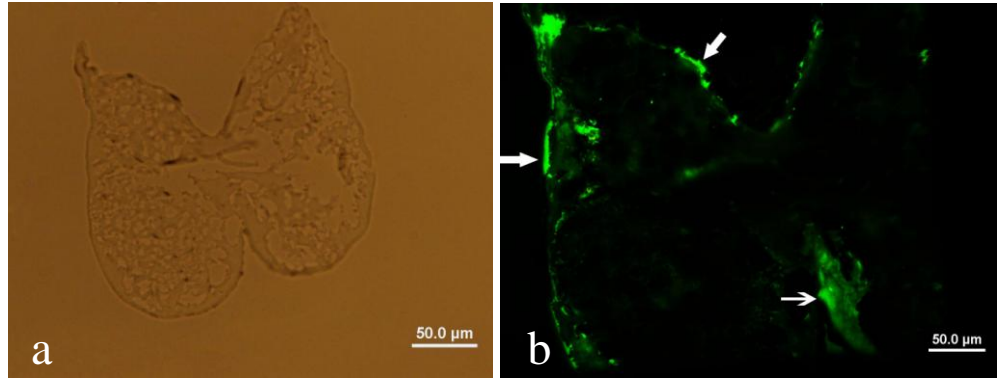
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Mikroskopik Yöntemlerle Sialik Asit Belirlenmesi

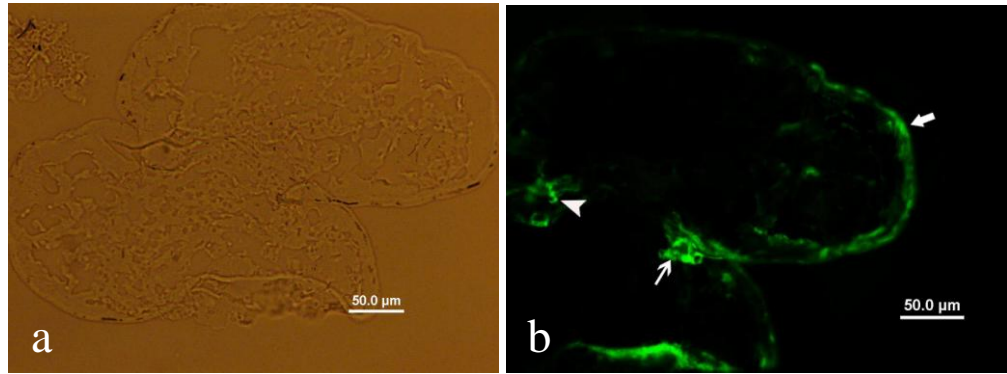
##### 3.1.1 Floresan mikroskopta lektin işaretlemeleri ile sialik asit belirlenmesi

**Frozen kesitlerde:** Floresan mikroskopla pars interserebralis (PIC) bölgesinde sialik asit olup-olmadığını belirleyebilmek için, önce tüm sialik asit (Sia) tiplerini tanıyan floresan işaretli (FITC) (Bkz. Çizelge 2.2) *Limulus polyhemus* agglutinin (LPA) kullanılmıştır. Lektin uygulanmış Frozen kesitlerde mikroskop altında bölgeyi tanımak için önce boyasız sonra da floresan lamba ile incelenmiştir. Bu uygulamaların sonuçlarına göre; en yoğun ışıma, incelenen 3.evre (Şekil 3.1 a ve b), son evre larva (Şekil 3.2 a ve b) ve ergin (Şekil 3.3 a ve b) beyinlerini dıştan saran stromalarında görülmüştür. PIC bölgesinin gözlenebilen hücrelerinde ışıma özellikle nukleuslarında belirgindir. Bunların dışında beynin lateral bölgelerinde ve PIC'nin ventralinde yer alan hücrelerinde de ışıma tesbit edilmiştir (Şekil 3.2 a ve b).

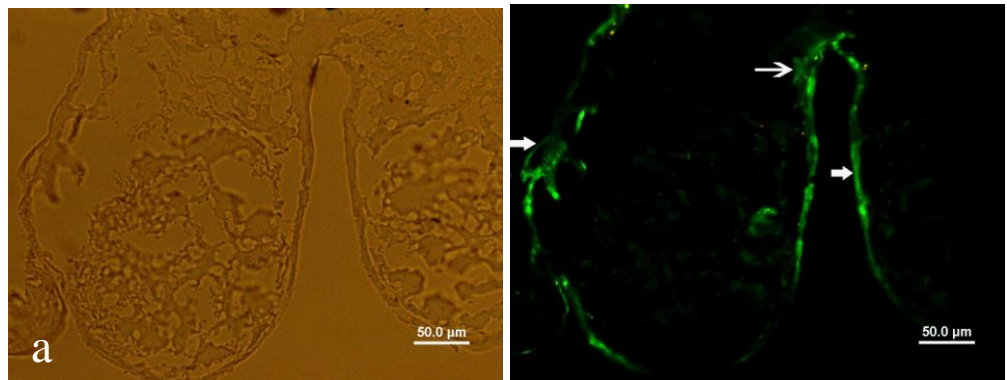
**Lowicryl kesitlerde:** Frozen kesitlerde PIC bölgesinde sialik asidin bulunduğu anlaşıldıktan sonra Sia'ların glikozidik bağ tiplerini belirlemek amacıyla FITC işaretli lektinler lowicryl'e gömülmüş yarı ince kesitler üzerine uygulanmıştır.  $\alpha$ 2,3 bağlı sialik asidi belirleyen MAA lektin uygulamasında elde edilen sonuçlara göre son evre larvanın PIC bölgesinde nukleus ve sitoplazmalarda yaygın bir ışıma görülmüştür (Şekil 3.4).  $\alpha$ 2,6 bağlı sialik asidi belirleyen SNA uygulaması sonucunda ise nukleuslarda belirgin bir ışıma görülmüştür (Şekil 3.5) fakat, MAA uygulamasındaki ışıma daha yoğundur.



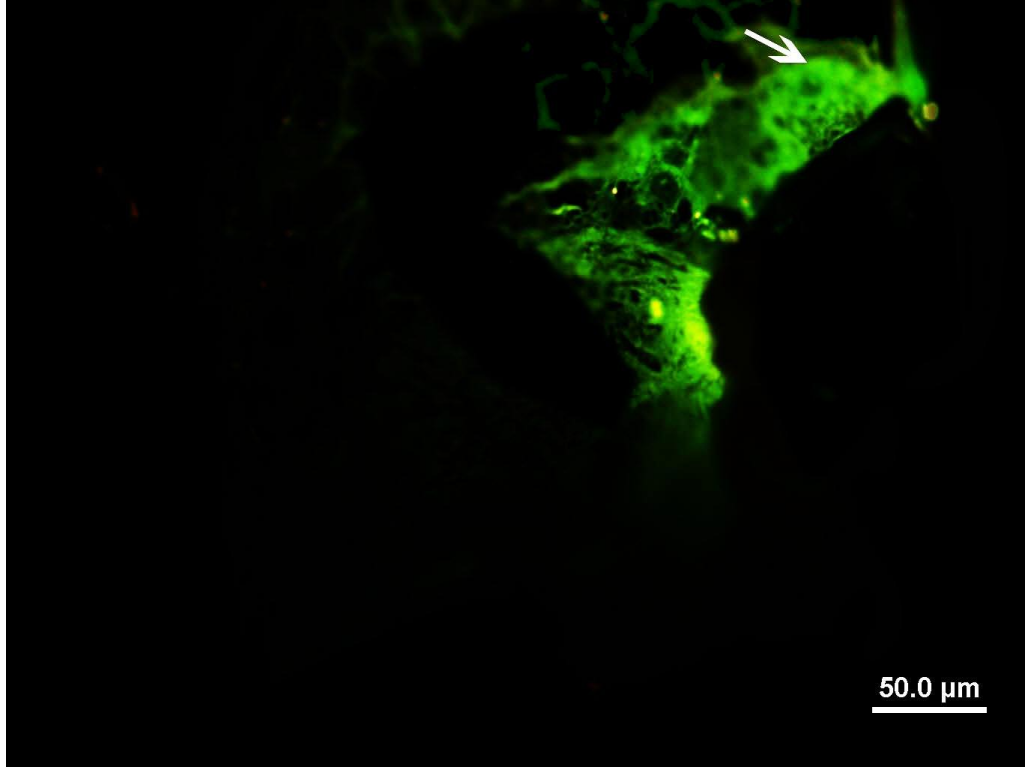
**Şekil 3.1:** 3.evre larval beyin, frozen kesit. a. Boyasız, b. LPA lektin uygulaması, ➔Nöral lamella, ➔PIC'de ışım.



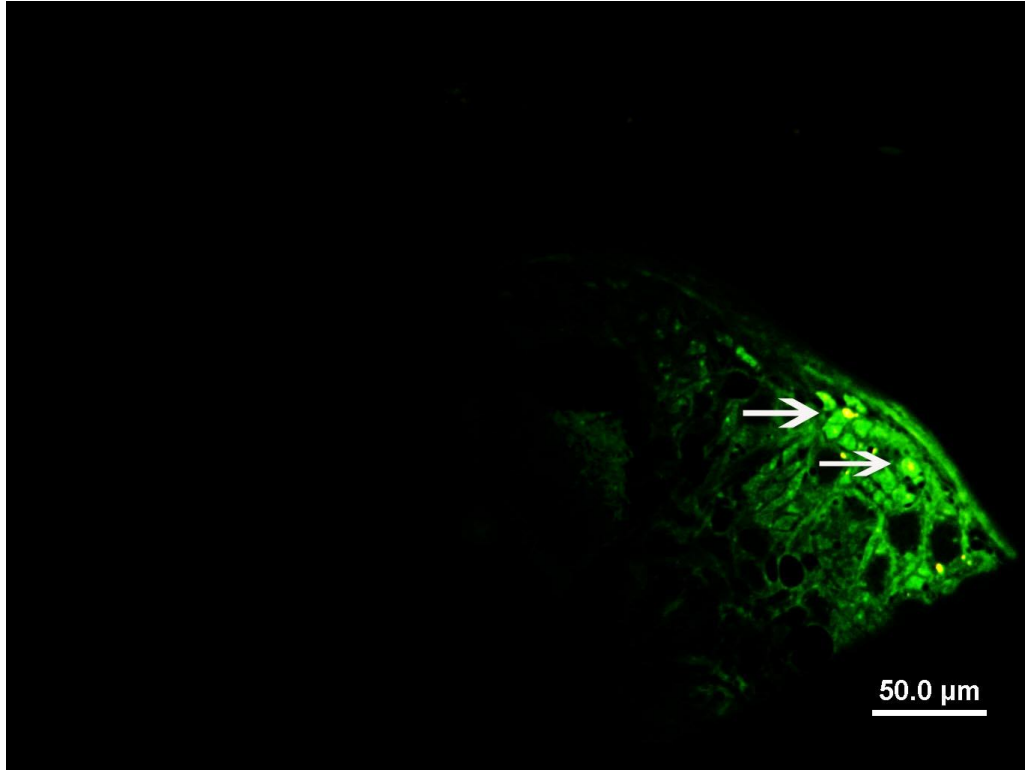
**Şekil 3.2:** Son evre larval beyin Frozen kesit. a. Boyasız, b. LPA lektin uygulaması, ➔Nöral lamella, ➔PIC, ➤ beynin lateral bölgesinde ki hücrelerin'de ışım.



