

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ



**KONAK *GALLERIA MELLONELLA* L. ve
ENDOPARAZİTOİD *PIMPLA TURIONELLAE*
L.'NİN HEMOLENİN PROTEİN BİLEŞİMİNE
PARAZİTLEMENİN ETKİLERİ**

**Süleyman KALELİ
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Konya, 1998**

[Faint, illegible text or stamp]

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

78768

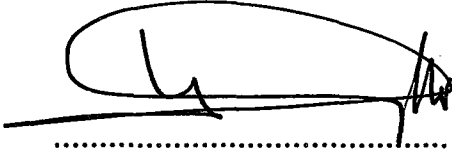
KONAK *GALLERIA MELLONELLA* L. ve ENDOPARAZİTOİD *PIMPLA*
TURIONELLAE L.'NİN HEMOLENF PROTEİN BİLEŞİMİNE
PARAZİTLEMENİN ETKİLERİ

Süleyman KALELİ

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

78768

Bu tez 17.04.1998 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oyçokluğu~~
ile kabul edilmiştir.



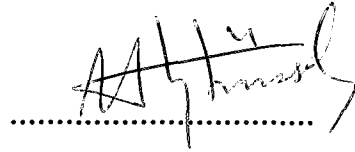
Prof. Dr. M. Yaşar AKSOYLAR

(Danışman)



Doç. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

(Üye)



Doç. Dr. Abdurrahman
AKTÜMSEK

(Üye)

ÖZET

Doktora Tezi

KONAK *GALLERIA MELLONELLA* L. VE ENDOPARAZİTOİD *PIMPLA*
TURIONELLAE L.'NİN HEMOLENF PROTEİN BİLEŞİMİNE
PARAZİTLEMENİN ETKİLERİ

Süleyman KALELİ
Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof Dr. M. Yaşar AKSOYLAR
1998, Sayfa: 59

Jüri: Prof. Dr. M. Yaşar AKSOYLAR
Doç. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
Doç. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Bu çalışmada, konak *Galleria mellonella* L. ve endoparazitoid *Pimpla turionellae* L.'nin larval ve pup gelişim evrelerindeki hemolenf proteinleri ile parazitlemenin konak hemolenf proteinlerine etkileri kolorimetrik ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS - PAGE) yöntemleri ile araştırılmıştır.

Kolorimetrik analizlerinde, konak ve endoparazitoid türün her ikisinde de larval evreden pup evresine doğru hemolenf protein düzeyinin arttığı, pup evresinde ise ergin evreye doğru azaldığı tesbit edilmiştir. Parazitlenmiş konakta, parazitlenmemiş kontrollere göre hemolenf protein düzeylerinde ilk saatte azalma olurken, ilerleyen saatlerde artışın olduğu saptanmıştır.

SDS - PAGE analizlerinde ise, *G. mellonella* ve *P. turionellae*'de her bir türe özgü ve ortak proteinlerin bulunduğu görülmüştür. Protein profilleri, larval evreden pup evresine doğru farklılıklar göstermiştir. 33 kD ve >205 kD'luk proteinlerinin her iki türün larval evresine spesifik olduğu görülmüştür. *G. mellonella*'da 73, 75, 83 ve 88 kD'luk ve *P. turionellae*'da ise 65, 69, 74 ve 83 kD'luk depo proteinleri saptanmıştır. Parazitlenmenin hemolenf protein profilleri üzerine etkileri araştırıldığında ise, parazitlenme ile 15.5, 17.5, 67 ve 82 kD'luk proteinlerin arttığı ve 18, 23, 26, 34, 36, 42, 46 ve >205 kD'luk proteinlerinin ise azaldığı görülmüştür. Parazitlenme ile konak hemolenf proteinlerinin etkilendiği her iki yöntemde de ortaya çıkmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Galleria mellonella*, *Pimpla turionellae*, larval hemolenf proteinleri, pup hemolenf proteinleri, parazitlenmenin etkileri, SDS-PAGE.

