

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da Lektinler ve Analitik
Yöntemlerle Sialik Asit (Neu5Ac) Belirlenmesi**

Atabak NAGHAVİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu: 401.02.00

Sunuş Tarihi:

21.08.2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr.Sabire KARAÇALI

Bornova- İZMİR

2009

Atabak NAGHAVİ tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak sunulan:
“*Galleria mellonella* (Lepidoptera)’da Lektinler ve Analitik Yöntemlerle Sialik Asit (Neu5Ac) Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma “E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği” ile “E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin” ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 21/08/2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri**İmza**

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Sabire KARAÇALI

.....

Raportör Üye : Doç.Dr. Remziye DEVECİ

.....

Üye : Prof. Dr. Leman TARHAN

.....

ÖZET***Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da Lektinler ve Analitik Yöntemlerle Sialik Asit (Neu5Ac) Belirlenmesi****NAGHAVİ, Atabak****Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof.Dr. Sabire KARAÇALI
AĞUSTOS 2009, 41 sayfa**

Bu çalışmada *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın yağ dokusunda Sialik asit (Sia)'ın varlığı metamorfoz sırasında (sondan bir önceki ve son larval devreler ile pupa ve ergin devrelerde) floresan mikroskobu ve analitik ESI-MS/MS yöntemleri ile belirlenmiştir.

Floresan işaretlemeler için Fluorescein isothiocyanate (FITC) işaretli lektinler uygulanmıştır. Tüm Sia tipleri ile bağlanan LFA (*Limax flavus* agglutinin) ve LPA (*Limulus polyphemus* agglutinin) lektinleri ile Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc dizisini tanıyan MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) ve Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc dizisini tanıyan SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) lektinleri kullanılmıştır.

ESI-MS/MS belirlemeleri için önce standart Sia (N-Acetylneuraminic Acid-NANA, Sigma A-9646, FW;309.3) MS/MS'e infüzyon pompasından örnek akış oranı 250 μ l/h olacak şekilde verilmiş ve parçalanma ürünleri belirlenmiştir. Disekte edilerek metanolde biriktirilmiş doku örnekleri asidik (4M asetik asit) hidroliz sonrasında liyofilize edilerek saklanmıştır. Metanolde çözülen örnekler aynı akış oranı ile ESI-MS/MS sistemine verilmiştir. Doku örneklerinde de kontroldaki Sia parçalanma ürünleri aranmıştır.

Floresan mikroskobu ön incelemeleri, frozen mikrotomla kesilmiş ve Hematoksilen-Eosin boyasıyla boyanmış kesitlerde yapılmıştır. uygulama sonuçlarına göre Sia incelenen bütün devrelerde bulunmaktadır. $\alpha 2,3$ bağlı Neu5Ac $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc için özel olan MAA ışması pupal dönemde zayıf diğer dönemlerde daha güçlüdür. $\alpha 2,6$ bağlı Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal/GalNAc dizisini tanıyan SNA ışması sondan bir önceki larva ile ergin dönemlerde daha güçlü son larva ve pupal dönemlerde daha zayıf bulunmuştur.

ESI-MS/MS sonuçlarına göre standart örneğin parçalanma ürünleri olan 290, 220, 170, 119 ve 87 değerleri örneklerin çoğunda bulunmuştur. 290m/z bütün örneklerde en belirgin bulunurken 220, 170 ve 119 değerleri örneklerin çoğunda küçük değerlerde de olsa görülmüştür. En son parçalanma ürünü olan 87m/z değeri metamorfozun ileri devrelerinde daha belirgin bulunmuştur.

Sonuç olarak floresan mikroskobu ve ESI-MS/MS sonuçları *G.mellonella*'nın metamorfoz sırasında incelenen devrelerin yağ dokularında Sia $\alpha 2,3$ ve $\alpha 2,6$ bağlı Neu5Ac) bulunduğunu göstermektedir. Elektron mikroskobu incelemelerinde katyonik boya Rutenyum kırmızısı ile oluşan pozitif reaksiyonun bazı yağ damlalarında görülmesi, negatif yüklerce zengin Sia'nın buralarda bulunabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sialik asit, Lektin işaretleme, Floresan mikroskobu, Rutenyum kırmızısı, Elektron Mikroskobu, Mass Spektrometri, Yağ dokusu, *Galleria mellonella*, Böcek

ABSTRACT**Detection of Sialic Acid in *Galleria mellonella* (Lepidoptera) by
Lectins and Analytic Techniques****NAGHAVI, Atabak****MSc in Biology****Supervisor: Prof.Dr. Sabire KARAÇALI****August 2009, 41 pages**

In this study, the presence of Sialic acids in fat body of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) during metamorphosis (penultimate and last larval stages, pupae and adult stages) was determined that by a combination of fluorescence microscopy and analytic ESI-MS/MS technique.

For fluorescence labeling, Fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled lectins was used. LFA (*Limax flavus* agglutinin) and LPA (*Limulus polyphemus* agglutinin) lectins, which bind to all Sia types, and also MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) and SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), which respectively recognize Neu5Ac α 2, 3Gal β 1, 4GlcNAc chains and Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc chains,.

Initially, standard Sia (N-Acetylneuraminic Acid-NANA, Sigma A-9646, FW; 309.3) were applied to MS/MS by infusion pump with the flow rate of 250 μ l/h and the daughter ions of Sia was determined. Then, fat body samples were dissected from the insect and collected into methanol. After that acidic hydrolysis (4M acetic acid) was performed on the collected material and then materials were lyophilized. Finally, samples were dissolved into methanol and applied to ESI-MS/MS with

VIII

the same flow rate. The samples were then analyzed for the presence of daughter ions with standard Sia.

The sample sections that were obtained by frozen microtome and stained with Hematoxylen-Eosin were used for pre-investigation followed by fluorescence microscopy. According to the results obtained, Sias were present in all stages of development. The MAA radiance that is specific for $\alpha 2,3$ which binds to Neu5Ac $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc was lower in pupal stage, whereas it was higher other stages. The SNA radiance specific for Neu5Ac $\alpha 2,6$ Gal/GalNAc was higher in penultimate larval and adult stages than last larval and pupal stages.

The fragments of standard Sia, 290, 220, 170, 119, 87, were found in the most of the samples according to the ESI-MS/MS results. 290 m/z fragment was more distinct in all of samples compared to others, whereas 220, 170 and 119 fragments were less in most of samples. 87 m/z fragment, which is the smallest fragment, were observed much more distinct in further stages of metamorphosis.

As a result of this study, fluorescence microscopy and ESI-MS/MS findings indicated that Sias ($\alpha 2,3$ and $\alpha 2,6$ binded Neu5Ac) are present in fat body of *Galleria mellonella* during the metamorphosis. Presence of the positive reaction of cationic Ruthenium Red on fat droplet shown by Electron microscopic investigation indicates that negatively charged Sia's could be abundant in these droplets.

Keywords: Sialic acid, Lectin labeling, Fluorescent microscopy, Ruthenium Red, Electron microscopy, Mass spectroscopy, Fat body, *Galleria mellonella*, Insect,

TEŞEKKÜR

Çalışma konumun belirlenmesinde, tez aőamasının her safhasında değerli bilgilerini, katkılarını ve sabrını esirgemeyen, beni her konuda yüreklendiren danıőmanım, değerli hocam Sayın Prof.Dr. Sabire KARAÇALI'ya, laboratuvar çalıőmalarından yazım aőamasına kadar her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini her zaman hissettiren ve tükenmez enerjisiyle hep yanımda olan Doç. Dr Remziye DEVECİ'ye, çalıőmalarım sırasında bilgi ve tecrübesi ile sürekli yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim Araő. Gör. Dr. Savaő İZZETOğLU'na, tezin yazım ve basım sürecinde hiçbir yardımı esirgemeyen, bana sürekli destek olan Dr. Mehmet Salih YIKILMAZ'a, ve bu süreçte dostluklarından destek aldığım Yüksek Lisans ve Doktora yapan arkadaşlarıma ve özellikle Merve AÇIKEL, Hüseyin ÖZAYDIN, Araő.Gör. Seçkin SOYA ve öğrenim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve bana güvenen canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
TABLolar DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL ve YÖNTEM	6
2.1. Böcek Kültürünün Yetiştirilmesi.....	6
2.2. Mikroskopik İncelemeler.....	7
2.2.1. Işık Mikroskobu.....	7
2.2.2. Floresan mikroskobu. Lektin İşaretleme ile N-Asetilnöraminik Asit (Sialik asit, Sia) Belirlenmesi.....	8
2.2.3. Elektron Mikroskobu.....	9
2.3. Analitik Yöntem. Elektro Sprey İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi (ESI-MS/MS) ile Sia Belirlemesi.....	9
2.3.1. Asidik Hidroliz Yöntemi	10
3. BULGULAR	11
3.1. Mikroskopik İncelemeler.....	11
3.1.1. Işık Mikroskobu.....	11
3.1.2. Lektin İşaretleme ile N-Asetilnöraminik Asit Belirlenmesi	15
3.1.1. Elektron Mikroskobu Bulguları.....	19
3.2. ESI-MS/MS ile Sialik Asit Belirlemesi.....	22

4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 <i>Galleria mellonella</i> kültürünün sentetik besin içinde yetiştirilmesi	6
Şekil 2.2 Ön çalışmada seçilen <i>G.mellonella</i> evreleri.....	7
Şekil 3.1 <i>G.mellonella</i> yağ dokusu.....	12
Şekil 3.2 Penultimate larvada yağ doku	13
Şekil 3.3 Son larval evrede yağ doku	13
Şekil 3.4 Genç pupa yağ dokusu	14
Şekil 3.5; Ergin erkek böceklerde yağ dokusu.....	14
Şekil 3.6. LFA işaretleme.....	16
Şekil 3.7. LPA işaretleme.....	17
Şekil 3.8. SNA işaretleme	18
Şekil 3.9. MAA işaretleme.....	19
Şekil 3.10. Ergin erkek yağ dokusu hücrelerinden bir kısım	20
Şekil 3.11. Ergin erkek yağ dokusu hücrelerinden bir kısım.....	21
Şekil 3.12. Ergin erkek yağ dokusu hücrelerinden bir kısım.....	21
Şekil 3.13. Kontrol amacıyla kullanılan standart sialik asidin ESI-MS/MS kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri.....	23
Şekil 3.14: Evrelere ait yağ dokusundaki Sialik asidin ESI-MS/MS kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri.....	24

TABLÖLAR DİZİNİ**Tablo****Sayfa**

Tablo 2.1 FITC bağlı lektinler ve tamponları	8
Tablo3.1 Uygulanan lektinlerin Sia seçicilikleri	15
Tablo3.2 Evrelere ait yağ dokusundaki Sialik asidin ESI-MS/MS kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri.....	25

1. GİRİŞ

Böcek yağ dokusu mezodermal ve ektodermal tabakalardan gelişmiştir. Enerji deposu olarak bilinir ve yağ dokusu olarak adlandırılmasına karşın yalnız yağ değil, karbohidrat ve proteinlerin depolanmasından ve sentezinden de sorumludur (Kilby, 1963; Isac ve Bowens, 1982).

Yağ dokuya ait hücre grupları, üreme organları, sindirim borusu, kas ve merkezi sinir sistemi gibi böcek organlarının çoğunun çevresinde bulunmaktadır. Bu yerleşimiyle dokular arasında makromoleküllerin değiş tokuşunda iş görür. Yağ dokusunda bulunan böcek proteinlerin çoğunun oluşumu juvenil hormonun kontrolündedir. Vitellogeninin, dişi erginlerin yağ dokusunda sentezlenmesi buna örnek olarak verilebilir (Engelmann, 1983).