**Şekil 3.3:** Ergin beyin. Frozen kesit. a. Boyasız, b. LPA lektin uygulaması, ➔Nöral lamella, ➔PIC'de ışım.



Şekil 3.4: Son evre larval beyin, lowicryl kesit, MAA uygulaması, →PIC’de ışıma.



Şekil 3.5: Son evre larval beyin, lowicryl kesit, SNA uygulaması, →Nukleuslarda ışıma.

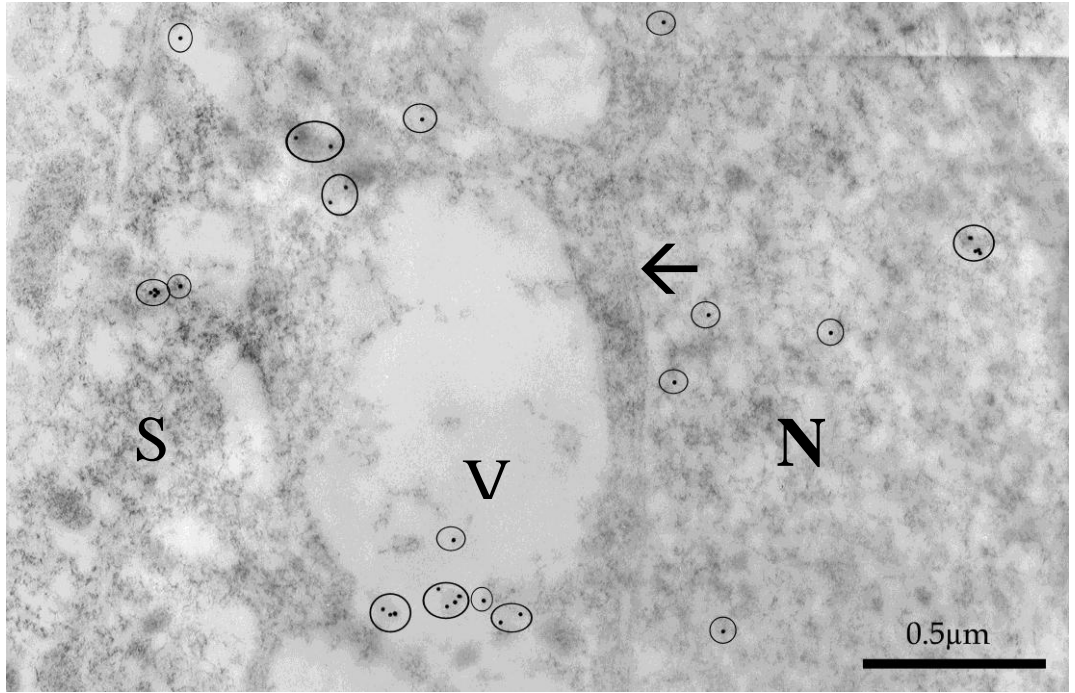
### 3.1.2 Transmisyon elektron mikroskobunda lektin işaretlemeleri ile sialik asit belirlenmesi

Floresan mikroskop sonuçlarını göz önüne alarak, transmisyon elektron mikroskobu (TEM)nda PIC bölgesinde Sia'ların hücre içi dağılışını izlemek için altın bağı MAA ve SNA lektinleri (Bkz. Çizelge 2.2) kullanıldı. İşaretlemeler 3.evre ve son evre larva böceklerin Lowicryl ince kesitlerinde yapıldı.

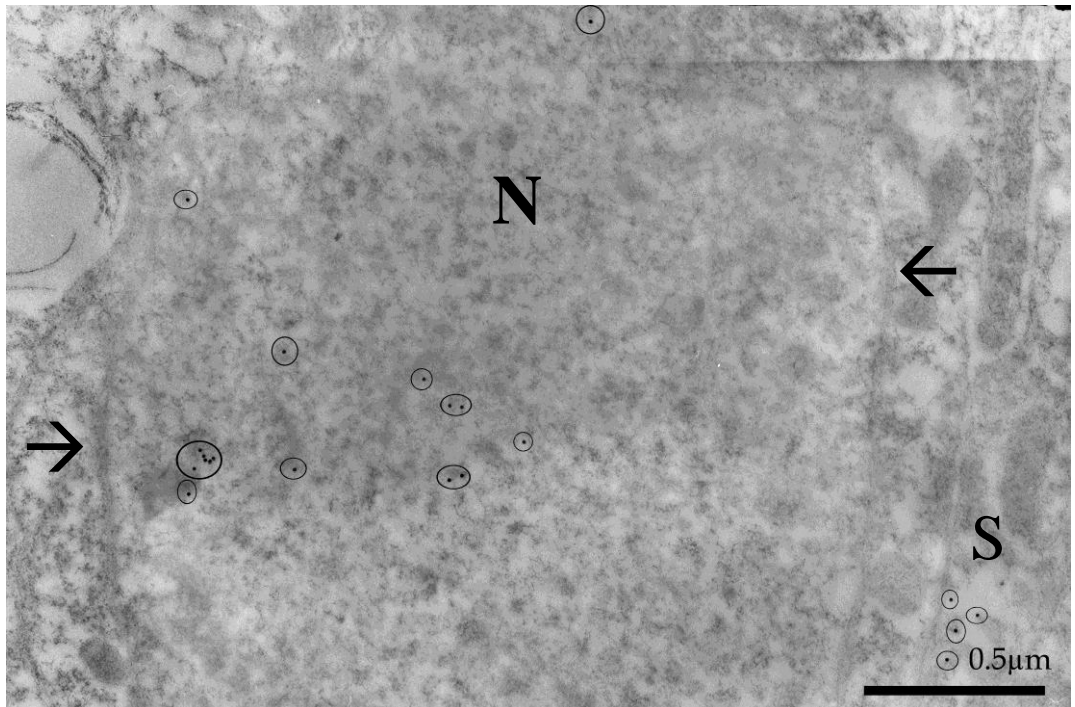
3.evre MAA uygulaması sonucunda floresan işaretlemeyi doğrular şekilde nukleus içinde oldukça boldur (Şekil 3.6, Şekil 3.7) altın partikülleri çoğu kromatine bağı bulunmaktadır. Sitoplazmada bulunan altın partikülleri sitosolde ve lipit karakterli büyük vakuollerin içinde bulunmuştur. PIC de nörosekresyon hücrelerinin granül iç yapısına göre tiplere ayrıldığı bilinir. Daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiş olan elektronca az yoğun, gri ve elektronca yoğun nörosekresyon granülerine (Karaçalı, 1973, 1976) sahip olan iki tip hücrede de altın partikülleri bulunmuştur. Lowicryl ortamında elektron yoğunluğu bakımından oldukça açık renkte görülen granüller olasılıkla Epon kesitlerdeki gri iç yapıya sahip granüllere denk düşmektedir. (Şekil 3.8, Şekil 3.9). Altın partikülleri sitosolde (Şekil 3.8) ve Golgi sahasında (Şekil 3.9) görülmektedir. Elektronca yoğun nörosekresyon granülleri içeren hücrelerde altın partikülleri sitosolde bulunduğu gibi nörosekresyon granülleri üzerinde, mitokondrilerde (Şekil 3.10), lipit vakuollerinde (Şekil 3.11) bulunmuştur.

3.evre SNA işaretlemelerinde nörosekresyon hücrelerinde altın partikülleri, MAA uygulamalarının sonucuna göre daha az bulunmuştur. Floresan mikroskop sonuçlarını destekler şekilde altın partikülleri nukleus içinde kromatine bağı yer almaktadır (Şekil 3.12). Sitoplazmada az sayıdaki altın partikülleri sitosolde, mitokondride (Şekil 3.13) ve nörosekresyon granüllerinde (Şekil 3.14) bulunmuştur.

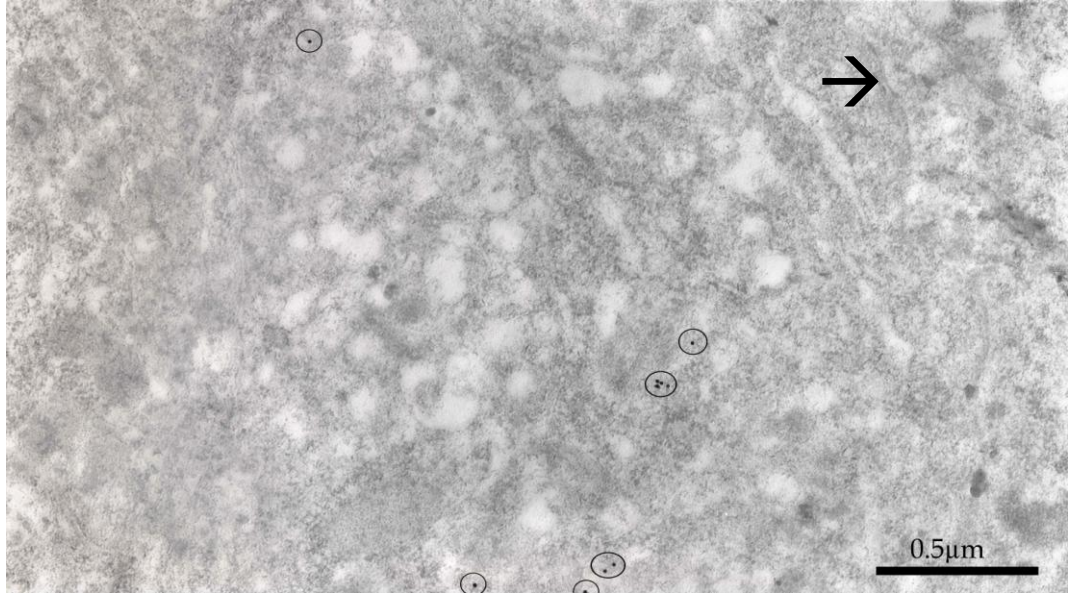
Son larval evredeki beyinlere uygulanan lektinlere bağlı altın partikülleri genel olarak 3.evrede bulunanlara göre daha azdır. Her iki uygulamada da altın partikülleri nörosekresyon hücrelerinin sitosol nde görülmüştür (Şekil 3.15, Şekil 3.16). İki uygulama karşılaştırıldığında SNA bağlı altın partikülleri çok daha az bulunmuştur. Nörosekresyon granüllerinde ise her iki lektin uygulamasında da altın partikülleri yok denecek kadar azdır.