ABSTRACT

PhD Thesis

EFFECTS OF PARASITISM ON HEMOLYMPH PROTEIN COMPOSITION
ENDOPARASITOID *PIMPLA TURIONELLAE* L. AND ITS *GALLERIA
MELLONELLA* L.

Süleyman KALELİ

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. M. Yaşar AKSOYLAR

1998, Page: 59

Jury: Prof. Dr. M. Yaşar AKSOYLAR

Doç. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Doç. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

In this study, hemolymph proteins in the developmental stages of larvae and pupae of host *Galleria mellonella* and its endoparasitoid *Pimpla turionellae* and the effects of parasitism on hemolymph proteins were investigated by the colorimetric and sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) methods.

In colorimetric analysis, hemolymph protein levels in both host and endoparasitoid increased from the larval to pupae stages, while it decreased from pupae to adult stage. In parasitized host, unlike unparasitized controls, a decrease at the hemolymph protein levels was seen during the first hour and in advancing hours an increase was observed.

In SDS-PAGE analysis, it was seen that some proteins were common in both *G. mellonella* and *P. turionellae* and some specific to each species. Protein profiles

showed differences from larvae to pupae stages. It was seen that 33 kD and >205 kD molecular weight proteins were specific at the larval stages of both *G. mellonella* and *P. turionellae*. 73, 75, 83 and 88 kD storage proteins in *G. mellonella* and 65, 69, 74 and 83 kD in *P. turionellae* were found. When the effects of parasitism on hemolymph protein profiles were examined, it was observed that levels of 15.5, 17.5, 67 and 82 kD proteins increased and 18, 23, 26, 34, 36, 42, 46 and >205 kD proteins decreased. The both methods showed that host hemolymph proteins were affected by parasitization.

KEY WORDS: *Galleria mellonella*, *Pimpla turionella*, larval hemolymph proteins, pupal hemolymph proteins, effects of parasitism, SDS-PAGE.



ÖNSÖZ

Parazitoid böcekler konaklarını ergin, pup veya larval evrelerinden birisini seçip parazitleme yaparlar. Çeşitli parazitoid ve onların konakları üzerinde bir çok çalışmalar yapılmış ve parazitoidin konak üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkileri araştırılmıştır. Parazitoidin konak hemolenf bileşikleri üzerine çalışmalar hala devam etmektedir. Bu çalışmada ise endoparazitoidin konak hemolenf proteinleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Denek (konak ve parazitoid) kültürleri S. Ü. Fen Edb. Fak. Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deneysel analizler ise S. Ü. Tıp. Fak. Biyokimya ve Ankara Ü. Fen Fak. Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Bu araştırma, “Konak *Galleria mellonella* ve Endoparazitoid *Pimpla turionellae*’nın Hemolenf Protein Bileşimine Parazitlemenin Etkileri” isimli Doktora Tez projesi haline getirilmiş ve Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu (SÜAF) tarafından desteklenmiştir.

Bu konuda çalışmamı tavsiye eden, beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. M. Yaşar AKSOYLAR’a “Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü”, kültür çalışmalarının yapılmasına izin veren bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Baki EYCE, laboratuvar kültür çalışmalarında yardımlarını gördüğüm sayın Doç. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK ve Araştırma Görevlileri Sayın Dr. Z. Ülya NURULLAHOĞLU ve Leyla KALYONCU’ya “Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü Öğretim Elemanları”, kolorimetrik analizlerin yapılmasına izin veren Başhekim Yardımcısı Sayın Doç. Dr. Mehmet GÜRBİLEK ve asistanı Sayın Dr. Mahmut AY’a “Selçuk Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya A. D. Öğr. Elemanları”, elektroforez çalışmalarında maddi ve manevi yardımlarını hiç unutamıyacağım Sayın Doç. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ ve asistanı Sayın Arş. Gör. Sefa Can SAÇILIK’a “Ankara Üniversitesi Fen Fak. Moleküler Biyoloji A. D. Öğretim Elemanları” teşekkürü bir borç bilirim.