Böceklerin doğal besinleri karbohidratlardan oluşur. Bu şekerler hemolenfden alınıp glikojen halinde depolanır. Basit şekerlerin polimerizasyonu ve glikojenin oluşumu glikojen sentetaz enzimi ile gerçekleşir. Yağ dokusundaki lipitler triaçilgliserol halinde depolanır. Triaçilgliserol, 1,2-diaçilgliserol (1,2-DAG) ve 1,3- diaçilgliserol (1,3-DAG) halinde salgılanır.

Yağ dokusu diğer böcek organları gibi bazal tabaka denilen bir bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu bazal tabakanın işlevi temel olarak hemolenf ve doku arasında metabolitlerin geçişini kontrol etmek ve dokuyu olumsuz koşullardan korumaktır. Farklı koşullarda yağ dokudan (yumurta sarısı oluşumu, uçuş için gerekli yakıt vb.) hangi lipit ya da

proteinin salgılanacağı bazal tabakanın kontrolündedir (Mayer ve Candy, 1969). Bazal tabakanın anyonik yerlerce zengin olduğu rutenium red ile boyanması sebebiyle bilinmektedir. Ancak, neuraminidaz enzimi ile muamele edildikten sonra bu boyanma özelliği kaybolmaktadır (Dutkowski, 1977).

Karbohidratlar son zamanlara kadar sadece hücrenin enerji metabolizmasında yer alan moleküller olarak düşünülmüştür. Ancak son 20 yıl içindeki gelişmeler karbohidratların görevlerinin enerji metabolizmasıyla sınırlı kalmadığını göstermektedir. Organizmada enerji depolama, organizmanın yapısal bileşenlerini oluşturma gibi görevlerine ek olarak, hücre-hücre ve hücre ile çevresi arasında her türlü iletişimi düzenleme gibi görevleri üstlenirler. Bu amaçla karbohidratlar protein ve lipitlere bağlanarak glikokonjugatları oluştururlar.

Glikokonjugatlar glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikolipitler olarak sınıflandırılabilir. Glikoproteinleri oluşturan karbohidratlar proteinlere iki şekilde bağlanırlar. Asparajin aminoasitine N- üzerinden bağlanırlar N-glikanlar; Serin, Treonin ve Tirozin aminoasitlerine oksijen üzerinden bağlanırlar da O-glikanlar denir (Fukuda ve Hindsgaul, 1994; Varki ve ark., 1999; Tsuboi ve Fukuda, 2001; Taylor ve Drickamer, 2003). Glikolipitler ise oligosakkaritlerin seramit üzerinden lipitlere bağlanması ile meydana gelir (Varki ve ark., 1999; Maccioni ve ark., 2002).

Glikokonjugatlar hücre ve dokularda buldukları yerler açısından farklılıklar gösterirler. Hücre içerisinde sitoplâzma veya

organellerde ek olarak hücreler arası alanlarda bulunabilirler. Yapısal proteinler, taşıma proteinleri, hormonlar, immüoglobulinler, hücre tutunma molekülleri, toksinler ve lektinler gibi makromoleküllerin önemli kısımlarını oluştururlar. Glikokonjugatların şeker kısımları glikanlar olarak adlandırılır. Glikanlar, hücre içi ve hücreler arası alanda lektinler olarak bilinen protein veya glikoprotein yapılı şeker reseptörleriyle ilişki kurarlar. Glikanlar bu yerleşimleri ile hücre tutunmasında, hareketinde, hücreye sinyal iletiminde, hücre içi sinyal aktarımında rol oynamaktadırlar (Varki ve ark., 1999; Haltiwanger ve Lowe, 2004). Karbohidratların en önemli görevi moleküller ve hücreler arası tanıma olaylarında görülür (Feizi, 1991; Varki, 1999; Karaçalı, 2003). Hücreler arası tanıma olaylarının çeşitli örnekleri; embriyonik, otoimmün alloimmün ilişkiler ile metastazlarda olduğu gibi hücre-hücre tanınmasında, virüs, bakteri ve protozoa gibi zararlıların enfeksiyon oluşturmasında, hücreler arası trafikte, enfeksiyon bölgelerine kan hücrelerinin göçü olaylarında bilinmektedir (Baum, 2002; Karaçalı, 2003). Şekerlerin iyi bilinen bir diğer görevi, tanımayı engelleme ve maskeleyerek tanımlanmaktadır. Tanıma olaylarından sorumlu şeker reseptörleri bir diğer şekeri kapatarak tanıma ilişkilerinin kurulması engellenir. Hücre yüzeylerinde özel tabaka oluşturma, koruyucu ve sağlamaştırıcı görevlerine ek olarak bazı metabolitlerin belli yerlerde depolanmasında da rol oynarlar (Karaçalı, 2003).

Böceklerdeki glikokonjugat yapılarının belirlenmesine ilişkin çok fazla araştırma yoktur. Ancak son yıllarda bu konuda birbiri ardına

yeni araştırmalar yapılmaktadır (Schauer ve ark., 1984; Schauer, 1985; Reuter ve ark., 1988; Taatjes ve Roth, 1990; Brooks ve ark., 2002).

Sialik asit (Sia) ler N ve O bağlı glikoproteinlerin karbohidrat zincirlerinin ve lipide bağlı glikokonjugatların en uę kısmında bulunan, çeşitlilik gösteren 9C'lu bir şeker grubudur. (Foster ve ark., 1992; Brooks ve ark., 2002). Sia'lar hücre-hücre ve hücre-hücreler arası saha ilişkilerinde sinyal iletimi, tanıma, tutunma gibi çok sayıda olayda görev alır. Embriyo gelişiminde, hücre farklılaşmasında, virüs, bakteri ve protozoa enfeksiyonunda, pozitif yüklü iyonların taşınmasında, (Reuter ve ark., 1988; Kelm ve Schauer, 1997) ve moleküler tanıma ile tanımayı maskeleyen olaylarında iş görürler (Traving ve Schauer, 1998). Sia'ların şimdiye kadar 65'den fazla türevi belirlenmiştir (Varki ve ark., 1999; Schauer, 1985, 2001, 2004). Sia'lar α 2,3- veya α 2,6-bağı ile Galaktoza (Gal), α 2-6 bağı ile N-asetilglukozamine (GlcNAc) ve N-asetilgalaktozamine (GalNAc) ve α 2-8 bağı ile de bir diğer sialik aside bağlanırlar (Fukuda ve Hindsgaul, 1994; Varki ve ark., 1999; Brooks ve ark., 2002; Taylor ve Drickamer, 2003). Memeli hücrelerinde en yaygın bulunan sialik asitler N-asetilnöraminik asit ve N-glikolilnöraminik asitlerdir. İnsanda ise sadece N-asetilnöraminik asit bulunur (Chou ve ark., 1998).

Farklılaşmış ve farklılaşmamış hücreler arasındaki farkı, zar yüzeylerinde bulunan glikolipitlerin, glikoproteinlerin ve proteoglikanların kısaca glikokonjugatlardaki şeker birimleri ve üzerinde taşıdıkları ek gruplar (substitüentler) belirler (Karaçalı, 2003). Kan

hücreleri dışında farklılaşan spermatozoonlarda da yüzey galaktoz değişiklikleri belirlenmiştir (Saez ve ark., 1999). Ek olarak, hücre yaşlanma sürecinde de Sia miktarında azalma (Sato ve Endo, 1999; Sato ve ark., 2001; Dai ve ark., 2002; Sasaki ve ark., 2002) ve glikozit bağ tipinde bölgeye özel yerleşimler bildirilmektedir.

Böcek dokularında Sia varlığına ilişkin yayınlar oldukça azdır. Böceklerde Sia varlığı ilk olarak 1992 de Roth ve arkadaşları tarafından *Drosophila*'nın gelişim sürecinde saptanmıştır. Devam eden çalışmalarda *Galleria mellonella*'nın protorasik bezinde bir tip, gelişen testislerinde ise farklı 7 tip sialik asit belirlenmiştir (Karaçalı ve ark., 1997, 1999). Bu ilk kayıtları izleyen Karaçalı ve ark., (2000, 2003), Bayro (2006), Eratak (2006), Özkan (2006) tarafından yapılan çalışmalarda *Galleria mellonella*'nın çeşitli dokularında Sia'ların, hemositlerin tanıdığı reseptörü maskeleyen rolleri deneysel olarak gösterilmiştir. Lektin işaretleme yöntemiyle de hemositlerin tanıdığı reseptörün galaktoz ve N-asetilgalaktozamin olduğu belirlenmiştir. (Karaçalı ve Deveci, 2001).

Bütün bu bilgiler dikkate alındığında tezin amacı, metamorfoz sırasında *Galleria mellonella* yağ dokusunda morfolojik değişiklikler ile sialik asitlerin varlığının ve devrelerle ilişkili değişikliklerinin belirlenmesidir. Bu amaçla mikroskopik (ışık, floresan ve elektron mikroskopları) ve analitik (MS/MS) yöntemler kullanılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Böcek Kültürünün Yetiştirilmesi

Çalışma materyali, büyük mum güvesi *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae); laboratuvarında $30\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve %40-60 orantılı nem içeren karanlık bir ortamda, 16 cm çapındaki petri kutularında, mısır unu, buğday unu, süt tozu, kuru maya, bal mumu, bal ve gliserin karışımından oluşan yapay mama ile beslenerek yetiştirilmiştir (Marston ve ark., 1975; Fröbius ve ark., 2000) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 *Galleria mellonella* kültürünün sentetik besin içinde yetiştirilmesi.



Şekil 2.2 Ön çalışmada seçilen *G.mellonella* evrelerinden örnekler. PL, son evrden bir önceki; L: son evre larva, GP: üçüncü gündeki genç pupa, İP: beşinci gündeki ileri pupa, YP: yedinci gündeki yaşlı pupa, E: ergin.

2.2. Mikroskopik İncelemeler

2.2.1. Işık Mikroskobu

Çalışma materyali yağ dokusu, *G.mellonella*'nın ilk abdomen segmentinde yer alan yağ dokusudur. İncelenen devreler, sondan bir önceki larval dönem ile son larval dönem. 5 günlük pupa ve ergin erkek böceklerdir. Metamorföz sırasında karşılaştırma iki düzeyde yapılmıştır. Birincisi stereo mikroskop altında doğrudan izleyerek yapılmıştır. İkinci düzeyde karşılaştırma frozen mikrotomda kesilmiş 6 µm kalınlığındaki kesitlerin %70 etanolle tespit edilmesinden sonra hematoksilen-eosin (H-E) ile boyanan preparatlarda yapılmıştır. Frozen kesitler için böcekler özel gömme ortamında -60°C dondurulmuş ve kullanılıncaya kadar -80°C tutulmuştur. Kesitler -25°C'de alınmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar ayrıca floresan boyama için dokunun uygun olup olmadığına karar vermek için ön histolojik incelemeler için kullanılmıştır. Bu

amaçla Leica CM 1850 frozen mikrotom ve özel frozen gömme ortamı (cryostat embedding medium) kullanılmıştır.