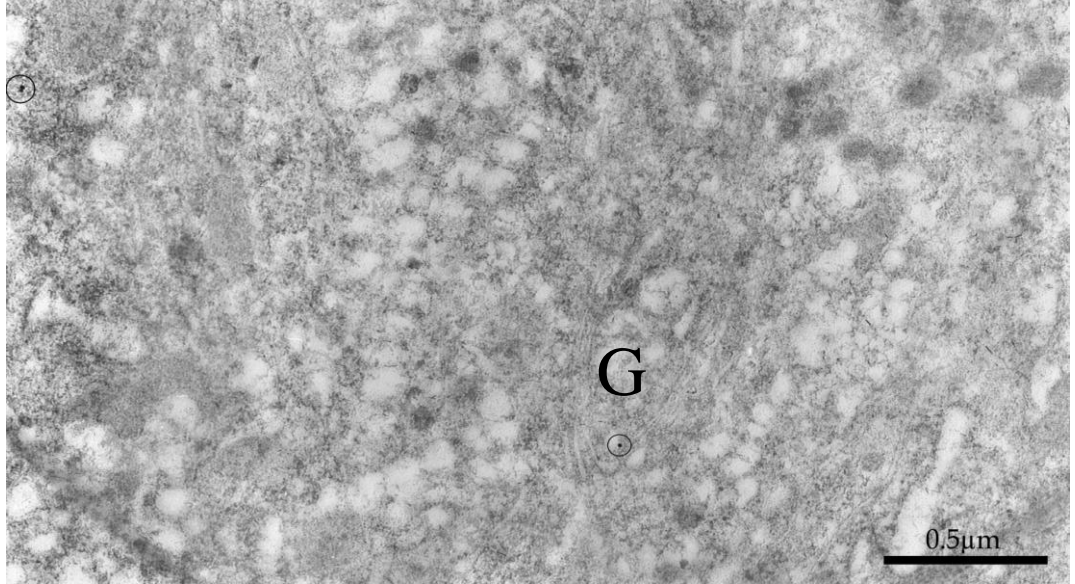
**Şekil 3.6:** 3.evre larval beyin, MAA Lektin uygulaması, Elektronca az yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); → nukleus kılıfı Nukleusta (N) sitosolde (S) ve lipit karakterli vakuol (V) ve altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)



**Şekil 3.7:** 3.evre larval beyin, MAA Lektin uygulaması, Elektronca az yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); → nukleus kılıfı, Nukleusta (N), sitosolde (S) altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)

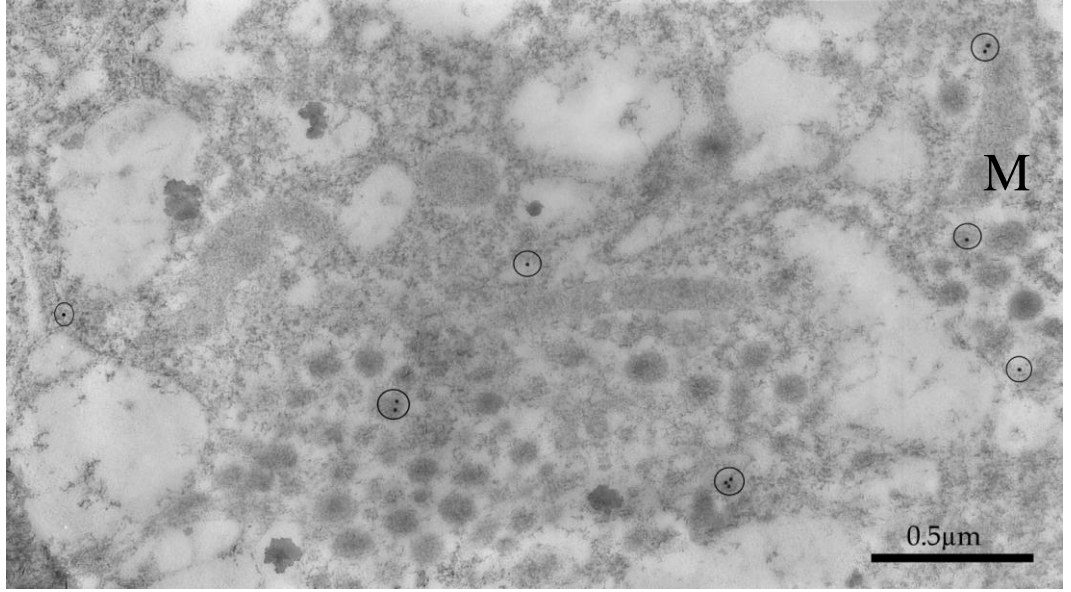


**Şekil 3.8:** 3.evre larval beyin, MAA Lektin uygulaması, elektronca yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); →Nukleus kılıfı, Sitosolde altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat-Kurşun sitrat)

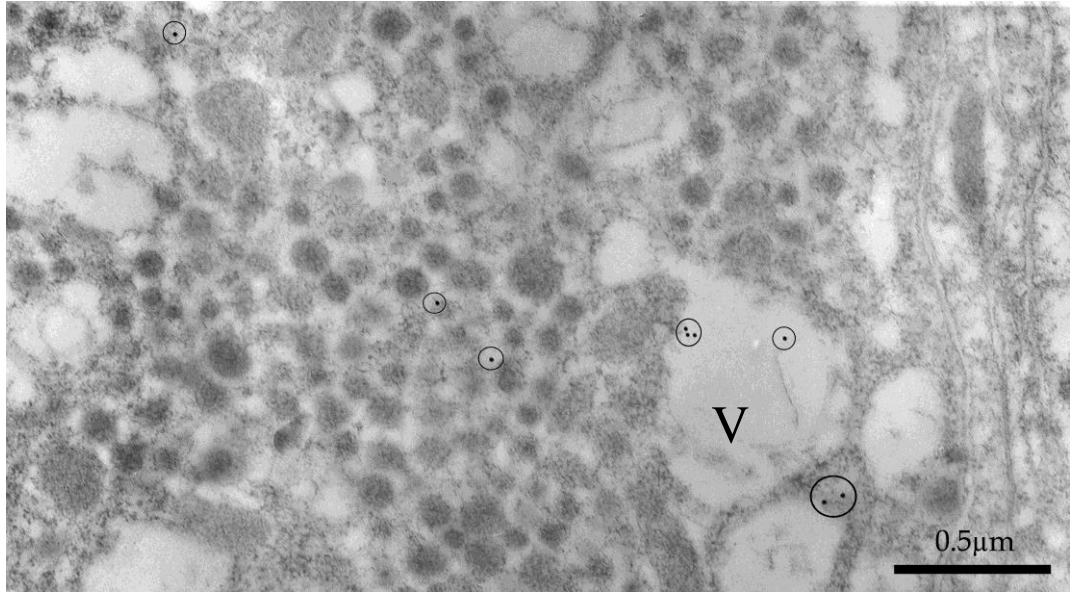


**Şekil 3.9:** 3.evre larval beyin, MAA Lektin uygulaması, Elektronca az granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); Sitosolde ve Golgi sahasında (G), altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)

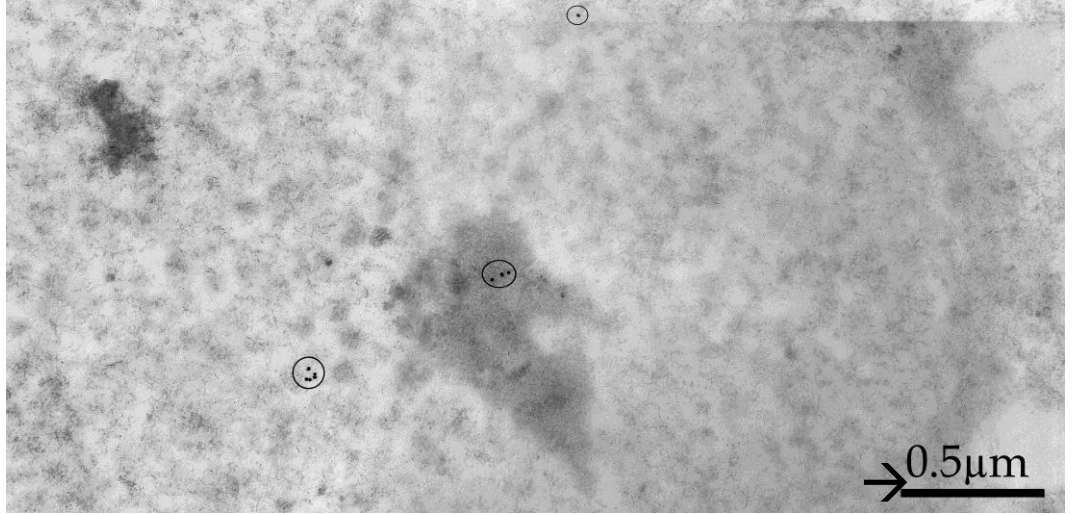




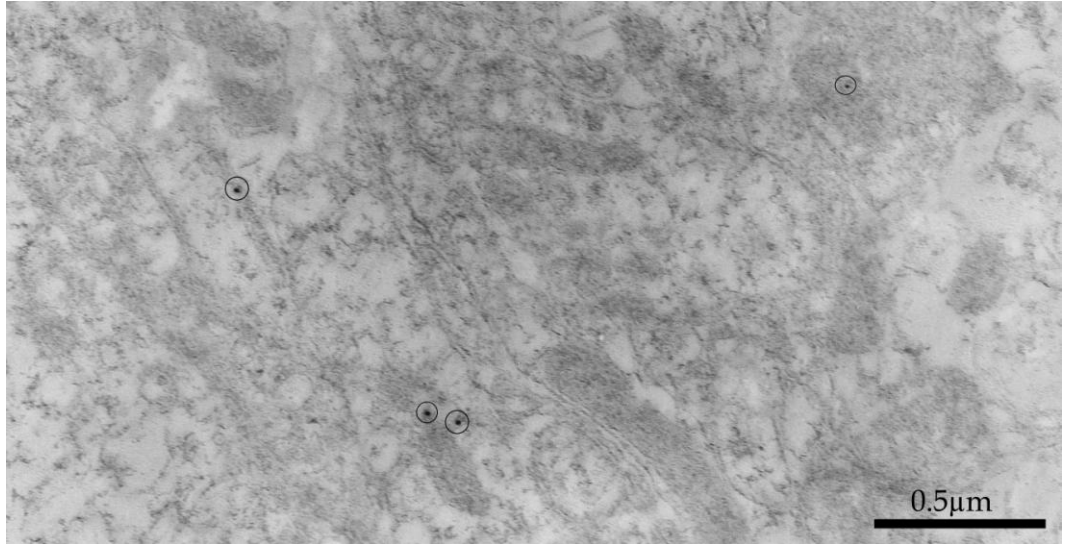
**Şekil 3.10:** 3.evre larval beyin, MAA lektin uygulaması, elektronca yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); Nörosekresyon granüllerinde ve Mitokondri'de (M) altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)