Süleyman KALELİ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. MATERYAL VE METOD	7
3.1. Stok Kültürlerinin Hazırlanması	7
3.1.1. Stok <i>Galleria mellonella</i> Kültürünün Hazırlanması	7
3.1.2. Stok <i>Pimpla turionellae</i> Kültürlerinin Hazırlanması	7
3.2. Hemolenf Örneklerinin Alınması	8
3.2.1. <i>Galleria mellonella</i> ve <i>Pimpla turionellae</i> 'nin Larval ve Pup Hemolenflerinin Alınması	8
3.2.2. Parazitlenmiş ve Parazitlenmemiş Konak Hemolenfinin Alınması	9
3.3. Total Hemolenf Protein Analizlerinin Yapılması	9
3.4. Elektroforetik Analizler	10
3.4.1. Native ve SDS-PAGE'de Kullanılan Stok Çözeltiler	10
3.4.1.1. Akrlamid+N.N'-Metilen Bis Akrlamid Stoğu	10
3.4.1.2. Ayırma Jel Tamponu	10
3.4.1.3. Yığma Jel Tamponu	11
3.4.1.4. Koşturma Jel Tamponu	11
3.4.1.5. Örnek Tamponu	11
3.4.1.6. Boyama Çözeltisi	11
3.4.1.7. Boya Çıkarıcı Çözelti	12
3.4.1.8. Moleküler Ağırlık Standardı	12
3.4.2. Elektroforez İçin Protein Örneklerinin Hazırlanması	12
3.4.3. Elektroforezin Yapılışı ve Değerlendirilmesi	13
3.4.3.1. Ayırma Jelin Hazırlanması	13
3.4.3.2. Yığma Jelin Hazırlanması	13
3.4.3.3. Örneklerdeki Protein Konsantrasyonlarının Yarı Kantitatif Tayini	14
3.4.3.4. Elektroforezin Yapılışı ve Jellerin Boyanması	14
3.4.3.5. Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması	14
3.5. İstatistiksel Analizler	15

4. SONUÇLAR	17
4.1. Larval ve Pup Gelişimlerine Göre Kolorimetrik Yöntemle Ölçülen Total Hemolenf Protein Değişimi	17
4.1.1. Konak <i>Galleria mellonella</i> 'nın Gelişim Evrelerine Göre Total Hemolenf Protein Değişimi	17
4.1.2. Endoparazitoid <i>Pimpla turionellae</i> 'nin Gelişim Evrelerine Göre Protein Değişimi	18
4.2. Endoparazitoid <i>Pimpla turionellae</i> Tarafından Parazitlenmiş ve Parazitlenmemiş Konak <i>Galleria mellonella</i> Pupunda Total Hemolenf Protein Değişimi	19
4.3. Elektroforetik Analizler	20
4.3.1. Hemolenf Proteinlerinin Elektroforetik Ayırımı İçin Optimizasyonu ..	20
4.3.2. Larval ve Pup Gelişimlerine Göre Elektroforetik Yöntemle Protein Analizleri	23
4.3.2.1. Konak <i>Galleria mellonella</i> 'nın Larval ve Pup Evrelerinde Protein Değişimi	24
4.3.2.2. Endoparazitoid <i>Pimpla turionellae</i> 'nin Larval ve Pup Evrelerinde Protein Değişimi	29
4.3.3. Parazitlenmiş ve Parazitlenmemiş Konak Puplarında Protein Değişimi	34
5. TARTIŞMA	42
6. LİTERATÜR	50

1. GİRİŞ

Böceklerde protein granülleri pup evresinde yağ dokusunda depo edilmektedir. İlk defa larvanın yağ dokusunda sentezlenen bu proteinler özellikle son larval evrenin beslenme fazı boyunca hemolenfte bol miktarda bulunmuştur. Böceklerdeki bu hemolenf proteinleri, dolaşım sırasında yağ dokusu tarafından tutulmakta ve prepup evrelerinde protein granülleri olarak çöktürülmektedir (Levenbook 1985).