2.2.2. Floresan mikroskobu. Lektin İşaretleme ile N-Asetilnöraminik Asit (Sialik asit, Sia) Belirlenmesi

Floresan boyama (FITC bağlı lektinler) sondan bir önceki ve son larval dönemler ile 5 günlük pupa ve ergin erkek böceklerin yağ dokusuna yapılmıştır. Lektinlerin Sia seçicilikleri ile uygulama sırasında kullanılan tamponları tabloda belirtilmiştir (**Tablo 2.1**). Dondurulmuş materyalden alınan 6 µm'lik kesitler lektine özel tamponlarla yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında, nemli odacık içerisinde lektinlerle işaretlenmiştir.

Floresanlı lektinler ile işaretlenmiş kesitler, Leica DM4000B floresan ataçmanlı fotomikroskopta incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 2.1 FITC bağlı lektinler ve tamponları

Lektinin adı	Lektinin kısa adı	Sia seçicilikleri	Tampon
<i>Limax flavus</i> agglutinin	LFA	Neu5Ac	0.05 M TBS (pH: 7.5)
<i>Limulus polyphemus</i> agglutinin	LPA	Neu5Ac	0.05 M TBS (pH: 8)
<i>Maackia amurensis</i> agglutinin	MAA	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc	0.01 M PBS (pH: 7.3)
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	SNA	Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc	0.01 M PBS (pH: 7.3)

2.2.3. Elektron Mikroskobu

Ergin böcekler yağ dokusu sitolojik incelemeler için stereo mikroskop altında disekte edilmiştir. Çıkarılan yağ dokunun ilk tespitleri Rethenium Red (RR) içeren Karnovsky (1965) tespit sıvısı içinde yapılmıştır. RR uyguması için örnekler her ml'de 1 mg RR içeren tepit sıvısında oda sıcaklığında bir gece tespit edilmiştir. Kakodilat tamponuyla yıkamanın ardından, fosfat tamponlu %1'lik OsO₄ (Millonig, 1961) ile ikinci tespitten sonra, yükselen derecelerdeki etil alkollerde suyu çekilen örnekler epon serilerinden geçirildikten sonra, Epon 812'ye gömülmüştür. Ultramikrotomda alınan birkaç yüz angström inceliğindeki kesitler boyanmaksızın veya uranil asetat ve kurşun sitrat (Reynolds, 1963) ile boyanarak Jeol 100C geçirmeli (transmisyon) elektron mikroskopta (TEM) incelenmiş ve mikrografı alınmıştır.

2.3. Analitik Yöntem. Elektro Sprey İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi (ESI-MS) ile Sia Belirlemesi:

Gelişme süresince Sia varlığını izlemek için, penultimate ve son evre larvalar, dişi ve erkek 5 günlük pupa ve genç erginlere ait böceklerin yağ dokuları kullanılmıştır (**Şekil 2.2**). Neu5Ac tip Sia varlığını belirlemek için analitik tekniklerden Elektro Sprey İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi (ESI-MS) kullanılmıştır. Önce ticari olarak satın alınan standart Sialik asit (N-Acetylneuraminic Acid-NANA, Sigma A-9646, FW;309.3) MS/MS'e infüzyon pompasından örnek akış oranı 250 µl/h olacak şekilde verilmiştir. Bu standart örneğin parçalanma ürünleri kontrol amacıyla kullanılmıştır. Böceğin farklı

devrelerine ait yağ doku örneklerinden asidik hidroliz yöntemiyle elde edilen glikanlardan Sia'ların parçalanma ürünlerinde kontrolde bulunan değerler aranmıştır.

2.3.1. Asidik Hidroliz Yöntemi:

Dokulardan veya hücrelerden Sia toplanması ve izolasyonu için genellikle laboratuvarlarda kullanılan en yaygın teknik, asidik hidroliz yöntemidir. Bu yöntem glikokonjugatlardan asidik ortamda şekerlerin proteinlerden, lipitlerden ve şeker zincirleri arasındaki kovalent bağların koparılıp, glikanların serbest kalmasını sağlar. Bu amaçla, böceklerden diseksiyonla çıkarılan yağ dokusu metanola alındı. Dokuların parçalanması için +4 °C de homojenize edildi. Homojenize edilmiş örnekler ependorf tüpleri içinde 16300 rpm de 20 dak. +4 °C de santrifüj edildi. Glikanların molekül ağırlıkları küçük olduğundan sadece süpernatant kullanıldı. Süpernatanttan bir miktar alınıp 1:1 oranında 4M asetik asit eklendi. Bu karışım 80 °C de 3 saat inkübe edildi. Karışım soğutuldu ve vakum konsantratör cihazında asidik çözgenler uzaklaştırıldı (Liyofilizasyon). Kuru bir şekilde glikanlar elde edildi.

3. BULGULAR

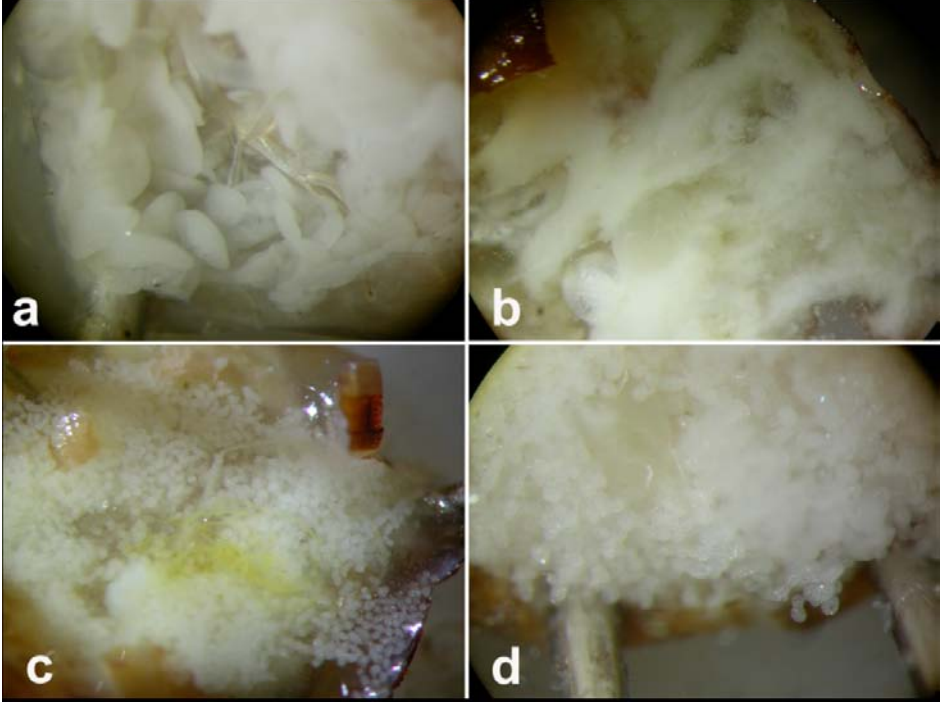
3.1. Mikroskopik İncelemeler

3.1.1. Işık Mikroskobu:

Galleria mellonella'nın metamorfozu sırasında yağ dokusunun genel morfolojisi karşılaştırılan devrelerde birbirinden farklıdır. Diseksiyonu yapılan böcek içinde görüntülenen yağ dokusu son larval devrede iri loplardan yapıldığı halde pupal dönemin ilk yarısında loplardan kaybetmiş bir pelte görünümündedir (**Şekil 3.1**). Bu dönem larval yapıların kaybolduğu ve yerine ergin olanların şekillendiği bir dönemdir. Yağ dokusunu kuşatan stroma veya bazal tabaka adı verilen larval bağ dokusu kaybolduğundan loplu görüntü de kaybolmuştur. Pupal dönemin ikinci yarısında ergin bağ dokusu şekillendiğinden loplardan yeniden şekillenmeye başlar. Ergin dönemde de loplardan irilikleri artar.

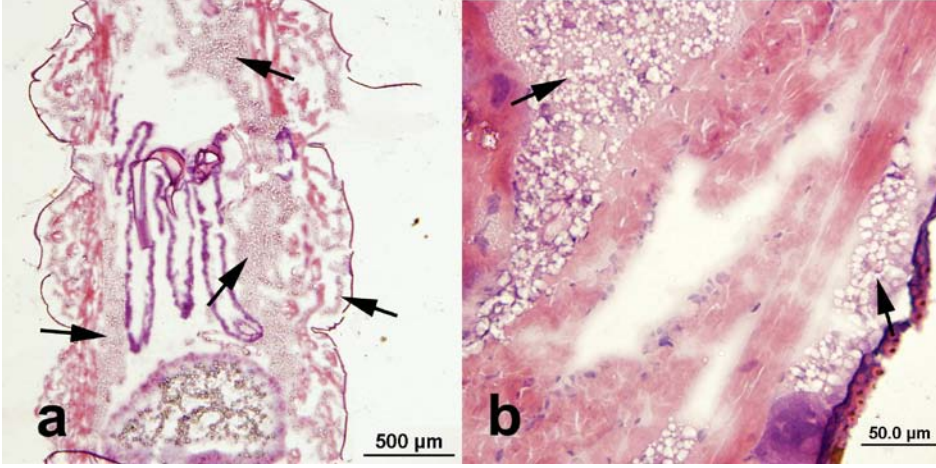
Yağ dokusunun ışık mikroskobu incelemeleri son larval dönemden bir önceki devrede (penultimate larva veya PL) başlatılmıştır (**Şekil 3.2**). PL'da deri altındaki ince bir tabaka halindeki yağ dokusu kuşattıkları diğer dokularla yakın ilişkili görülmektedir. Son larval evrenin deri altı ve iç kısımdaki yağ dokuda, büyük loplardan oluşur. Genişleyen yağ dokusunda pupal evrede meydana gelecek başkalaşım için gerekli enerji depolanmaktadır (**Şekil 3.3**).

Pupal dönemin ilk yarısında ise bazal tabaka yıkıldığı için lop yapısı kaybolmuştur. Yağ damlaları dikkati çekecek kadar irileşmiştir. Yağ hücreleri ile damlalarının diğer dokularla çok yakın ilişkide oldukları görülmektedir (**Şekil 3.4**).

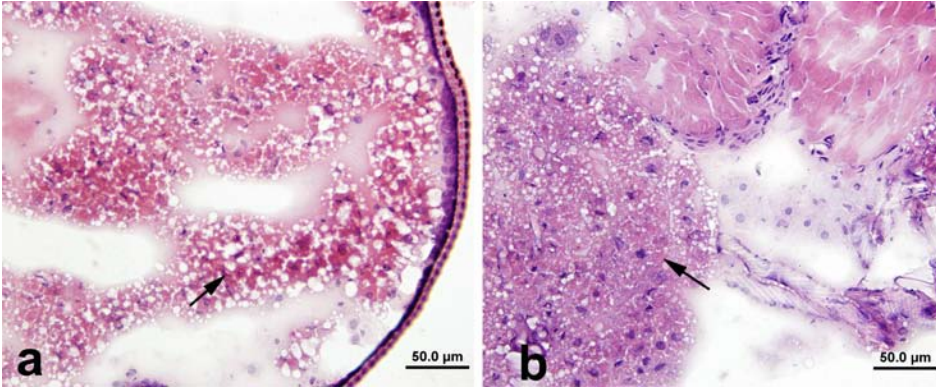


Şekil 3.1 *G.mellonella* yağ dokusu; a, son evre larva (32x); b, 5 günlük pupa (20x); c, yaşlı erkek pupa (32x); d, erkek ergin (20x).