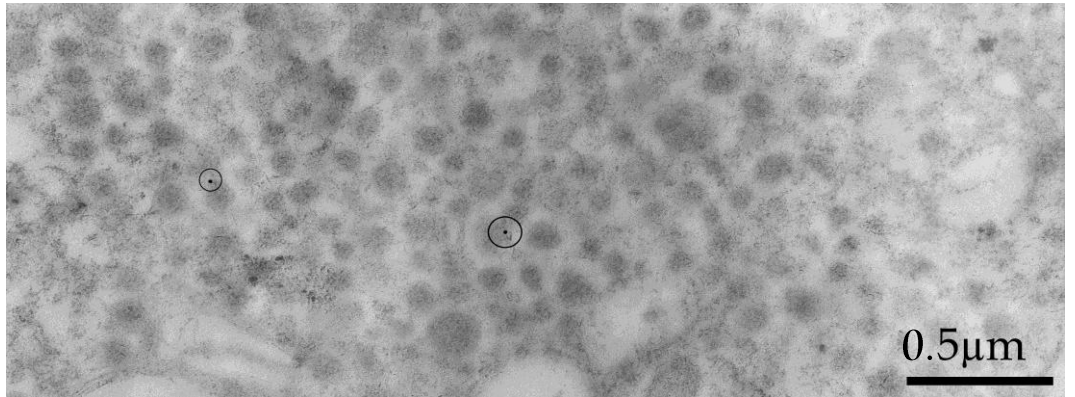
**Şekil 3.11:** 3.evre larval beyin, MAA Lektin uygulaması, Elektronca yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); Nörosekresyon granüllerinde, Vakuollerde (V) altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)



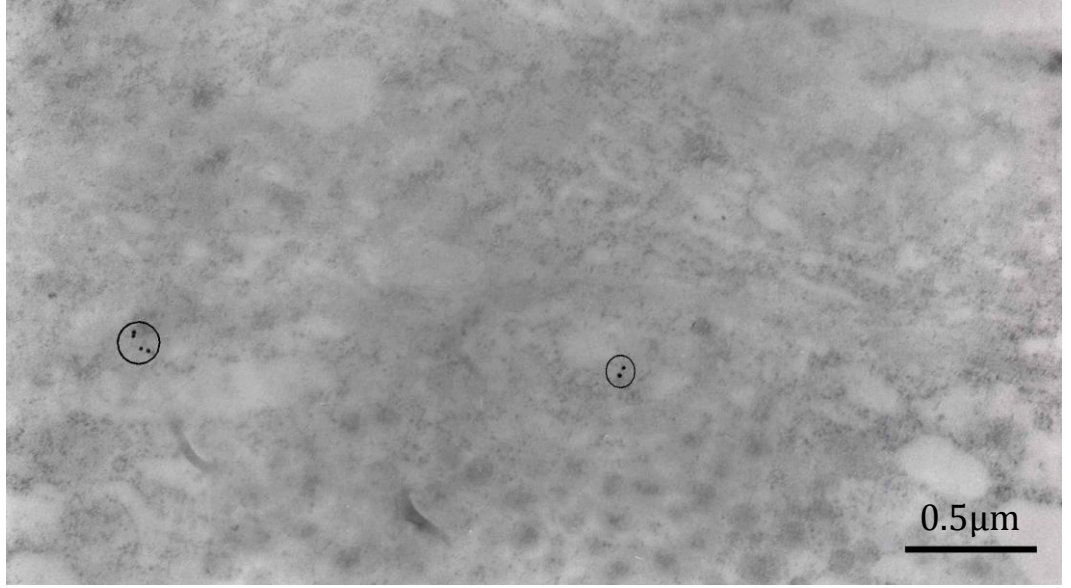
**Şekil 3.12:** 3.evre larval beyin, SNA Lektin uygulaması, Elektronca yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); →nukleus kılıfı, Sitosolde, ve Nukleus içinde kromatine bağlı altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)



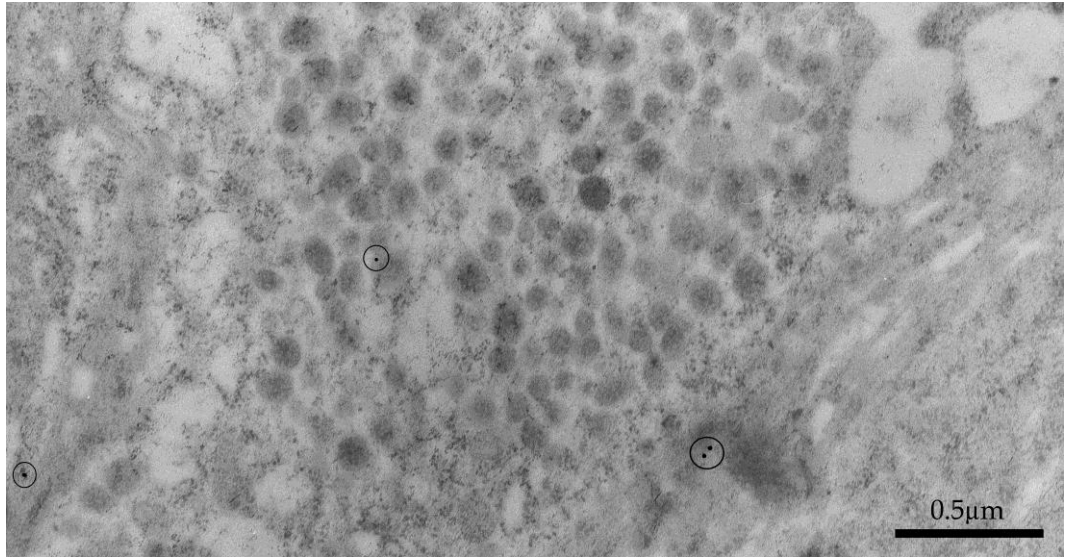
**Şekil 3.13:** 3.evre larval beyin, SNA Lektin uygulaması, Elektronca yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); sitosolde, altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)



**Şekil 3.14:** 3.evre larval beyin, SNA Lektin uygulaması, Elektronca yoğun granüllü nörosekresyon hücresi (NSH); Nörosekresyon granülerinde altın partikülleri (O). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)



**Şekil 3.15:** Son evre larval beyin, MAA Lektin uygulaması, Nörosekresyon hücresi (NSH); Sitosolde altın partikülleri (○). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)



**Şekil 3.16:** Son evre larval beyin, SNA Lektin uygulaması, Nörosekresyon hücresi (NSH); Sitosolde altın partikülleri (○). (Lowicryl kesit, Uranil asetat- Kurşun sitrat)

### 3.2 Analitik Yöntemle Sialik Asitlerin Belirlenmesi

*G.mellonella*'nın çalışılan 3.evre larva, son evre larva ve 6.gün pupa'dan çıkarılan PIC bölgelerinde Neu5Ac bulunmuştur (Şekil 3.17). 3.evre larvaya (Şekil 3.18) ait PIC bölgesinde ek olarak Neu5,9Ac<sub>2</sub> tip sialik asid de belirlenmiştir. Belirlenebilen sialik asit çeşitleri DMB türevlerine ait ana iyonlar ve parçalanma iyonları çizelge 3.1 'de gösterilmiştir. İncelenen evrelerde bulunan sialik asit tiplerine ait kromotogram ve spektrumlar da şekil 3.17'de görülmektedir.

*G.mellonella*'nın PIC bölgesinde Sia tiplerini belirlemede daha önce gerçekleştirilmiş standart materyal solüsyonlarında ve çok sayıda Sia çeşidi içerdiği bilinen sıçan çene altı tükruk bezi optimizasyon çalışmaları sonuçlarından yararlanılmıştır.

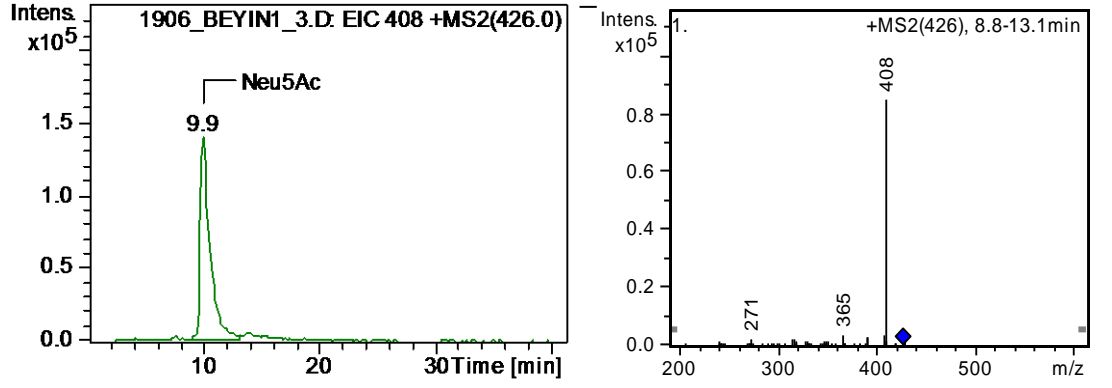
**Çizelge 3.1:** DMB türevlerine ait ana iyonlar ve parçalanma iyonları.

Sialik asit çeşitleri	[M+H] <sup>+</sup>	CID Parçalanma iyonları	
		[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Parçalanma iyonları
Neu5Ac	426	408	313-295-283-229
Neu5,9Ac <sub>2</sub>	468	450	313-295-229

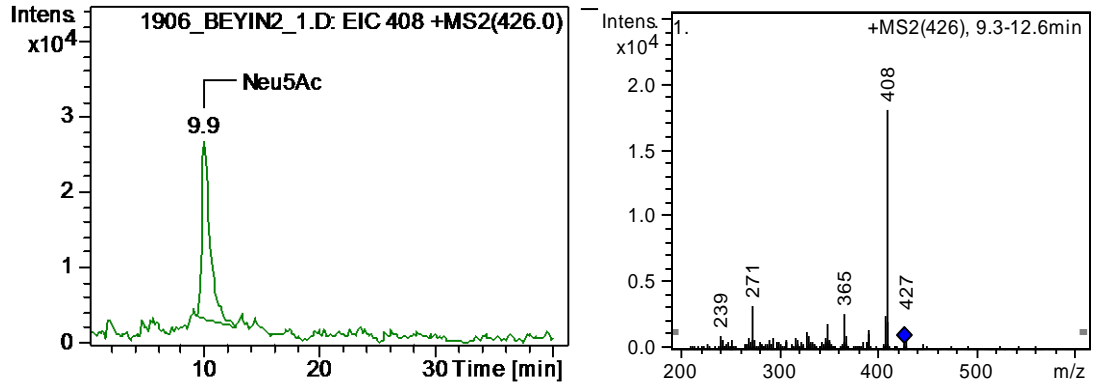
İncelenen evrelere ait Sia'ların kromotogramlarından elde edilen ortalama pik alan değerleri hesaplanarak sialik asit miktar analizi karşılaştırmaları yapılmıştır.