Hemolenf proteinleri bir çok polipeptitlerden oluşmaktadır. Bu polipeptitlerin isim ve molekül ağırlıkları farklı türlerde çok önemlidir (Riddiford ve Law 1983, Levenbook 1985).

Larval hemolenf proteinlerinin kimyasal yapısı ve elektroforetik profilleri bir kaç türde çalışılmış ve proteinler için, sentez mekanizmaları ve fonksiyonları hakkında çok az bilgi mevcuttur (Ueno ve Natori 1982, Ray ve ark. 1987).

Bazı parazitler, peptit veya proteinler salgılayarak konağın fizyolojisi ve gelişimini bozmaktadır. Parazitlenmiş erginlerde, vitellogen sentezi çoğunlukla engellenmiş ve premetamorfik evrelerde arilforin (depo proteini) sentezi önlenmiştir. Sonuçlar parazitin konak böceklerde protein sentezi ve kullanımı üzerine bir çok etkisinin olduğunu göstermektedir (Beckage ve ark. 1987, Beckage 1991).

Himenopter endoparazitoidlerin, konakta bazı biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere neden olduğu saptanmış ve bu değişikliklerin konağın gelişim oranına, besin kullanımına ve başkalaşımına etki ettiği tesbit edilmiştir (Vinson ve Iwantsch 1980).

Parazitlenmeden sonra, konak hemolenfinden, elektroforetik yöntemle ayrışabilen proteinlerin sayısında, protein konsantrasyonlarında, farklı amino asit tiplerinde, hormonal faktörlerde, donma noktasında, kuru ve spesifik ağırlıkta değişikliklerin olduğu görülmüştür (Baldwin ve House 1952, Corbet 1968, Brewer ve ark. 1973, Vinson ve Iwantsch 1980, Beckage 1982, Thompson 1982). Bununla birlikte, hemolenf melaninleşmesinin inhibisyonu, hemolenfteki hemositlerin

dağılımı ve trehaloz şeker düzeyleri üzerinde de değişiklikler meydana gelmektedir (Vinson ve Iwantsch 1980, Stoltz ve Guzo 1986).

Ergezen ve Abdül-Aziz (1991) tarafından SDS-PAGE yöntemiyle yapılan çalışmada, *Galleria mellonella* ve *Oncopeltus fasciatus*'un hemolenfinde protein değişimleri araştırılmıştır. Bu iki türde mevcut proteinler tesbit edilmiş ve molekül ağırlıkları farklı olan bazı proteinlerin bu iki türü ayırdığı görülmüştür.

Bu çalışmada, endoparazitoid *Pimpla turionellae* L. ve konak *Galleria mellonella* L.'nın larval ve pup gelişim evrelerindeki hemolenf proteinlerinin miktarsal ve elektroforetik değişimi yanında parazitlemenin konak hemolenf proteinleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Böceklerin yağ dokusu, metabolizma ve besinleri depo eden organları ile bağlantılı haldedir. Yani bu yağ dokusu, işlev yönüyle omurgalıların karaciğer dokusuna benzemektedir. Yağ dokusu çevresel, hormonal ve büyüme fonksiyonlarında da metabolik homeostazisi devam ettirmektedir. Bu yağ dokusu lipid, glikojen ve proteinleri harekete geçiren, depolayan ve sentezleyen tek bir hücre tipini içerir (Locke ve Collins 1968, Wyatt 1980, Keeley 1985, Gold ve Davey 1989). Böcek yağ dokusunun, proteinlerin de ana kaynağı olduğu kabul edilmektedir (Dean ve ark. 1985).