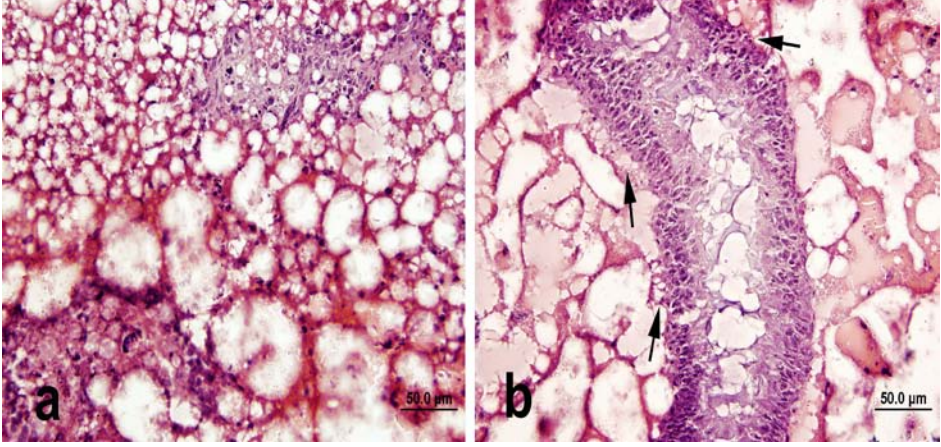
Ergin böceklerde ortaya çıkan değişikliklerle birlikte yağ hücrelerini saran ergin bazal tabaka oluşturulur ve küçük loplar halinde yağ dokusu görülmeye başlar. Yağ dokusu ile diğer dokular arasında yakın temas kaybolur (Şekil.3.5). Hücrelerdeki yağ damlalarının irilikleri larval dönemde görülenlerden büyük fakat pupal dönemdeki yağ damlalarından küçüktür.



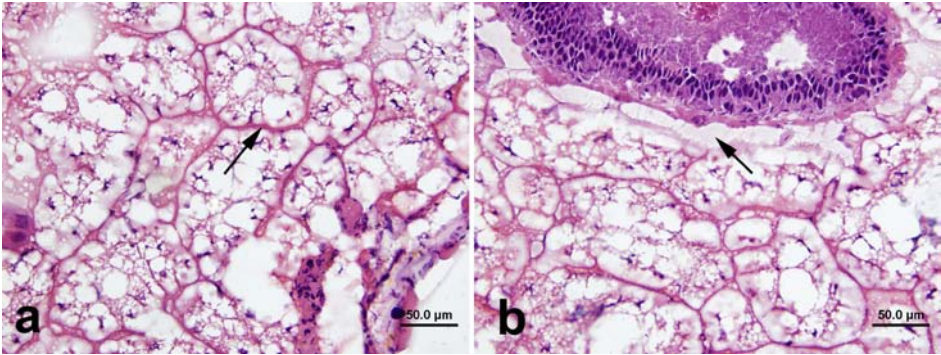
Şekil 3.2; Penultimate larva abdomen segmentlerinde ince tabaka halinde yağ dokusu (a) ve deri altı yağ dokusu ile kas dokusunu saran içerdeki yağ dokusu (b) görülmektedir.



Şekil 3.3; Son larval evre; deri altında (a) ve içerde (b) irileşen loplariyla yağ dokusu.



Şekil 3.4; Genç Pupal yağ dokusu; irilemiş yağ damlaları içeren (a) ve sindirim borusunu yakın ilişkiyle kuşatan (b) içerdeki yağ dokusu görünmektedir.



Şekil 3.5; Ergin erkek böceklerde yağ dokusu ; Yeniden şekillenmiş loplar (a) içeren ve diğer dokularla yakın ilişkisini kaybetmiş içerdeki yağ dokusu görülmektedir.

3.1.2. Lektin İşaretleme ile N-Asetilnöraminik Asit Belirlenmesi.

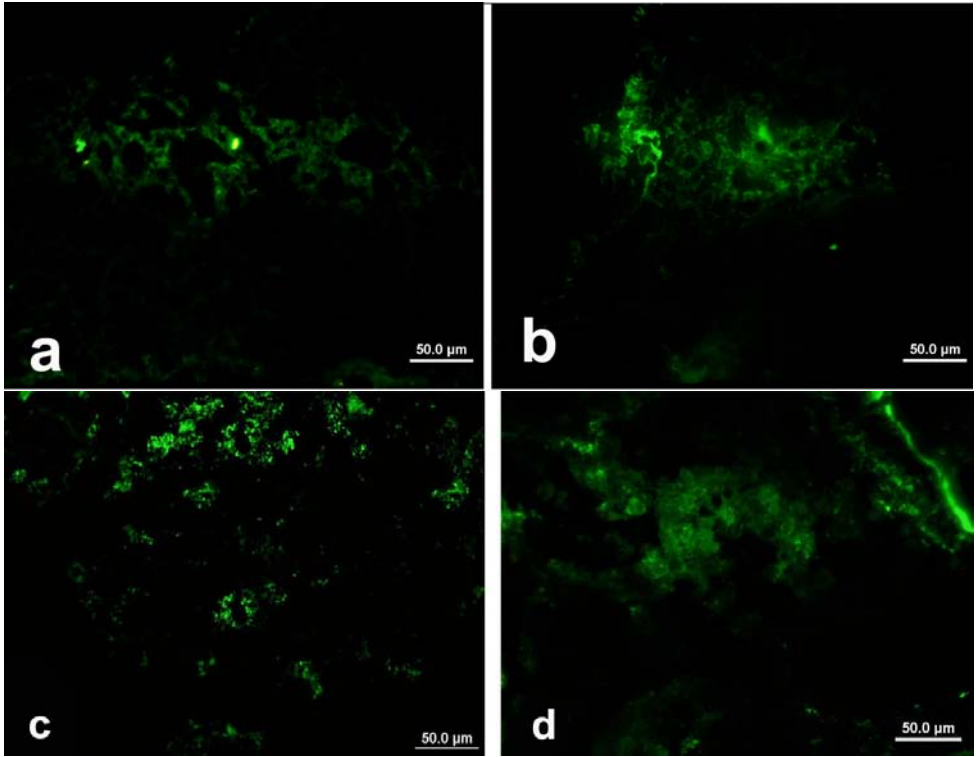
Böcek yağ dokusunda Sialik asit (Sia)'ların varlığı, *Galleria mellonella*'dan alınan total kesitlere floresan işaretli lektinlerin uygulanmasıyla gösterilmiştir. Bu amaçla önce tüm Sia tipleriyle bağlanabilen iki tip lektin kullanılmıştır. Bunlar LFA ve LPA olarak bilinen lektinlerdir. Daha sonra glikozidik bağ tipini de tanıyarak Sia'lara seçici bağlanan diğer lektinler kullanılmıştır (SNA ve MAA) (**Tablo 3.1**).

Tablo3.1 Uygulanan Lektinlerin Sia seçicilikleri

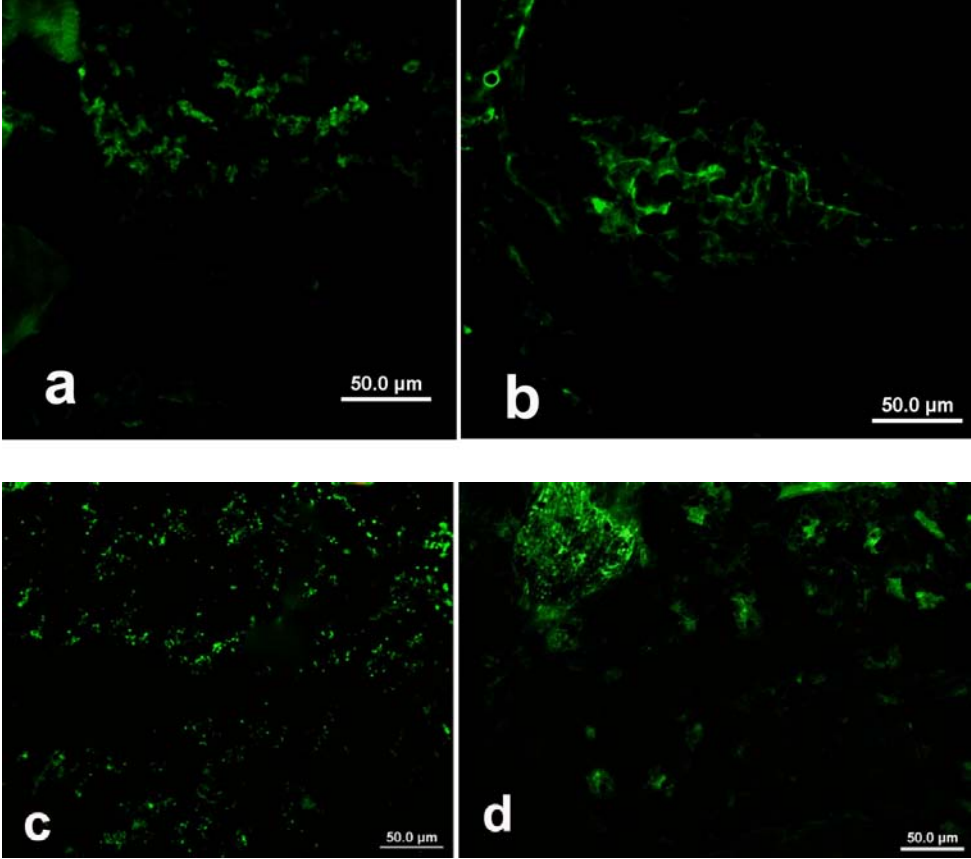
Lektinin Adı	Lektinin Spesifik Olduğu Sia
LPA	Tüm sialik asit tipleri
LFA	Tüm sialik asit tipleri
MAA	Neu5Ac α 2,3Gal β 1, 4GlcNAc
SNA	Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc

Tüm Sia tipleri ile reaksiyona giren LFA ve LPA lektinleri ile ışığa incelenen tüm devrelerde elde edilmiştir (şekil 3.9 ve 3.10). Neu5Ac α 2,3Gal β 1, 4GlcNAc'ne özel MAA uygulaması ile elde edilen ışığa larval dönemlerde en çok, pupal dönemde azalmış, ergin dönemde tekrar artmış olarak görünmektedir (**Şekil 3.11**). Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc'ne özel, SNA uygulaması ile elde edilen ışığa genel olarak incelenen bütün devrelerde MAA ile elde edilene göre daha azdır. Devreler kendi içinde karşılaştırıldığında son larval devreden bir önceki larva ile ergin dönemde elde edilen ışımalar, son larva ve 5

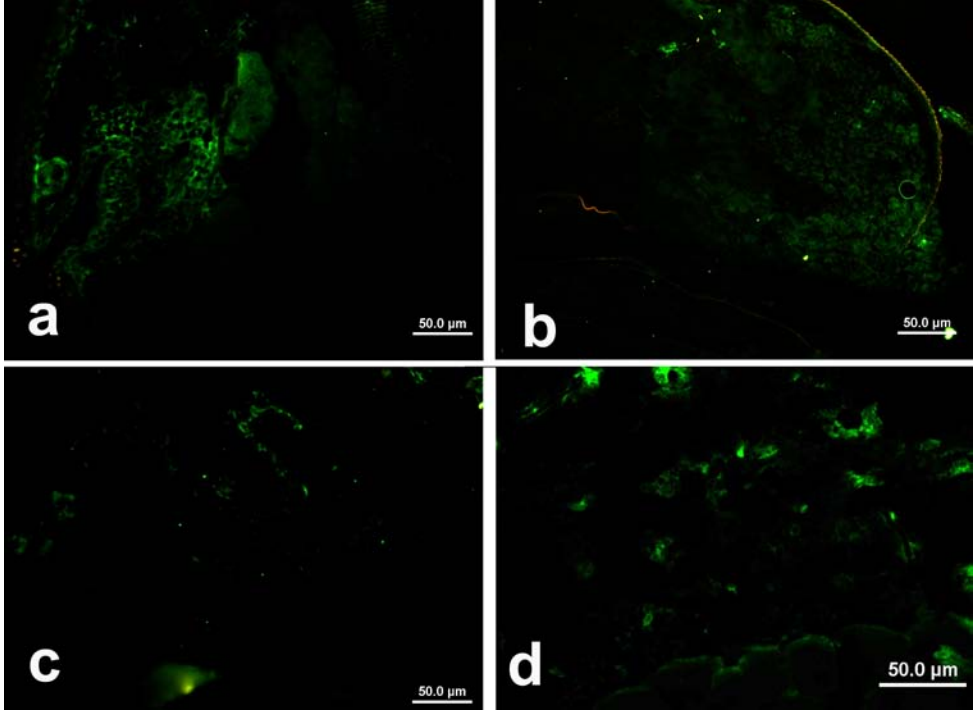
günlük pupada ki ışımalara göre daha fazla bulunmuştur. Sonuç olarak; α 2-3 ve α 2-6 bağlı Sia'ların her ikisi de *G.mellonella*'nın yağ dokularında bulunmaktadır.