Neu5Ac, 3.evre larvada en yüksek, son evre larvada en düşük miktarda bulunmuştur. 6.gün pupada elde edilen değer son evre larvaya göre hafifçe artış göstermişse de, bu değer 3.evre'de bulunandan daha azdır (Şekil 3.19). Neu5,9Ac<sub>2</sub> sadece oranda 3.evre larva döneminde bulunduğundan karşılaştırma olanağı olmamıştır (Şekil 3.20).

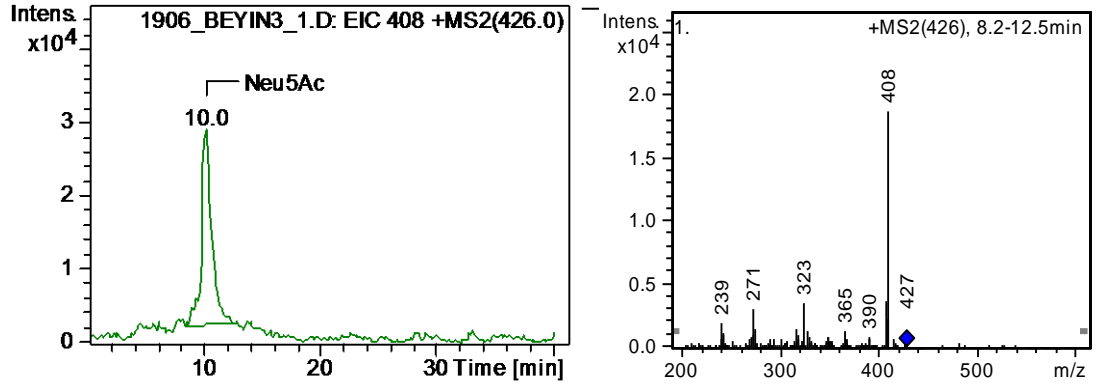
Sia tiplerini belirlemek için hazırlanan PIC bölgelerinde diğer Sia tiplerinin şekillenmesi için başlangıç molekülü olan Neu5Ac'nin üç evrede konsantrasyonları belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Hesaplanan değerler 3.evre larva, son evre larva ve 6.gün pupa'da sırası ile 7.6ng/mg, 1.1ng/mg ve 1.5 ng/mg dır (Şekil 3.21).



3.evre larva

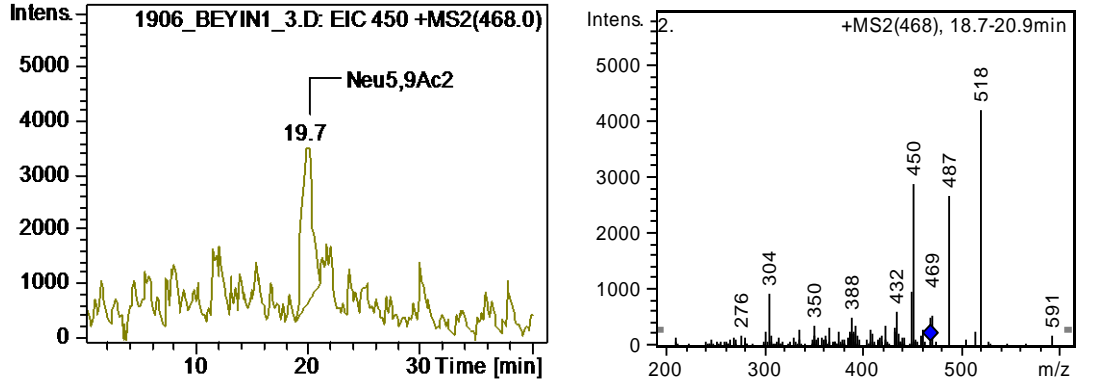


Son evre larva

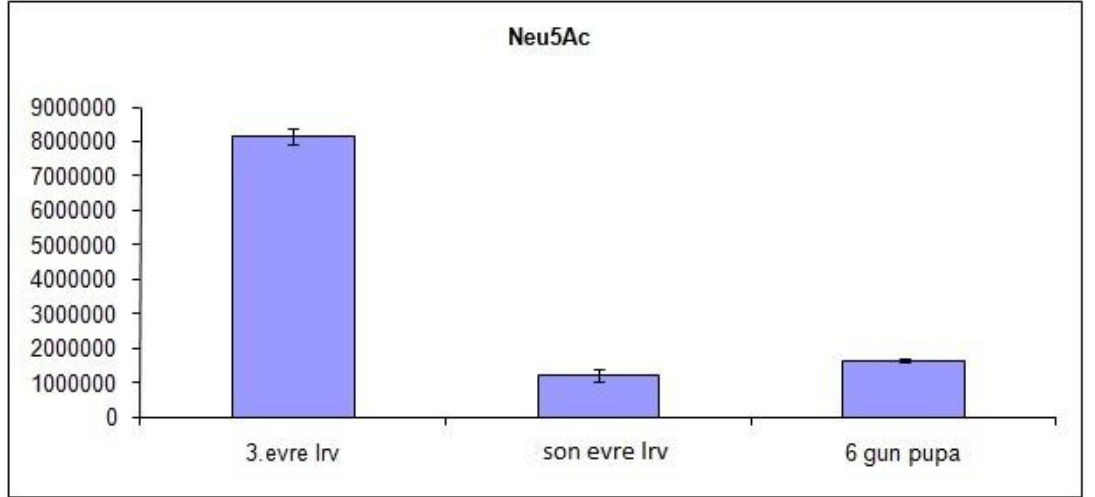


6.gün pupa

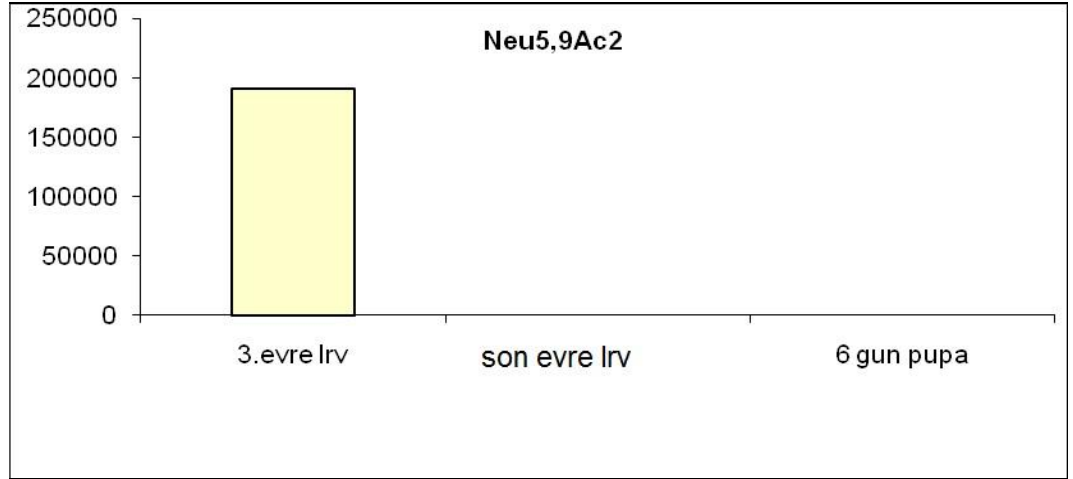
**Şekil 3.17:** *Galleria mellonella* beyin PIC bölgesinde bulunan DMB türevli Neu5Ac'nin CapLC-ESI-MS/MS kromatogram ve kütle spektrumları (Moleküler iyonları  $[M+H]^+$  (♦) işareti olarak sistemin programı tarafından koyulmaktadır ve doğrulama kütleleri ( $[M+H-H_2O]^+$ ); Neu5Ac için 408'dir).



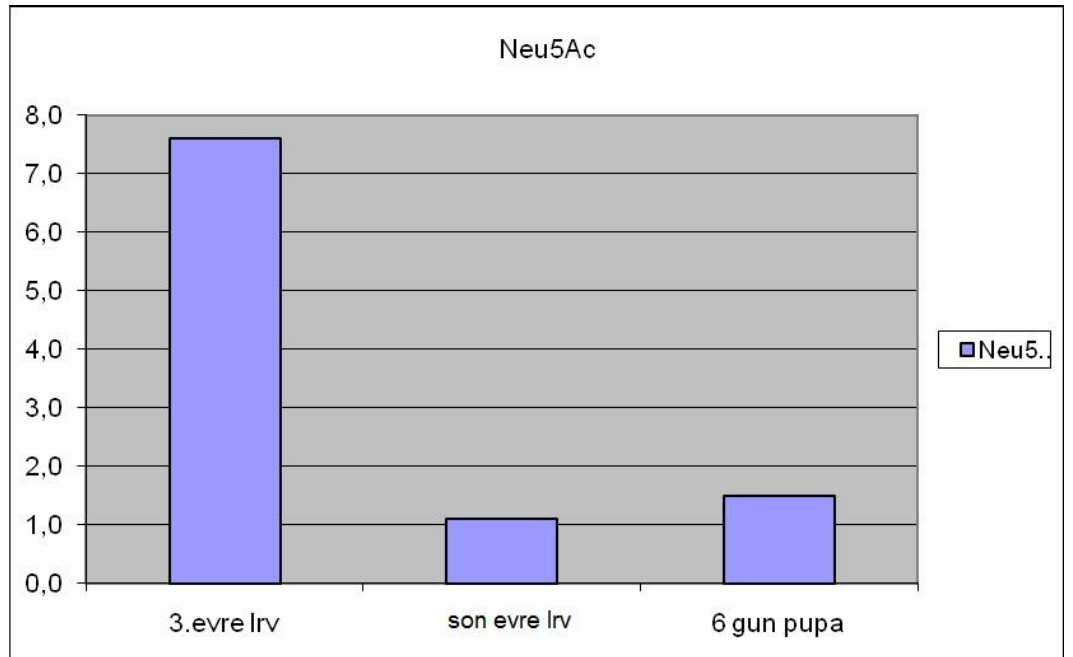
**Şekil 3.18:** *Galleria mellonella* 3.evre beynin PIC bölgesinde bulunan DMB türevli Neu5,9Ac<sub>2</sub>'nın CapLC-ESI-MS/MS kromatogram ve kütle spektrumları (Moleküler iyonları [M+H]<sup>+</sup> (♦) işareti olarak sistemin programı tarafından koyulmaktadır ve doğrulama kütleleri ([M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>); Neu5,9Ac<sub>2</sub> için 450'dir).