Böcek hemolenfi çeşitli proteinler ihtiva etmektedir. Bunlar vitellogenler, depo proteinleri, enzimler, hormonlar ve konağın hücrel savunma reaksiyonları ile ilgili proteinlerdir. Çeşitli hemolenf proteinlerinin genetik yapısı, sentez oranı ve buna benzer proteinlerin fonksiyonları hakkındaki çalışmalarda önemli yol alınmıştır. Bilhassa majör proteinler ve depo proteinlerin çeşitli tipleri buna örnek teşkil etmektedir. Başlangıçta, çalışmalara en yakın *Drosophila* iken, daha sonra farklı böcek türleri üzerinde de araştırmalar hızlandırılmıştır (Wang ve ark. 1989, Rosell ve Coons 1991, Ballarino ve ark. 1991). Bu araştırmalarda antibakterial proteinler, yumurta proteinleri, lipoproteinler, depo proteinleri ve böceklere ait ortak proteinlerin önemli gruplarının yapısı ve görevleri hakkında bilgiler çağdaş teknolojinin ilerlemesiyle artmıştır. Fakat bir çok böcek türünde az miktarlarda bulunan peptitler ve proteinlerin az bir kısmı halen tartışılır haldedir. Özellikle rekombinant DNA metotlarındaki önemli teknolojik ilerlemeler bu proteinler hakkındaki yaklaşımları tamamen değiştirmektedir (Grzelak ve Kumaran 1986, Kanost ve ark. 1990).

Depo proteinleri gelişim evrelerinin durmasıyla çarpıcı değişiklikler göstermiştir. Son larval gömlek değiştirmiş bir çok böceğin yağ dokusunda, depo proteinleri faal bir şekilde sentezlenmiş ve hemolenfe salınmıştır. Bu proteinler çoğu kez "larval serum proteini", "larval spesifik serum proteini" veya "larval hemolenf proteini" olarak adlandırılmıştır (Kunkel ve Lawler 1974, Roberts ve Brock 1981,

Duhamel ve Kunkel 1983, Levenbook 1985). Wyatt ve Pan (1978)'in yayınladığı bir araştırmada “Böcek Plazma Proteinleri” adı kullanılmış ve bu çalışma, hemolenf proteinleri üzerindeki son araştırmalara ışık tutmuştur.

Larval hemolenf proteinlerinin depo protein granüllerindeki proteinlerle aynı olduğu Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi (PAGE) ve immünolojik analizlerle saptanmıştır (Wyatt ve Pan 1978).

Bombyx mori'nin hemolenfinde depo protein tiplerine ilaveten son evre larval hemolenfinde 30 kD moleküler ağırlıklı proteinler artmıştır. 30 kD'luk proteinler ergin gelişimin başlangıcına kadar hemolenfte bol miktarda görülmüş ve ergin gelişim boyunca depo proteinlerin oluşumu için bu protein zamanla tüketilmiştir. Olasılıkla, 30 kD'luk protein hemolenfin depolama fonksiyonunda rol almaktadır. Bu proteinin larval evre sonrası protein ve mikrovitellogen olduğu bildirilmiştir (Kawooya ve Law 1983, Ryan ve ark. 1988, Fujiwara ve Yamashita 1990).

Rhynchosciara americana'da, son gömlek değiştirmiş larvanın hemolenfinde proteinler artmış ve yumurtalık gelişimi sırasında tutulmuştur (Marinotti ve De Bianchi 1983).

Son larval gömlek değiştirme evresinde olduğu gibi ipek böceklerinin yağ dokusunda meydana gelen metabolik bozulumda da önemli değişiklikler gösterilmiştir (Inagaki ve Yamashita 1986). Bundan başka son gömlek değiştiren larvanın yağ dokusunda dişi-spesifik depo proteinlerinin sentezi üzerinde eşeyssel dimorfizm görülmüş, fakat bir önceki gömlek değiştirmede juvenil hormon analogunun etkisiyle eşeyssel fark engellenmiştir (Kajiura ve Yamashita 1989).