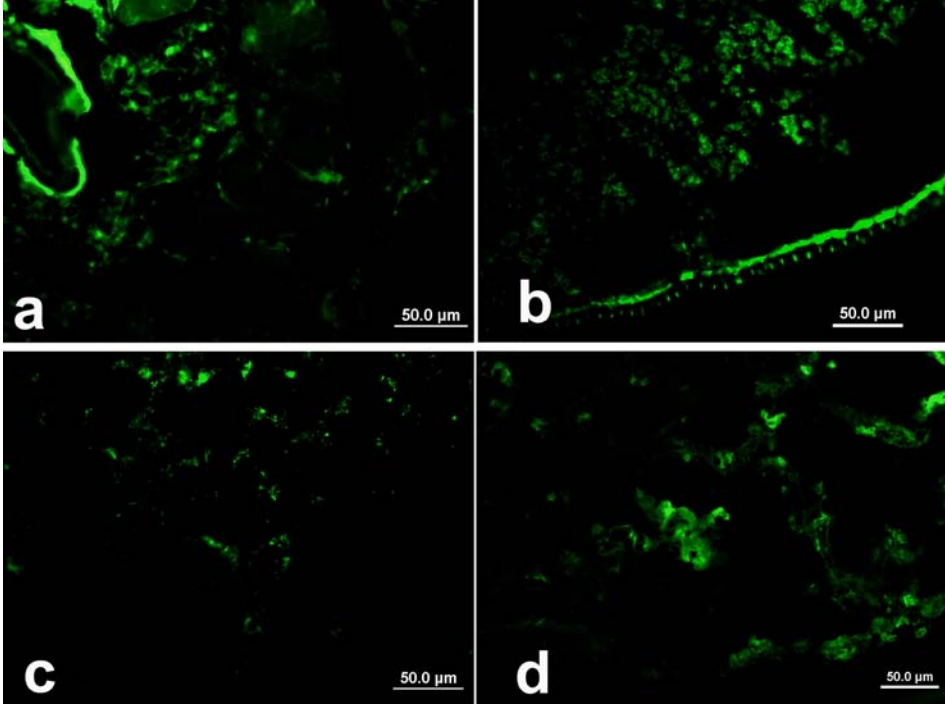
Şekil 3.6. LFA işaretleme: a, Penultimate larva; b, son evre larva. ; c, pupa; d, ergin



Şekil 3.7. LPA işaretleme. a, Penultimate larva; b, son evre larva; ; c, pupa; d, ergin



Şekil 3.8. SNA işaretleme. a, PL; b, Son evre larva; c, pupa; d, ergin.

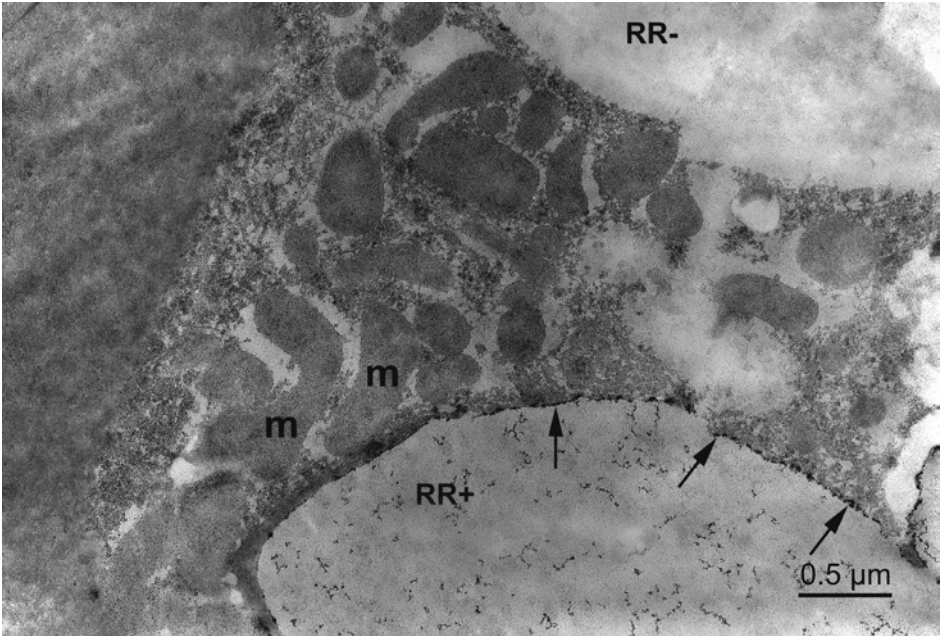


Şekil 3.9. MAA işaretleme . a, PL; b, Son evre larva; c, pupa; d, ergin.

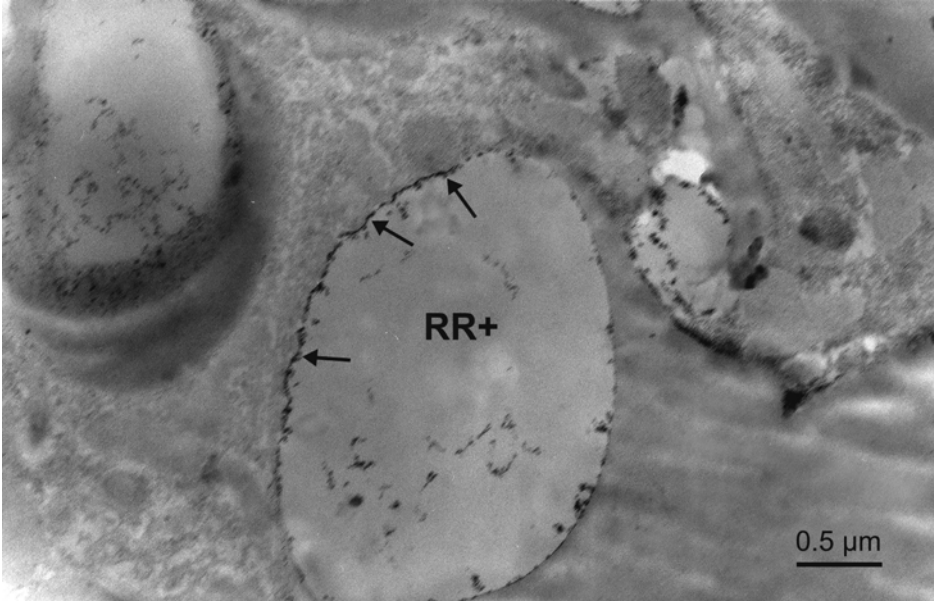
3.1.3. Elektron Mikroskobu Bulguları;

Ergin erkek böceklerin yağ hücrelerinin sitoplazması elektronca yoğun görülür (Şekil 3.10). Sitoplazmada bol mitokondri bulunur. Yuvarlak, oval ve uzamış mitokondriler elektronca yoğun matriks içerirler. Sitoplazmada bulunan elektronca yoğun protein yapıları değişik iriliktir. Yağ damlaları da bol ve büyüktür. Katyonik boya rutenyum kırmızısı (ruthenium red) uygulanmış örneklerde bazı yağ damlalarını kuşatan zarın elektronca yoğun bir reaksiyon verdiği görülür. Boyanmadan bakılan örneklerde bu reaksiyon daha belirgindir (Şekil

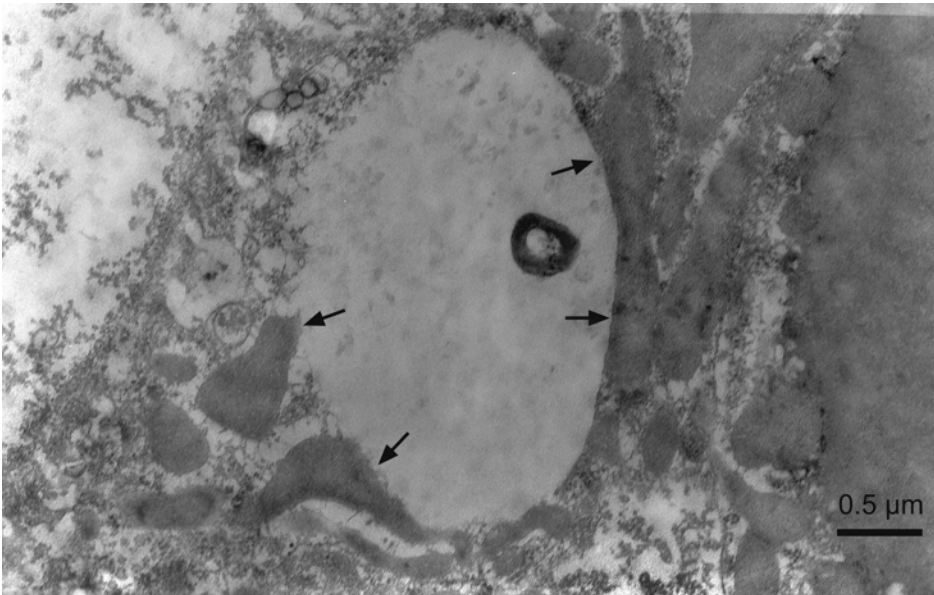
3.11). Bu gözlem bazı yağ damlalarının sınırlarında anyonik yerlerin bulunduğunu işaret etmektedir. Dokuz karbonlu Sia'ların büyük ölçüde negatif yüklere sahip olduğu bilindiğinden, RR uygulamasıyla oluşan reaksiyon yerleri olasılıkla Sia'ların bulunduğu yerlerden biri olarak düşünülebilir. Yağ damlaları mitokondrilerin enerji kaynağını oluşturduğundan, Yağ damlalarının çevresinde mitokondriler yakın bir ilişki ile yerleşmektedir (**Şekil 3.12**).



Şekil 3.10. Ergin erkek yağ dokusu hücresinden bir kısım; m, Mitokondri; Rutenyum kırmızısı negatif (RR -) ve pozitif (RR +) reaksiyonlu yağ damlaları. Uranil asetat ve kurşun sitrat boyalı.