**Şekil 3.19:** Neu5Ac'nin 3.evre larva, son evre larva ve 6.gün pupa PIC örneklerinde mutlak pik alanlarına göre karşılaştırılması.



**Şekil 3.20:** Neu5Ac'nin 3.evre larva, son evre larva ve 6.gün pupa PIC örneklerinde mutlak pik alanlarına göre karşılaştırılması.



**Şekil 3.21:** Neu 5Ac'nin PIC örneklerinde 3.evre larva'da 7.6ng/mg. son evre larva'da 1.1ng/mg ve 6.gün pupa'da 1.5 ng/mg konsantrasyonların karşılaştırılması.



### 3.3 Bulgulardan elde edilen sonuçlar ise:

#### 1. Floresan mikroskobu sonuçlarına göre;

##### a. Frozen kesitlerde;

- LPA ile Sia ışınması her üç evrede de gözlemlendi.
- En yoğun ışınma 3.evrede görüldü.
- Işınma özellikle beyni saran stroma ile PIC bölgesinde ve ayrıca lateral bölgedeki hücrelerin nukleuslarında da gözlemlendi.

##### b. Lowicryl kesitlerde;

- MAA ile elde edilen ışınma SNA'dakinden daha fazladır.
- Bu durum son evre larvada PIC bölgesinde  $\alpha$  2-3 bağlı Sia'ların  $\alpha$  2-6 bağlı Sia'lardan daha fazla bulunduğunu işaret eder.

#### 2. Transmisyon Elektron Mikroskobu sonuçlarına göre;

- MAA işaretli altın partikülleri incelenen iki evrede de SNA'dan daha fazla bulunmuştur.
- MAA ve SNA işaretli altın partikülleri üçüncü evre larvada son larvaya göre daha fazladır.
- Bu sonuçlar  $\alpha$  2-3 bağlı Sia'ların son evrede 3.evreye göre azaldığını işaret eder.
- $\alpha$  2-6 Sia'lar 3.evrede bulunurken son evre larvada yok denecek kadar azalmıştır.

#### 3. Analitik Yöntemde elde edilen sonuçlar;

- Üç evrede de Neu5Ac bulunmaktadır.
- Neu5,9Ac<sub>2</sub> sadece 3.evrede belirlenmiştir.
- Mutlak pik alanı değerlerinin karşılaştırılması ile Neu5Ac'nin en yüksek değeri 3.evre PIC bölgesinde bulunmuştur.

- 6.gün pupa PIC bölgesinde son evre larvaya göre hafif bir artış gösterdiği halde Neu5Ac son evre larva ve pupa da belirgin şekilde azalmıştır.

#### 4. TARTIŞMA

Böceklerin nörosekresyon hücreleri ilk defa *Ephestia kühniella*'da Schroder (1938) tarafından gösterilmiştir. *Galleria mellonella*'da nörosekresyon hücrelerinin yoğun şekilde bir arada bulunduğu PIC bölgesindeki hücrelerin ince yapıları ve oluşturduğu nörosekresyon granüllerinin iç yapılarına göre hücre tipleri daha önce TEM ile ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Karaçalı, 1973, 1976). Bu nedenle bu çalışmada doğrudan floresan ve transmisyon elektron mikroskoplarda (sırasıyla FM ve TEM) incelemek üzere lektin işaretlemeleri yapılmıştır.

Literatür taraması sonucunda omurgalı-omurgasız nörosekresyon hücrelerinde Sialik asit (Sia)lerin varlığıyla ilgili bir kayda rastlanmamıştır. Bununla beraber, *G.mellonella*'nın protorasik bezlerinde Sia işaretlemeleri sırasında nörosekresyon aksonları içinde altın partiküllerinin görülmesi bizi bu çalışmayı yapmaya itmiştir. Bununla beraber sinir sisteminde Sia'lar bulunmaktadır. Böceklerde Sinir sisteminde Sia'lar ilk olarak *G.mellonella* 'da enzimatik sindirim ve ruthenium red boyası ile nöral lamellanın yüzeyinde gösterilmiştir (Dybowska and Dutkowski, 1977). Daha sonra *Drosophila melanogaster*'in gelişen sinir sisteminde (Roth et al., 1992) optik ve analitik yöntemlerle Sia'nın varlığı kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada da önce tüm sia tiplerine bağlanabilen lektin (LPA) uygulaması sonucunda frozen kesitlerde PIC bölgesinde görülen ışımadan bu bölgede Sia'nın bulunduğu anlaşılmıştır. Daha sonra glikozidik bağ tiplerini belirleyen lektinlerin uygulanmasıyla  $\alpha$  2-3 ve  $\alpha$  2-6 bağlı Sia'ların bulunduğu Lowicryl'e gömülmüş son evre larva beyinlerinde belirlenmiştir. Floresan mikroskopta gözlenen ışımaya  $\alpha$  2-3 bağlı Sia'ların daha yaygın olduğunu göstermektedir.

Floresan mikroskopta elde edilen sonuçlardan sonra, TEM yöntemi ile her iki bağ tipini de tanıyan altın bağlı lektin uygulamalarıyla Sia'ların hücre içinde dağılımları araştırılmıştır. Daha önceki çalışmada Epon 812 ye (Karaçalı, 1973,1976) gömülü örneklerde belirlenmiş olan beş tip hücrenin iki tipinde sialik asit işaretlenmesi gözlenmiştir. Bu hücre tipleri elektronca yoğun granüllere sahip

tip-I ile, elektronca daha az yoğun granüllü tip-III şeklinde isimlendirilen hücrelerdir. Loiwicryl'e gömülen doku örneklerinde ince yapıda ayrıntıların görülmesi yerine işaretlerin görülmesi esas alındığından güçlü tespit uygulanmaz. Kontrastlığın az olduğu kesitlerde nörosekresyon hücre tiplerini ayırt etmek zordur. En iyi 3.evre beyinlerde ayırt edilmiştir. MAA'ya bağlı altın partikülleri elektronca yoğun tip-I nörosekresyon hücrelerinde hem 3. evre larva SNA işaretlerinden hem de son evre larva MAA işaretlerinden fazladır. SNA işaretlerinin son evre larva nörosekresyon hücrelerinde yok denecek kadar azaldığı dikkate alındığında; genç evrede iki glikozidik bağ tipiyle bağlanan Sia'ların  $\alpha$ 2-3 bağlı daha bol olacak şekilde bulunduğu, son larval evrede ise önemli ölçüde azalarak yer aldığı anlaşılmaktadır. Sia'nın azalmasıyla ilgili TEM gözlemlerinden elde edilen bu sonuçları CapESI-LC/MS sonuçları da desteklemektedir. Çünkü 3. evre PIC bölgesinden elde edilen Neu5Ac miktarı yüksek iken son evre larva PIC bölgesinden elde edilen Sia miktarında azalma görülmüştür. Neu5,9Ac<sub>2</sub>, 3.evrede bulunmasına rağmen son evre larvada hiç ölçülememiştir. Bu sonuçlar *G.mellonella*'nın diğer iki dokusundan elde edilen sonuçlar ile benzerdir. Yağ dokularında Neu5Ac'nin (Naghavi, 2009), ipek bezlerinde (Açikel, 2011) Neu5Ac ve Neu5,9Ac<sub>2</sub>'nin yaşlanma ile azaldıkları gösterilmiştir.

Bu sonuçların karşılaştırılabileceği böcek nörosekresyon hücrelerine ait başka bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Diğer taraftan hem *G.mellonella* hem de diğer böceklerin çeşitli doku ve organlarında Sia'ların varlığı belirlenmiştir. *G.mellonella*'nın ovaryum (Przelecka and Dutkowski, 1973), yağ dokusu (Dutkowski, 1977) ve sinir sistemini (Dybowska and Dutkowski, 1977) bazal tabakalarında TEM ile yapılmış ilk Sia belirlemelerinin arkasından yine aynı böcekte spektrofotometrik yöntemle sinir sisteminde gelişmeye bağlı, yağ dokusunda da cinsiyete bağlı Sia değişiklikleri gösterilmiştir (Karaçalı et al, 1995a). *Locusta migratoria* erginlerinde tükürük bezi, yağ dokusu, ovaryum, testis, kanat kasları ve hemolenfi de içeren tüm seçilen dokularında Sia bulunmuştur (Karaçalı et al., 1995a,b). D'Amica and Jacobs (1995) spektrofotometrik yöntemle *Drosophila*'da Sia bulunduğunu göstermişlerdir. Embriyo gelişimi süresince glikokonjugatların dağılımını inceleyerek ön gastrulasyon döneminin blastodermlerinde düşük miktarda LPA, UEA-I ve PNA

(Galaktoza spesifik) lektinlerinin bağlandığını göstermişlerdir. Ektoderm bölgesi çalışmada kullanılan bütün lektinlerle işaretlenmiştir. Sinir dokusu ConA ve LPA ile işaretlenmiştir. Sinir sisteminde ve barsaklarda  $\alpha$ -2,8 bağlı Sia'ların varlığını WGA ile işaretleyerek göstermişlerdir. İzleyen yıllarda *G.mellonella*'nın larval protorasik bez hücreleri plazma zarlarında Neu5Gc7,9Ac<sub>2</sub> tip Sia varlığı optik ve analitik yöntemlerle bulunmuştur (Karaçalı et al., 1997). *Philaenus spumarius*'un Malpigi tüplerinde Neu5  $\alpha$ 2,8 bağlı polisialik asit (Malykh et al., 1999) ile *G.mellonella*'nın gelişen testislerinde (Deveci, 1997) yedi tip Sia varlığı (Karaçalı et al., 1999) ve *Dociostaurus maroccanus* hemolenfinde Neu5Ac (Karaçalı et al., 2003)'nin bulunduğu bildirimleri izlemiştir.