Beslenme fazı boyunca hemolenfte bol bulunan larval hemolenf proteinleri prepup evresinde yağ dokusu tarafından tutulmaktadır. Yağ dokusu tarafından tutulup sonra hemolenfe serbest bırakılan larval hemolenf proteinlerinin gelişim ile ilgili bir düzen olduğu bildirilmiştir. Lepidopter ve Dipter'ler üzerinde yapılan araştırmalarda, beslenme sonu larvada, yağ dokusu tarafından larval hemolenf proteinlerinin arttırılmasını ekdisteroidlerin uyardığı görülmüştür (Ray ve ark. 1987).

Larval evrede sentezlenmiş proteinlerin konsantrasyonları pup oluşumunda düşmekte, bu düşüş metamorfoz sonuna kadar devam etmektedir. Son larval

beslenme sonunda hemolenf protein düzeyleri artmaktadır. Artan bu proteinler pup evrelerinde yağ dokusu tarafından tutulup depo edilmektedir. Son gömlek değiştirmiş larvada artan bu proteinler ergin evrede düşmüştür. Çünkü bu proteinler ergin dokuların gelişiminde kullanılmıştır (Roberts ve Brock 1981).

Total hemolenf protein düzeyleri her larval evre süresince artmış, larva ve pupun her deri değiştirme esnasında azalmıştır. İlk evrede bu protein düzeyleri düşmüş, fakat son larval evrede çok hızla artmıştır (Wyatt ve Pan 1978).

Böcek plazmasında bulunan protein sayısı sınırlıdır. PAGE analizlerinde 10-30 polipeptit band varlığı tanımlanmıştır (Wyatt ve Pan 1978).

Parazit böcekler gelişimlerinin farklı dönemlerinde konakları üzerinde bir takım etkiler meydana getirmektedir (Beckage 1985, Vinson ve Iwantsch 1980). Böceklerde konak-parazit sistemi, belirli bir konak gelişiminin herhangi bir evresinde bir ara reaksiyondur. Bu sistem dişi parazitin ovipozitoru ile konak üzerine etkisiyle başlar ve metamorfik gelişme sonucu parazitlenmiş konaklardan ergin parazitler çıkar. Parazitlenmenin etkisi ile konak gelişimi tamamen durmuş ve yaşam fonksiyonlarını kaybetmiştir (Jones 1987, Beckage ve ark. 1990). Parazitlenmiş konağın hayat devresinin durması endokrin faktörlere bağlıdır (Beckage ve Riddiford 1982).

Hormonlar canlıların büyüme ve gelişmesinde ilk düzenleyicilerdir. Parazitlenmiş konağın hormonal fizyolojisinde de değişiklikler görülmüştür. Hormonal değişikliklere bağlı olarak dolayısıyla metabolik değişiklikler meydana gelmiştir. Parazitlenme ile juvenil hormonu ve ekdizon hormon düzeylerinde çok hızlı bir azalma olmakta ve parazitlenmiş konak larval evrede ise pupa, pup evresinde ise ergine geçememektedir (Beckage 1985, Beckage ve Templeton 1986, Thompson 1990).

Hızlı büyüme periyodunda olan parazitin beslenmesi ve konak hemolenf komponentinin kullanımı farklıdır. Membrana özel taşıma mekanizması ile düşük moleküler ağırlıklı organik besinlerin karışımını absorblayabilmektedir (Arme ve Coates 1973, Jeffs ve Arme 1984). Protein sentezi ise amino asit absorpsiyonunu takiben meydana gelmektedir (Jeffs ve Arme 1984).

Parazitlenmeyle etkilenen hemolenf metabolitlerinden çözülebilir proteinlerin tipleri ve serbest amino asid konsantrasyonlarındaki değişimin patofizyolojik olarak önem taşıdığı gösterilmiştir. Burada eşey ve yaş farklılığında, konak hemolenf proteinleri üzerine parazitin etkisi olduğu belirtilmiştir (Hurd ve Arme 1984, Ryan ve ark. 1985).