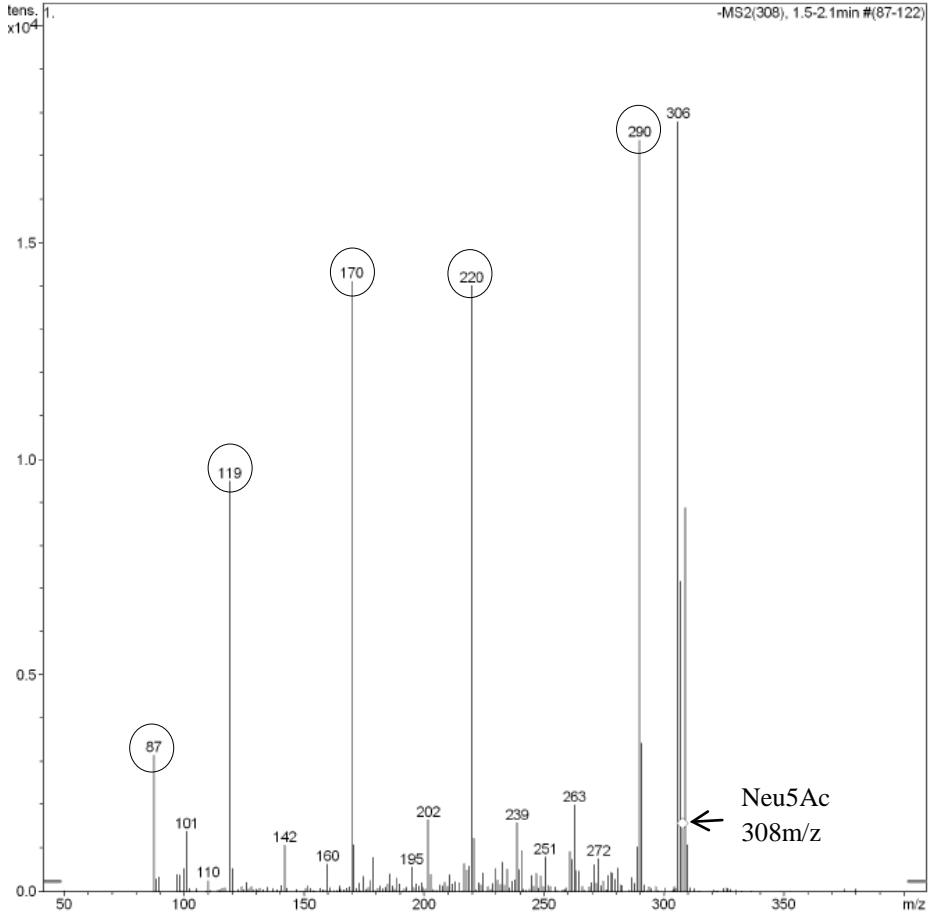
Şekil 3.11. Ergin erkek yağ dokusu hücresinden bir kısım; Rutenyum kırmızısı pozitif (RR +) reaksiyonlu yağ damlaları. Boyasız kesitler



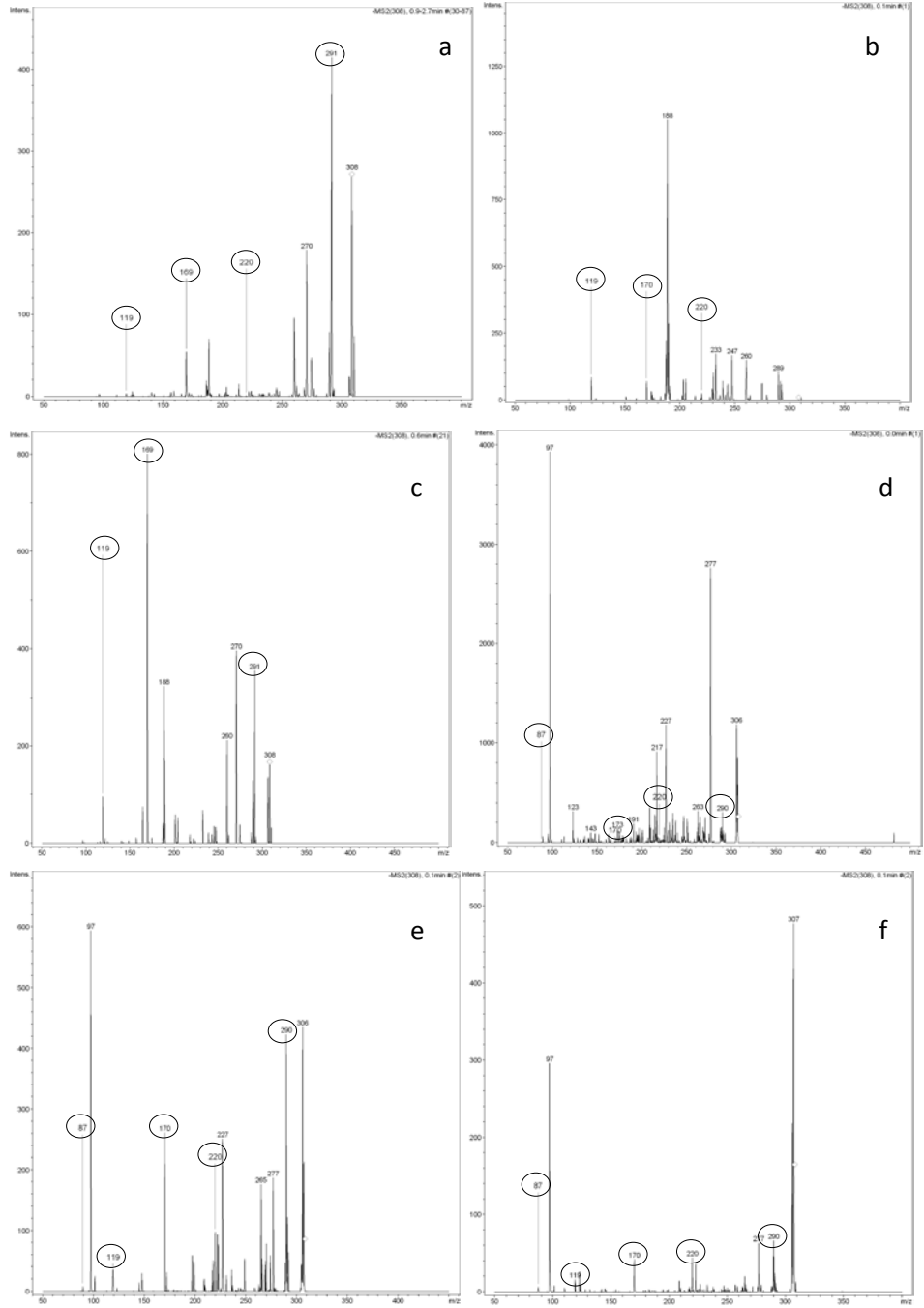
Şekil 3.12. Ergin erkek yağ dokusu hücresinden bir kısım; yağ damlası ile mitokondriler arasında yakın ilişki görülmektedir.

3.2. ESI-MS ile Sialik Asit Belirlemesi:

Yöntem kısmında açıklandığı gibi sondan bir önceki (PL) ve son evre larvalar; erkek ve dişi 5 günlük pupalar, erkek ve dişi erginlerden disekte edilmiş yağ dokusundan izole edilen Sia'ların MS spektrumları kontrol örneğin (N-Acetylneuraminic Acid-NANA, Sigma A-9646, FW;309.3) spektrumu (**Şekil 3.13**) ile karşılaştırıldı (**Şekil 3.14**). Standart örneğin parçalanma ürünleri olan 290, 220, 170, 119 ve 87 değerler bütün örneklerde aranmıştır. 309m/z'ye (molekül ağırlığı/yük) sahip olan Sia'ların negatif yüklü iyon ((M-H)⁻ 308m/z) spektrumları alınmıştır. Genel olarak bütün devrelerde ilk parçalanma ürünü olan 290 m/z bulunmuştur (**Şekil 3.14. a, b c, d, e ve f**). Diğer parçalanma ürünleri (220, 170, 119) bazıları çok küçük değerlerde de olsa incelenen devrelerin çoğunda görülmüştür. En son parçalanma ürünü olan 87m/z incelenen sondan bir önceki ve son larva ile erkek pupada görülmemiş fakat diğer örneklerde belirlenmiştir. Dokularda zaten az miktarda olduğu bilinen ve bunun yanında izolasyon sırasında meydana gelen olası kayıplar nedeniyle spektrumlarda bu değerlerin yakalanması mümkün olamamıştır (**Şekil 3.14. a, b c, d, e ve f**).



Şekil 3.13: Kontrol amacıyla kullanılan standart sialik asidin ESI-MS/MS kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri



Şekil 3.14: Evrelere ait yağ dokusundaki Sialik asidin ESI-MS/MS kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri. a-PL, b-Son evre larva, c- Erkek pupa, d-Dişi pupa, e- Erkek ergin, f- Dişi ergin

Tablo 3.2 Evrelere ait yağ dokusundaki Sialik asidin ESI-MS/MS kütle spektrumu ve parçalanma ürünleri

<i>Evreler</i>	<i>Sialik asidin parçalanma ürünleri (m/z)</i>
Standart Sialik Asit	290, 220, 170, 119, 87
Penultimate larva (a)	291, 220, 169, 119
Son larva (b)	291, 220, 170, 119
Pupa erkek (c)	291, 169, 119
Pupa dişi (d)	290, 220, 170, 87
Ergin erkek (e)	290, 220, 170, 119, 87
Ergin dişi (f)	290, 220, 170, 119, 87

4. TARTIŞMA ve SONUÇ:

Tam metamorfoz geçiren böceklerde pupal devrenin ilk yarısı, larval yapıların kaybolduğu ve yerlerine erginlerin şekillendiği bir dönem olarak görülür. Bu nedenle yağ dokudaki değişikliklerin belirlenmesi için son larval ve ergin dönemler ile pupal dönem genç ve yaşlı olmak üzere ikiye ayrılarak karşılaştırılmıştır. Genç pupal devrede yağ dokunun loplulu yapısının kaybolması, metamorfoz sırasında meydana gelen bu yeniden yapılanmayla ilgili bir görüntüdür. Işık mikroskopunda H-E boyaması ile elde edilen görüntülerde irileşmiş yağ damlaları içeren ve sınırları belli olmayan genç pupa yağ dokusu yapısı bu gelişmeyle ilgilidir. *G.mellonella*'nın pupal evresinde bazal tabakanın ortadan kalktığı daha önce de gösterilmiş ve bu değişimin böcek hormonlarının etkisi ile meydana geldiği bildirilmiştir (Dutkowski, 1975).

Böceklerde Sia'ların varlığı ile ilgili bildirimler yakın zamanda görünmeye başlamıştır (Roth ve ark., 1992; Karaçalı ve ark., 1997; Maykh ve ark., 1999). Yağ dokusunda Sia varlığı ile ilgili İlk bildirim *G.mellonella*'nın son larval evre yağ dokusu bazal tabakasında RR ile oluşan pozitif reaksiyonun neuraminidaz enzim uygulaması sonucunda kaybolduğunun görülmesiyle elde edilmiştir (Dutkowski, 1977). Daha sonra *G.mellonella*'de larval yağ dokusu ile pupal (erkek ve dişi) ve ergin (erkek ve dişi) yağ dokularında spektrofotometrik yöntemle Sia varlığı belirlenmiştir. Dokuların gram kuru ağırlığında miligram olarak ölçülen değerler larvada 0,08840, erkek ve dişi pupada sırasıyla 0,27134, 0,23296 ve erkek, dişi erginlerde sırasıyla 0,09428 ve 0,24649 mg/g olarak bulunmuştur (Karaçalı ve ark., 1995, a). İzole ve grup halinde

yetiştirilen çegirge, *Locusta migratoria* erginlerinde erkek ve dişi böceklerin yağ dokularında da spektrofotometrik yöntem ile Sia belirlenmiştir (karaçalı ve ark., 1995b). Ölçülen en yüksek Sia değeri izole yetiştirilen dişilerde bulunmuştur. Yağ doku kuru ağırlıkta 0,73717 mg/g olarak ölçülen bu değer grup halinde yetiştirilen dişilerdekenden (0,212150 mg/g) ve erkek izole (0,16508 mg/g) ve grup halinde (0,22900 mg/g) yetiştirilen böceklerin yağ dokularında ölçülenlerden çok yüksektir. Böcek metabolizmasında çok önemli bir organ olan yağ dokuda cinsiyete ve faza bağlı olarak Sia miktarlarında belirlenen bu fark, Sia'ların yağ dokuda önemli görevleri olabileceğini işaret etmektedir.