**Sialik asit'lerin böceklerdeki görevleri** de belirlenmeye çalışılmıştır. *G.mellonella*'nın protorasik bezlerinde hem protorasikotropik hormon reseptörü olabileceği (Karaçalı et al., 1997) ileri sürülmüş hem de, hemositlerin tanıdığı N-asetilgalaktozamin reseptörünü (Karaçalı and Deveci, 2002) kapatan bir maske gibi rol oynadığı deneysel olarak gösterilmiştir (Karaçalı et al., 2000). *Philaenus spumarius* Malpighi tüplerinde bir "hücre sıvıları" düzenleyicisi olarak iş görebileceği (Malykh et al., 1999) ileri sürülmüştür. Sia'ların maskeleyici rolü *G.mellonella*'nın farklı dokularında da örneğin, larval sinir sisteminde (Özkan ve Karaçalı., 2006), corpus cardiacum-corpora allatum kompleksi (Eratak ve Karaçalı, 2006) ve testis (Bayro ve Deveci, 2006) yüzey örtülerinde gösterilmiştir. Yağ dokuları (Naghavi, 2009) bazal tabakalarında reseptör olarak iş görebileceği düşünülmüştür.

Sia'ların modifikasyonları, glikozidik bağ tipleri ve miktarları gelişme süresince değişmektedir (Varki, 1992; Schauer and Kamerling, 1997).

*G.mellonella*'da yaşlanmaya bağlı Sia bağ tipi değişiklikleri floresan işaretli (FITC) lektinlerle kas dokularında (Erden, 2008) yağ dokularında (Naghavi, 2009) protorasik bezlerde (Karaçalı vd., 2010) ve ipek bezlerinde (Açıkel, 2011) gösterilmiştir. Bu çeşitli dokularda elde edilen sonuçlar benzerdir. TEM incelemelerinde  $\alpha$ 2,3 bağını belirleyen MAA bağlı altın partikülleri 3. evre genç hücrelerde bol, son evre larva yaşlı hücrelerde ise azalmıştır.  $\alpha$ 2,6 bağını belirleyen SNA bağlı altın partikülleri de genç hücrelerde MAA'ya göre daha az

bulunurken yaşı hücrelerde ise nerdeyse kaybolmaktadır. Bu sonuçlar PIC bölgesinde nörosekresyon hücreleri için elde edilen sonuçlarla uyumludur.

**Sialik asit'lerin modifikasyonlarının sayısında** gelişme süresince meydana gelen değişiklikler *G.mellonella*'nın testislerinde (Karaçalı et al., 1999) gaz kromatografi ve gaz kromatografi- kütle spektroskopisi yöntemleriyle genç pupa, yaşı pupa ve ergin dönemlerinde sırayla 5,4 ve 2 tip olmak üzere azalmıştır. Ayrıca bu dönemlerde Sia'ların toplam miktarlarında 16:5:1 oranıyla azalma gözlenmiştir. Benzer şekilde *G.mellonella*'nın protorastik bezlerinde (Karaçalı, vd, 2010) genç ve yaşı hücrelerinde Sia'ların hem tip sayısı hem de miktarlarının azalması gösterilmiştir. Bu hücrelerde Cap LC-ESI MS/MS sonuçlarına göre Neu5Ac'nin miktarı genç hücrelerde 5.252 ng/mg'iken yaşı hücrelerde 0.82 ng/mg ve NeuGc genç hücrelerde 0.075 ng/mg bulunurken yaşı hücrelerde 0.029 ng/mg'ye inmiştir. Bu sonuçlar nörosekresyon hücrelerinde belirlenen Sia azalmalarına paraleldir. Nörosekresyon hücrelerinde Neu5Ac'nin 3. evre larvada 7.6 ng/mg'iken son evre larvada 1.1 ng/mL'ye düşmüş ve 6. gün pupada çok hafif bir artış (1.5 ng/mg) göstermesine rağmen 3. ve son evre larvalardan azdır.

Sonuç olarak; *G.mellonella*'nın PIC bölgesinde Sia varlığı hem FITC bağlı lektinle floresan mikroskopta hem de cap ESI-LC-MS/MS sisteminde belirlenmiştir. TEM'de incelenen nörosekresyon hücrelerinde glikozidik bağları tanıyan lektinlerle  $\alpha$  2,3 ve  $\alpha$  2,6 bağlı Sia'ların varlığı işaretlenmiştir. Genç hücrelerde her iki bağ tipine sahip Sia, yaşı hücrelere göre daha boldur.  $\alpha$  2,3 bağlı Sia'lar yaşı hücrelerde azalarak devam ederken,  $\alpha$  2,6 bağlı Sialar ise esas olarak genç hücrelerde bulunmuştur. Analitik yöntemle genç 3.evrede iki Sia modifikasyonu belirlendiği halde yaşı son evre larvada bu bire düşmüştür. Benzer şekilde Sia konsantrasyonu da yaşlanma sürecinde azalmıştır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Açıkkel, M., 2010,** Başkalaşım geçiren *Galleria mellonella* (lepidoptera)'nın yaşlanan ipek bezlerinde mikroskobik (floresan ve elektron) ve analitik (cap lc-esı-ms/ms) yöntemlerle sialik asitlerin belirlenmesi, Ege üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, yüksek lisans tezi.
- Allen, H.J.and Kisailus, E.C., 1992,** Glycoconjugates: Composition, Structure and Function. New York: Marcel Dekker Inc., 1992; pp 685.
- Ambrosi, M., Cameron, N.R. and Davis, B.G., 2005,** Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode, *Org Biomol Chem.*, 3(9):1593-608.
- Baum, L.G., 2002,** Developing a taste for sweets. *Immunity.* Jan;16(1): 5-8.
- Bayro, İ. ve Deveci R., 2006,** *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın gelişen testislerinde sialik asidin rolü, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Projesi
- BLOCH, B., THOMSEN, and THOMSEN, M., 1966,** The neurosecretory system of the adult calliphora erythrocephala. III. Electron microscopy of the medial neurosecretory cells of the brain and some adjacent cells.z.zellforschung. 70, 185-208.
- Brooks, SA., Dwek, M.V and Schumacher, U., 2002,** Functional and molecular glycobiology, *BIOS Scientific Publishers.*
- Brusés J.L. and Rutishauser U., 2000,** Polysialic acid in neural cell development: roles, regulation and mechanism. In: Fukuda M , Hindsgaul O. , editors. *Molecular and Cellular Glycobiology*, Oxford: Oxford University Press.
- Cerna, A., Janega, P., Martanovic, P., Lisy, M. and Babal, P., 2002,** Changes in sialic acid expression in the lung during intrauterine development of the human fetus, *Acta Histochem.* 104(4): 339-42.
- Chen, H.Y. and Varki, A., 2002,** O-acetylation of GD3: an enigmatic modification regulating apoptosis, *J Exp Med.*, 196(12):1529-33.
- Cheresh D.A., Varki A.P., Varki N.M., Stallcup W.B., Levine J. and Reisfeld R.A., 1984,** A monoclonal antibody recognizes an O-acetylated sialic acid in a human melanoma-associated ganglioside. *J Biol Chem.*, 25;259(12):7453-9.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dai, D., Nanthakumar, N.N., Savidge, T.C., Newburg, D.S. and Walker, W.A.**, 2002, Region-specific ontogeny of alpha-2,6-sialyltransferase during normal and cortisone-induced maturation in mouse intestine, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 282 (3): 480-90.
- D'Amico, P. and Jacobs, J.R.**, 1995, Lectin histochemistry of the *Drosophila* embryo, *Tissue Cell*, 27:23–30.
- Decker, L., Durbec, P., Rougon, G., and Van-Evercooren, A.B.**, 2002, Loss of Polysialic Residues Accelerates CNS Neural Precursor Differentiation in Pathological Conditions., *Molecular and Cellular Neuroscience*, 19: 225–238
- Deveci R. ve Karaçalı S.**, 2006, Hücre içi şekerlerin lektinlerle işaretlenmesi. TÜBİTAK Projesi, TBAG-HD/51.
- Deveci, R.**, 1997, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın gelişen testislerinde testis duvarı, folikülleri, kan-germ hücre bariyerlerinin ince yapısı ve glikokonjugatların histokimyasal, sitokimyasal, biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bilimleri Enst. Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova –İZMİR, 133s.
- Dutkowski, A.B.**, 1977, The ultrastructure and ultracytochemistry of the basement membrane of the *Galleria mellonella* fat body, *Cell Tissue Res.*, 176(3):417-29.
- Dybowska, H.E. and Dutkowski, A.B.**, 1977, Ruthenium red staining of the neural lamella of the brain of *Galleria mellonella*. *Cell Tissue Res.*, 176(2):275-84.
- Eratak, B. ve Karaçalı, S.**, 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da metamorfoz geçiren corpus cardiacum corpus allatum (CC-CA) kompleksinde sialik asidin rolü. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Projesi.
- Erden S**, 2008, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın kas dokusunda Neu5Ac(2,3)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, Neu5Ac( $\alpha$ 2,6)Gal/GalNAc ve Gal $\beta$ 1,3GalNAc şekerlerin bölgeler (baş, toraks ve abdomen) ve gelişme evreleriyle (larva, pupa ve ergin) ilişkili belirlenmesi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek lisans tezi .