Böcek dokularında Sia belirlemeleri için floresan mikroskopta floresan boyalı lektin uygulamaları da yapılmaktadır. *G.mellonella*'nın kas dokusunda tüm Sia'larla bağlanan lektinlere ek olarak Neu5Ac α 2,3Gal β 1, 4GlcNAc ve Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc tip Sia'lara bağlanan lektinlerin bölgelere (baş, toraks ve abdomen) ve gelişme evreleri ile (larva, pupa ve ergin) ilişkili olarak uygulamaları yapılmıştır (Erden, 2008). İki farklı glikosidik bağla bağlanan Sia'lar en genç kas dokularında en yüksek yoğunlukta ışığa verdiği α 2,3 bağlı sia'nın hafif bir azalmayla kararlı şekilde bütün devrelerde bulunurken α 2,6 bağlı Sia'nın 3. larval devreden başlayarak gittikçe azaldığı ve pupa ve genç erginlerin abdomen kaslarında tamamen gözden kaybolduğu gösterilmiştir. Farklı glikozitik bağla bağlanan Sia'ların bütün devrelerde bulunuşu *G.mellonella*'nın kas dokusunda yapılan bu bildirimine uygundur. Ancak α 2,6 bağlı Sia'ları belirleyen lektinlerle genç devrelerdeki kas

dokularında daha çok ışımaya elde edilmesi yağ dokusundaki sonuçlara uymamaktadır çünkü yağ dokusunda $\alpha 2,3$ bağlı Sia'lara bağlanan lektinlerle elde edilen ışımaya genç devrelerde daha fazladır. Böceklerde $\alpha 2,3$ ve $\alpha 2,6$ bağlı sia'ler *Bombyx mori*'de yakın zamanda belirlenmiş olan dorsal damarla yakın ilişkili hemapoietik organda da elektron mikroskopu ile yapılan altın bağlı lektin işaretleme yöntemi ile bulunmuştur (İzzetoğlu, 2006). Sia'ların varlığını işaret eden altın partikülleri hemapoietik organın bazal tabakası ile salgı hücrelerinin, zarlarında, sitosollerinde, salgı granüllerinde, nukleus plazmalarında, hetrokromatin ve ökromatin bölgelerinde gösterilmiştir.

Genel olarak Sia'ların glikozit bağ tipinin embriyonik ve post embriyonik gelişmede büyük ölçüde değiştiği bildirilmektedir (Varki, 1992; Schauer ve Kamerling, 1997; Karaçalı ve ark., 1999) $\alpha 2,3$ ve $\alpha 2,6$ bağlı Sia'lar hem bölgesel hem de hücre ve dokuların farklılaşması, yaşlanması ile ilişkili olarak dağılımlarında değişiklik gösterirler. Örneğin; *Makrobracium resenbergii*'de genç hemositlerin plazma zarında yüksek miktarda $\alpha 2,6$ Sia bulunurken ergin hemositler $\alpha 2,3$ bağlı Sia içermektedir (Sierra ve ark., 2001). Fare timus bezi genç hücrelerde $\alpha 2,6$ Sia bulunurken olgunlaşan hücrelerde $\alpha 2,3$ bağlı Sia bulunduğu lektin işaretleme ile gösterilmiştir (Alvarez ve ark., 1999). *Sus scrofa domesticus*'un genç ve olgunlaşan sinir sisteminde sırasıyla $\alpha 2,3$ ve $\alpha 2,6$ bağlı Sia'lar bol bulunur. Glikozitik bağ tipi değişiklikleri ile ilgili bu bilgiler tüm hücre ve dokularda değişmelerin benzer olmadığını, bir genelleme yapmanın doğru olmadığını ancak farklı hücrelerde kendi içinde anlamlı oldabileceğini işaret etmektedir.

Doku ve hücrelerde Sia varlığı belirlemek için kolorometrik H-NMR spektroskopisi, ince tabaka kromatografisi ve LC-MS/MS gibi çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. LC-MS/MS yöntemi Sia belirlemelerinde en çabuk ve hassas sonucu vermektedir. ESI-MS/MS sistemi özellikle az miktarda Sia içeren örneklerde iyonları tuzaklayarak miktarları ölçülebilecek değere getirdiğinden çok kullanışlıdır. *G.mellonella*'nın spektrofotometrik yöntem ile yağ ve diğer dokularında (Karaçalı ve ark., 1995, a; Karaçalı. ve ark., 1997) ölçülen miktarların küçüklükleri dikkate alındığında Sia belirlemelerinde bu sistemin önemli katkısı olacağı ortadadır.

Neu5Ac tip Sia'nın kontrol olarak kullanılmasıyla Neu5Ac'ın parçalanma ürünleri olan 290, 220, 170, 119 ve 87 değerlerinin karşılaştıran doku örneklerinde bulunduğu gösterilmesi Neu5Ac tip Sia'nın *G.mellonella*'nın yağ dokusunda bulunduğunu tartışmasız şekilde ortaya koymuştur. Lektin işaretlemeleriyle de yağ dokusunda hem α 2,3 bağlı hemde α 2,6 bağlı Sia'ların bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu Sia'ların bir kısmının yağ dokusunu çevreleyen bazal tabakada bulunduğu Dutkowski (1975)'nin *G.mellonella*'nın yağ dokusunun bazal tabakasında nöraminidaz enzim uygulamasıyla RR pozitif reaksiyonun kaybolmasının elektron mikroskopunda gösterilmesi ile anlaşılmaktadır. Sia'ların olası bir başka yerleşim yeri yağ dokusu içinde yağ damlaları olabilir. Ergin erkeklerin RR uygulanmış yağ dokusu hücrelerinde bulunan RR+ yağ damlalarının (Şekil. 3.6 ve 3.7) bulunması bu olasılığı artırmaktadır.

Böceklerde bulunan Sia'ların görevleri ile ilgili bildirimler gittikçe artmaktadır. *Musca domestica*'nın tükürük bezlerinde inositol ile birlikte 5-hidroksitriptamin reseptörü olarak çalışırlar (Dalton, 1987). *G.mellonella*'nın protorasik bezlerinde beyin hormonu reseptörü olabilir (Karaçalı ve ark., 1997). *L.migratoria* yumurta hücre zarında vitellogenin reseptörü olarak rol oynaya bilir. (Hafer ve Ferenz, 1991). Güçlü elektronegatif yüklü moleküller olarak iyon değiştirici gibi çalışırlar (Schauer, 2001). Bu özeliği nedeni ile *P.spumarius*'un malpigi tüplerinde bir osmoregülatör oldukları bildirilmiştir (Malykh ve ark., 1999). Sia'nın metamorfoz sırasında kaybolan protorasik bezlerin histolizisi için hemositlerin tanıdığı galaktoz reseptörünü (Karaçalı ve Deveci, 2002) kapatan maske rolü oynadığı deneysel olarak gösterilmiştir (Karaçalı ve ark., 2002). Benzer maskeleme örnekleri *G.mellonella*'nın larval nöral doku (Özkan ve Karaçalı, 2006), corpus cardiacum-corpora allatum kompleksi (Ertat ve Karaçalı, 2006) ve testis (Bayro ve Deveci, 2006) yüzey örtülerinde de gösterilmiştir. Hemolenf, vitellogenin ve humoral proteinler ile diğer moleküllerin oluşumunda önemli rol oynayan yağ dokusunda varlığı tartışmasız belirlenmiş olan Sia'nın (hiç değilse Neu5Ac tip) açık dolaşıma sahip böceklerde metabolitlerin hemolenf ve diğer dokulara ulaşımının kontrolünde aktif rol oynaması mümkündür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alvarez, G., Lascurain, R., Perez, A., Degand, P., Montano, LF., Martines-Cairo, S., and Zenteno, E.,** 1999, Relevance of aialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection the thymus. *Immunol Invest.* Jan; 28 (1): 9-18.
- Andrzej B. Dutkowski,** 1977, The Ultrastructure and Ultracytochemistry of the Basement Membrane of the *Galleria mellonella* Fat Body
- Bayro, İ.,** 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın Gelişen Testislerinde Sialik Asidin Rolü., Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 32 sayfa
- Baum, L.G.,** 2002, Developing a taste for sweets., *Immunity.* 16(1): 5-8
- Brigande J.V., Platt F.M., and Seyfried T.N.,** 1998, Inhibition of Glycosphingolipid Biosynthesis Does Not Impair Growth or Morphogenesis of the Postimplantation Mouse Embryo., *Journal of Neurochemistry,* 70: 871-882
- Brooks, SA., Dwek, MV., and Schumacher, U.,** 2002, Functional and Molecular Glycobiology., *BIOS Scientific Publishers.*
- Bruses, J.L. and Rutishauser, U.,** 2001, Roles, Regulation, and Mechanism of Polysialic Acid Function during Neural Development., *Biochimie,* 83: 635-643
- Chou, H.-H., Takematsu H., Diaz S., Iber, I., Nickerson, E.,** 1998, A Maturation in Human CMP-Sialic Acid Hydroxylase Occured After the Homo-Pan Divergence., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 95: 11751-11756.
- Dai, D., Nanthakumar, NN., Savidge, TC., Newburg, DS., and Walker, WA.,** 2002, Region-specific Ontogeny of alpha-2,6-Sialyltransferase During Normal and Cortisone-induced

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Maturation in Mouse Intestine., *Am. J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 282 (3): 480-90

Dalton, T., 1987, Receptor turnover and the action of 5-hydroxytryptamine on the salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala*, the housefly *Musca domestica* and frog skin epithelium. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 88(2): 233-9

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

Dutkowski, A.B. (1975): The basement membrane of the *Galleria mellonella* fat body. Abstracts of papers of IX Conference of Electron Microscopy. *Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.* 20, 71 72

Engelmann F. 1983. Vitellogenesis controlled by juvenile hormone. In: Downer RGH, Laufer H, editors. *Endocrinology of Insects.* pp. 259-270. Alan R. Liss, Inc. New York.

Eratak, B., 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da Metamorfoz Geçiren Corpus Cardiacum-Corpus Allatum (CC-CA) Kompleksinde Sialik Asidin Rolü., Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 28 sayfa

Feizi, T. 1991, Carbohydrate Differentiation Antigens: Probable Ligands for Cell Adhesion Molecules., *Trends Biochem Sci.*, 16 (3): 84-86

Foster, J.D., Getchell, M.L., and Getchell, T.V., 1992, Ultrastructural Localization of Sialylated Glycoconjugates in Cells of the Salamander Olfactory Mucosa Using Lectin Cytochemistry., *Cell Tissue Res.*, 267 (1): 113-24

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Fröbius, A.C., Kanost, M.R., Götz, P., and Vilcinskas, A.,** 2000, Isolation and Characterization of Novel Inducible Serine Protease Inhibitors from Larval Hemolymph of the Greater Wax Moth *Galleria melonella.*, *European Journal of Biochemistry*, 267 (7): 2046-2053
- Fukuda, M. and Hindsgaul, O.,** 1994, *Molecular Glycobiology.*, Oxford: *IRL. Press*, 261 sayfa
- Hafer, J. and Ferenz, H.J.,** 1991, *Locust* vitellogenin receptor: an acidic glycoprotein with *N*- and *O*-linked oligosaccharides, *Comp.Biochem. Physiol.* 100B, 579-586.
- Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D., and Kelly, W.G.,** 1989, Nucleoplasmic and Cytoplasmic Glycoproteins., *Ciba Found Symp.*, 145: 102-112
- Hart, G.W., Holt, G.D., and Haltiwanger, R.S.,** 1988, Nuclear and Cytoplasmic Glycosylation: Novel Saccharide Linkages in Unexpected Places., *Trends Biochem Sci.*, (10): 380-384
- Isac, P. G.; Bownes, M.** Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster.* *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 123, p. 527-534, 1982.
- İzzetoğlu, S.,** 2006, *Bombyx mori*'nin Yeni Hemapoietik Organında Neu5Ac(α 2,3)Gal β 1,4GlcNAc, Neu5Ac(α 2,6)Gal/GalNAc, Gal β 1,3GalNAc ve GalNAcŞekerlerin Altın İşaretili Lektinlerle Belirlenmesi., Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 97 sayfa
- 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 migratoria* (Orthoptera)., *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 58: 47-57

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Karaçalı, S.**, 2003, Glikobiyoloji; Güncel Moleküler Biyoloji., *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27: 489-495
- Karaçalı S., Kırmızıgül, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T., ve Gürcü B.**, 1997, Presence of Sialic Acid in Prothoracic Glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera)., *Tissue and Cell*, 29:315-321
- Karaçalı, S., Kırmızıgül, S. ve Deveci, R.**, 1999, Sialic Acid in Developing Testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera)., *Invertebr. Reprod. Dev.*, 35: 225-229
- Karaçalı, S. ve Deveci, R.**, 2001, Protorasik Bezlerdeki Hemosit Reseptörünün Belirlenmesi., TÜBİTAK Projesi, TBAG-AY/214, 16 sayfa
- Karaçalı, S., Deveci, R., Pehlivan, S. ve 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. ve Deveci, Ö.**, 2003 Presence of Sialic Acid in Hemolymph of *Dociostaurus maroccanus* Thun. (Orthoptera: Acrididae)., *Invertebr. Reprod. Dev.*, 43 (2): 91-94.
- Karnovsky, M.J.**, 1965, A Formaldehyde-glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy., *J. Cell Biol.*, 27: 137A-138A.
- Kelm, S. and Schauer, R.**, 1997, Sialic Acids in Molecular and Cellular Interactions., *Int. Rev. Cytol.*, 175: 137-240
- Kilby, B. A.** 1963. The Biochemistry of the insect fat body. Archives of Insect Physiology, New York, v. 1, p. 111-174,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kiss, J.Z. and Rougon, G.**, 1997, Cell Biology of Polysialic Acid., *Current Opinion in Neurobiology*, 7: 640-646
- Maccioni, H.J.F., Giraudo, C.G., and Daniotti, J.L.**, 2002, Understanding the Stepwise Synthesis of Glycolipids., *Neurochemical Research*, 27, (7/8): 629-636
- 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 (11):731-739
- Mayer, R.J., Candy, D.J.** 1969, Control of haemolymph lipid concentration during locust flight. An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* 15, 611-620
- Millonig, G.**, 1961, Advantages of a Phosphate Buffer for OsO₄ Solution in Fixation., *J. Appl. Physiol.*, 32: 1637.
- Mullis, KG., Haltiwanger, RS., Hart, GW., Marchase, RB., and Engler, JA.**, 1990, Relative Accessibility of N-acetylglucosamine in Trimers of the Adenovirus Types 2 and 5 Fiber Proteins., *J. Virol.*, 64 (11): 5317-5323.
- Nation, J.L.**, 2002, Insect Physiology and Biochemistry., *CRC Pres LLC* 485 pp
- Özkan, M.**, 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da Metamorfoz Geçiren Sinir Sisteminde Sialik Asidin Rolü., *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.*, 37 sayfa
- Reuter, G., Kelm, S., and Schauer, R.**, 1988, Chemistry and Biology of Cell Surface Glycoconjugates., *Acta Histochemica, Suppl. Ban*, 36: 51-79

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Reynolds, E.S.**, 1963, The use of Lead Citrate at High pH as an Electron-opaque Stain in Electron Microscopy., *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., and Gehring, WJ.**, 1992, Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*., *Science*, 256 (5057): 673-675
- Saez, F.J., Madrid, J.F., Cardoso, S., Gomez, L., and Hernandez, F.**, 2004, Glycoconjugates of the Urodele Amphibian Testis Shown by Lectin Cytochemical Methods., *Microsc. Res. Tech.*, 64(1):63-76
- 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., 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): 1311-1319.
- 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.
- Schauer, R. and Kamerling, JP.**, 1997, Chemistry, Biochemistry and biology of sialic acids., In: *Glycoproteins II*, Eds: Montreuil J., Vliegthart J.F.G. and Schachter H., Elsevier, Amsterdam, Pp: 243-402.
- Schauer, R.**, 1985, Sialic Acids and Their Role as Biological Masks., *Trends Biochem Sci.*, 10, 357-60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Schauer, R.**, 2000, Achievements and Challenges of Sialic Acid Research., *Glycoconjugate Journal*, 17: 485-499
- Schauer, R.**, 2001, The Occurrence and Significance of Sialic Acids in Insects., *Trends Glycosci. Glyc.*, 13: 507-517.
- 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., Shucla, AK., Schröder, C., and Muller, E.**, 1984, The Anti Recognition Function of Sialic Acids: Studies With Erythrocytes and Macrophages., *Pure Appl. Chem.*, 56:907-921.
- Sierra, C., Guevara, J., Lascurain, R., Perez, A., Agundis, C., Zenteno, E., and Vazquez, L.**, 2001, Sialylation is Modulated Through Maturation in Hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*., *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, 130 (2): 179-89
- Taatjes, DJ. 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.*, 53 (2): 255-266
- Taylor, M.E. and Drickamer, K.**, 2003, Introduction to Glicobiology., *Oxford University Pres.* 207 sayfa
- Toikka, J., Aalto, J., Häyrynen, J., Pelliniemi, L.J. and Finne, J.**, 1998, The Polysialic acid Units of the Neural Cell Adhesion Molecule N-CAM Form Filament Bundle Networks., *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (44): 28557-28559
- Traving, C., and Schauer, R.**, 1998, Structure, Function and Metabolism of Sialic acids., *Cell Mol. Life Sci*, 54(12): 1330-1349

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Tsuboi, S. and Fukuda, M.**, 2001, Roles of O-linked Oligosaccharides in Immune Responses., *Bioessays.*, 23(1): 46-53
- Varki, A.**, 1992, Selectins and Other Mammalian Sialic Acid-binding Lectins., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 257-66.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J.**, 1999, Essentials of Glycobiology., *Cold Spring Harbor Laboratory Pres.*, 653 sayfa
- Walker, P.A.** (1966): An electron microscope study of the fat body of the moth *Philosamia* during growth and metamorphosis. *J. Insect Physiol.* 12, 1009-1018
- Wu, A.M.**, 2002, Carbohydrate Structural Units in Glycosphingolipids as Receptors for Gal and GalNAc Reactive Lectins., *Neurochemical Research*, 27, (7/8): 593-600
- 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

ADI SOYADI : Atabak NAGHAVİ
DOĞUM TARİHİ : 10.3.1982
YABANCI DİL : Türkçe, İngilizce, Farsça
İLETİŞİM : 0554-2559152
E-posta : atabaknaghavi@yahoo.com

EĞİTİM DURUMU :

Lisans : Moleküler ve Hücre Biyolojisine Mikrobiyal Yaklaşım
Şehit Çemran Üniversitesi. Ahwaz. İran (2002-2006)

Yüksek Lisans :Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji A. B. D. (2007-)

Danışman : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI

Editörlük: "Hücre" öğrenci dergisinin editörlüğü. (2003-2006)

LABORATUVAR DENEYİMLERİ:

Hücre biyolojisi laboratuvar asistanlığı- 1 dönem, Ege üniversitesi (2008)

Genetik laboratuvar asistanlığı -2 dönem. Şehit Çemran Üniversitesi. Ahwaz, İran (2004)

Biyokimya laboratuvar asistanlığı -2 dönem. Şehit Çemran Üniversitesi. Ahwaz, İran (2005)

Mikrobiyoloji laboratuvar asistanlığı -1 dönem. Şehit Çemran Üniversitesi. Ahwaz, İran (2006)

Biolojide laboratuvar teknikleri – 1 dönem. Ege Üniversitesi. İzmir, Türkiye (2008)

Moleküler Biyoloji temel teknikler: PCR, Elektroforez, Kromatografi, karyotip, Bar Body test, Klonlama, Gen Ekstraksiyonu, HPLC/MS, Elektron Mikroskopisi teknikleri.

Florasal Mikroskopisi, İmmünoloji teknikleri.

KATILDIĞI KURS, KONGRE VE SEMPOZYUMLAR:

19. Ulusal Elektron Mikroskopisi Kongresi (22-25 Haziran 2009)

3. Ulusal LC ve MASS Spektrometri Çalıştayı" 20-21 Mayıs 2008 / GATA, Ankara Türkiye

3. Ulusal HPLC ve MASS Spektrometri Sempozyumu". 22-23 Mayıs 2008 / Ankara Türkiye

1. Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi (27-30 Ağustos 2008)

PROJELER:

Tübitak Projesi: “Embriyoda Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Antimüller Hormonda Sialik Asit Değişiklikleri ile Müller Kanalı Apoptozis İlişkisinin Araştırılması” (Bursiyer) 2007-Devam ediyor

YAYINLAR :

Naghavi A., Deveci R.," Başkalaşım Geçiren *Galleria Mellonella* (Lepidoptera) 'nın İpek Bezlerinde Histolizisin Belirlenmesi" "19.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi,Trabzon, 22-25 Haziran 2009 (poster sunumu)"

Deveci R., **Naghavi A.**, Açıkl M., Keskin N., Karaçalı S." Balb/c Fare Embriyolarında Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Erkek Genital Sistemin Gelişmesi ve Tunikamisin Uygulamasının Etkileri" "19.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi,Trabzon, 22-25 Haziran 2009 (poster sunumu)"

Deveci R., Açıkl M., **Naghavi A.**, Karaçalı S. "Balb/c Fare Embriyolarında Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Antimüller Hormon Aktivitesinde Sialik Asidin Önemi" "19.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi,Trabzon, 22-25 Haziran 2009 (Sözlü sunum)"

Deveci R., Bakcan E., **Naghavi A.**, Karaçalı S., "Normal ve N-Glikozilasyonu Engellenmiş Balb/c Fare Embriyolarında Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Müller Kanalındaki Apoptatik Değişikliklerin Belirlenmesi" "19.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi,Trabzon, 22-25 Haziran 2009 (poster sunumu)

Naghavi A. Deveci R. " Büyük Mum Güvesi *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın Başkalaşım Geçiren İpek Bezlerinde Apoptozis ve Nekrozisin Belirlenmesi" 1. moleküler biyoloji ve genetik öğrenci kongresi. Ağustos 2008 (poster sunumu)"