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feizi, T.**, 1991, Carbohydrate differentiation antigens: probable ligands for cell adhesion molecules. *Trends Biochem Sci.* 16 (3): 84-6.
- Fröblius A.C., Kanost M.R., Götz P., Vilcinskis A.**, 2000, Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Biochem.*, 267(7):2046-53.
- Fukuda, M. and Hindsgaul, O.**, 1994, *Molecular Glycobiology*. IRL Press, Oxford University Press.
- Gabius, H.J. and Gabius S.**, 1993, *Lectins and Glycobiology*. Springer-Verlag, Tokyo, Pp: 521.
- Geldiay (Özbaş), s., and Edwards J.s.**, 1973, the protocerebral neurosecretory system and associated cerebral neurohemal area of *Acheta domestica*. A correlated light and electron microscope study. *Z.Zellforschung*. baskıda.
- Girardie, A. and Girardie, J.**, 1967, Etude histologique, histochemique et ultrastructurale de la pars intercerebralis chez *Locusta migratoria* L. (Orthoptere). *Z.Zellforsch.* 78,54-75
- HAGADORN, I.R. BERN H.A., and NISHIOKA, R.S.**, 1963, The fine structure of the supraesophageal ganglion of the rhynchobellid leech,
- Haltiwanger, R.S. and Lowe, J.B.** 2004, Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem.* 73: 491-537.
- hodes, J.M. and Milton, J.D.**, 1998, Appendix: Lectin-binding specifications, In: *Lectin Methods and Protocols*, eds: Rhodes J.M. and Milton J.D., Humana Press, Totowa, New Jersey., pp: 595-597.
- İzzetoğlu, S. ve Karacali, S.**, 2006, *Bombyx mori*'nin yeni hemapoietik organında Neu5Ac( $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, Neu5Ac( $\alpha$ 2,6)Gal/GalNAc, Gal $\beta$ 1,3GalNAc ve GalNAc şekerlerin altın işaretli lektinlerle belirlenmesi. Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Doktora tezi.
- Karacali, S., Kirmizigül, S., Deveci, R. and Deveci, O.**, 2003, Presence of sialic acid in the hemolymph of *Dociostaurus maroccanus* Thun. (Orthoptera : Acrididae), *Invertebr. Reprod. Dev.*, 43(2): 91-94.
- Karaçalı, 1976.**, *Galleria mellonella* (L.)'da beyin retroserebral endokrin sistemde etarfoz süresince ışık ve elektron mikroskobu ile bulgular. Ege üniversitesi fen fakültesi genel zooloji kürsüsü.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karaçalı, S. ve Deveci, R.,** 2001, Protorasik bezlerdeki hemosit reseptörünün belirlenmesi. TÜBİTAK Projesi, No: TBAG-AY/214, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi.
- Karaçalı, S. ve Deveci, R.,** 2002, Glikobiyolojinin tarihçesi ve çalışma yöntemleri. Biyolojik Bilimlerde Araştırma Yöntemleri Yaz Okulu, İzmir, 225-229, Pp.
- Karaçalı, S.,** 1973, *Galleria Mellonella* (L) beyin ve retroserebral endokrin sistemde metamorfoz süresince ışık ve elektron mikroskobu ile bulgular. Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Doktora tezi.
- Karaçalı, S.,** 2003, Glikobiyoloji, Güncel moleküler biyoloji, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27, 489-95.
- Karaçalı, S., Deveci, Ö., Deveci, R., Onat, T. and Gürcü, B.,** 1995a, Spectrophotometrical determination of sialic acid in several tissues of isolated and crowded *Locusta migrotoria* (Orthoptera), *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 58: 47-57.
- Karaçalı, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü, B.,** 1995b, Spectrophotometrical determination of sialic acid in the tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 58: 59-67.
- Karaçalı, S., Deveci, R., İzzetoğlu, S., Syıkılmaz, M., Şahar, U., Deveci, Ö, Tarhan, L, and Ayar Kayalı, H.,** 2010, doğal genç-yaşlı ve deneysel yaşlandırılmış- gençleştirilmiş böcek model sistemde hücre ve organizma düzeyinde yaşlanmanın moleküler mekanizması DPT Projesi, İzmir (yayımlanmamış).
- Karaçalı, S., Deveci, R., Pehlivan, S. and Özcan, A.,** 2000, Adhesion of hemocytes to desialylated prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in larval stage, *Invertebr. Reprod. Dev.*, 37(2): 167-170.
- Karaçalı, S., Kırmızıgül, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü, B.,** 1997, Presence of sialic acid in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Tissue and Cell*, 29:315-321.
- Karaçalı, S., Kırmızıgül, S. and Deveci, R.,** 1999, Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Invertebr. Reprod. Dev.*, 35(3):225-229.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kelm S. ve Schauer R.**, 1997, Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.*, 175, 137-240.
- Kiss, J.Z. and Rougon, G.**, 1997, Cell Biology of Polysialic Acid., *Current Opinion in Neurobiology*, 7: 640-646
- Kopec, S., 1922**, studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull. Wood's Hole*. 42, 323-342.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M.**, 1993, Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers, pp 1013.
- Lis, H., Sharon, N.**, 1993, Protein Glycosylation Structural and Functional Aspects , *Eur. J. Biochem.*, 218, 1-27.
- Malykh, Y. N., Krisch, B., Gerardy-Schahn, R., Lapina, E. B., Shaw, L. and Schauer, R.**, 1999, The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*, *Glycoconj. J.*, 16:731-739.
- Manzi, A.E., Sjoberg, E.R., Diaz, S. and Varki, A.**, 1990, Biosynthesis and turnover of O-acetyl and N-acetyl groups in the gangliosides of human melanoma cells, *J Biol Chem.*, 265(22):13091-103. Marcel Dekker Inc., New York, Pp: 637.
- Naghavi A.**, 2009, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da lektinler ve analitik yöntemlerle sialik asit (Neu5Ac) belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek lisans tezi .
- Özkan, M. ve Karaçalı, S.**, 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da metamorfoz geçiren sinir sisteminde sialik asidin rolü. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Projesi.
- Poirier, F. and Kimber, S.** 1997, Cell surface carbohydrates and lectins in early development. *Mol. Hum. Reprod.* Oct; 3 (10): 907-18. Review.
- Przelecka, A. and Dutkowski, A.B.**, 1973, The structure of the ovariole wall in *Galleria mellonella*. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)*, 11(3):269-73.
- Reuter, G., Kelm, S. and Schauer, R.**, 1988, Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates, *Acta Histochemica*, Suppl. Band 36, 51-79.
- Reuter, G., Kelm, S. and Schauer, R.**, 1988, Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates. *Acta Histochemica, Suppl.* Band 36: 51-79.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roth J., Kempf A., Reuter G., Schauer R. and Gehring W.J.**, 1992, Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 256 (5057): 673-5.
- Sasaki, T., Akimoto, Y., Sato, Y., Kawakami, H., Hirano, H. and Endo, T.**, 2002, Distribution of sialoglycoconjugates in the rat cerebellum and its change with aging. *J. Histochem. Cytochem.*, 50 (9): 1179-86.
- Sato, Y. and Endo, T.**, 1999, Differential expression of sialoglycoproteins in the rat hippocampus and its changes during aging. *Neurosci Lett.*, 262 (1): 49-52.
- Sato, Y., Akimoto, Y., Kawakami, H., Hirano, H. and Endo, T.**, 2001, Location of sialoglycoconjugates containing the Sia(alpha)2-3Gal and Sia(alpha)2-6Gal groups in the rat hippocampus and the effect of aging on their expression. *J. Histochem. Cytochem.*, 49 (10): 1311-9.
- Schauer R.**, 1985, Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem. Sci.*, 10: 357-360.
- Schauer, R. and Kamerling, JP.**, 1997, Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, In: *Glycoproteins II*, Eds: Montreuil J. Vliegenthart J.F.G. and Schachter H., Elsevier, Amsterdam, 243-402 Pp.
- Schauer, R.**, 2001, The occurrence and significance of sialic acids in insects. *Trends Glycosci. Glyc.*, 13, 507-17.
- Schauer, R.**, 2004, Victor Ginsburg's Influence on my Research of the Role of the Sialic Acids in Biological Recognition., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426: 132-141
- Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P. and Shaw, L.**, 1995, Biochemistry and role of sialic acids. In: *Biology of Sialic acids*, Chapter 2, pp. 7-67, Rosenberg A. (ed.), Plenum Press. New York.
- Schauer, R., Shucla, A.K., Schröder, C. and Müller, E.**, 1984, The anti recognition function of sialic acids: studies with erythrocytes and macrophages. *Pure Appl. Chem.*, 56:907-921.
- Schnitzer, J.E.**, 1988, Glycocalyx electrostatic potential profile analysis: ion pH, steric, and charge effects. *Yale J Biol Med.* Sep-Oct; 61 (5): 427-46.
- Schroder, K.**, 1938, Untersuchungen über die Normalentwicklung des Gehirn und Gehirntransplantationen bei der *Ephestia kühniella* nebst einigen Bemerkungen über *corpus allatum*. *Bio. Zbl.* 58, 52-90.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sparrow, J.R. and Barnstable, C.J.**, 1988, A gradient molecule in developing rat retina: expression of 9-O-acetyl GD3 in relation to cell type, developmental age, and GD3 ganglioside. *J Neurosci Res*, 21(2-4):398-409.
- Taatjes, D.J. and Roth, J.**, 1990, Selective loss of sialic acid from rat small intestinal epithelial cells during postnatal development: demonstration with lectin-gold techniques. *Eur. J. Cell Biol.* Dec; 53 (2): 255-66.
- Taylor, M.E., and Drickamer, K.**, 2003, Introduction to Glicobiology, *Oxford University Pres.*
- theromyzon nude, with special reference to neurosecretion. *Z.Zellforschung*.58, 714-758 et al., 1963;
- Towsen, RR. and Hotchkiss, JR.**, 1997, Techniques in Glycobiology,
- Traving, C. and Schauer, R.**, 1998, Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci.*, 54(12):1330-49.
- Tsuboi, S. and Fukuda, M.**, 2001, Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays*. Jan; 23(1): 46-53.
- Ueda, T., Fujimori, O., Tsukise, A. and Yamada, K.**, 1998, Histochemical analysis of sialic acids in the epididymis of the rat. *Histochem Cell Biol.* Apr., 109(4):399-407
- Ulloa, F. and Real, F. X.**, 2001, Differential distribution of sialic acid in alpha2,3 and alpha2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues, *J Histochem Cytochem*, 49(4):501-10. Ulloa-Aguirre A. ve ark. 1999,
- Unnithan, G.C., Bern, H.A., And Nayar, K.K.** 1970, Ultrastructural analysis of the neuroendocrine apparatus of *oncopeltus fasciatus fasciatus* (Heteroptera). *acta zool.* 52:117-143.
- Varki, A.**, 1992, Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*, 169.
- Varki, A.**, 1997, Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.*, 11 248–255 pp.
- Varki, A.**, 2001, N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie*. Jul; 83 (7): 615-22. Review.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. and Marth, J.**, 1999, Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Pres.653.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Weyer, E.**, 1935, über drüsenartige Nervenzellen in gehirn de honig bien *Apis mellifica*. *Zool. Anz.* 112, 137-141.

**Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R.L.**, 1999, A Vital Role Glycosphingolipid Synthesis during Development and Differentiation., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 99: 9142-9147.

## ÖZGEÇMİŞ

Sanaz NAGHAVİ, 1983 yılında İRAN'da doğmuştur. 2002 yılında Oroumieh Üniversitesi, Biyoloji-Bitkisel Bilimler Bölümü'nü kazanmış ve 2007 yılında buradan mezun olmuştur. Ardından 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

### **Katıldığı Kongre ve Kurslar**

**19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi** (Uluslararası Katılımlı), Türk Elektron Mikroskopi Derneği ve Karadeniz Teknik Üniversitesi, 22-25 Haziran 2009, Trabzon.

**Onkolojide Biyoinformatik ve Biyonanoteknolojik Yöntemler Kursu**,. 5-6 Mayıs 2010, İzmir.

**The Workshop on Recent Advances in Application of Bioinformatics and Biomics**, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 12-14 Temmuz 2010, İzmir. (Çalıştay)

**I.Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi**, 27-30 Ağustos 2008, İzmir.

**Multidisciplinary Approaches in Cell Death Research From Yeast to Man**, International Cell Death Society, 28-31 Mayıs 2010, Antalya

**Uluslararası Katılımlı 3. Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma & Uygulama Platformu**, 27-30 Ağustos 2009, İzmir.

**I.Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi**, 27-30 Ağustos 2008, İzmir