Endoparazitoidler tarafından parazitlenen Lepidopter' lerde konak larvasının hemolenfnde yeni polipeptitler oluşmuştur. Konak içerisinde, parazit gelişiminin son evresi boyunca parazite ait spesifik proteinler görülmüştür (Beckage ve Templeton 1986, Beckage ve ark. 1987).

Parazitlenmiş konak hemolenf komponentinde değişiklikler olurken parazitlenmemiş böceklerde bu değişiklikler görülmemiştir. Farklı proteinlerin sentezine ilaveten yumurta proteinleri gibi spesifik proteinlerin sentezi ve birikmesi de artmıştır (Hughes ve ark. 1983, Beckage ve ark. 1987, 1989).



3. METERYAL VE METOD

3.1. Stok Kùltürlerinin Hazırlanması.

Konak *Galleria mellonella* L. ve endoparazitoidi *Pimpla turionellae* L. kùltürleri S.Ü. Fen-Edebiyat Fakùltesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarında hazırlanmıştır.

3.1.1. Stok *Galleria mellonella* Kùltürünün Hazırlanması.

G. mellonella kùltürü Bronskill (1961)'den yararlanılarak hazırlanmış ve yarı sentetik besin ortamında yetiştirilmiştir. Yarı sentetik besin 200 gr petek, 500 gr kepek, 150 ml distile su, 300 ml gliserin ve 150 ml süzme bal ile hazırlanmıştır. Hazırlanan besin 2 litrelik cam kavanozlara konulmuş ve içlerine bir kaç adet ergin *G. mellonella* bırakılarak kavanozun ağızı çift kat tülbent bez ile kapatılmıştır. Hazırlanan bu kùltürler daha sonra $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de % 60 ± 5 bağıl nemde 12 saatlik fotoperyot uygulanan laboratuvar şartlarında yetiştirilmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 20-30 gün sonra kùltürlerde larvalar görülmeye başlanmıştır. Olgun larvalar kùltürlerden alınarak pelür kağıtları bulunan bir beher içerisine konulmuştur. Beherlerin ağızları çift kat tülbent ile kapatılarak pup oluşumu için aynı laboratuvar şartlarında bırakılmıştır. Larvalar pup oluncaya kadar beklenmiş, oluşan puplar dikkatli bir şekilde pelür kağıtlarından ayrılmış ve *P. turionellae* kùltürleri için kullanılmıştır.

3.1.2. Stok *Pimpla turionellae* Kùltürlerinin Hazırlanması.

P. turionellae erginlerinin bulunduğu 20x20x20 cm boyutlarındaki tel kafeslere bırakılan *G. mellonella* puplarının ergin dişiler tarafından parazitlenmesi sağlanmış ve parazitlenen puplar kafesten behere alınarak ağızı tek kat tülbent ile kapatılmıştır. Parazitlenme tarihi ve saati beher üzerine etiketlenmiştir. Parazitlenme

işleminden 16-17 gün sonra *P. turionellae* erginleri çıkmaya başlamıştır. Çıkan erginler tel kafeslere alınarak %50'lik bal çözeltisi ve konak pup hemolenfi ile beslenmiştir. *P. turionellae* kültürleri *G. mellonella* kültür şartlarında yetiştirilmiştir.

3.2. Hemolenf Örneklerinin Alınması.

3.2.1. *Galleria mellonella* ve *Pimpla turionellae* 'nın Larval ve Pup Hemolenflerinin Alınması.

G. mellonella 'nın 4. 5. 6. ve 7. larval ve pup evreleri tesbit edilmiştir. Parazitlenmiş *G. mellonella* pup örneklerinin günleri takip edilerek *P. turionellae* 'nın 4. 5. larval ve prepup, genç pup, orta yaşlı pup ve yaşlı pup evreleri tesbit edilmiştir. Hazırlanan kültürlerden larval evreler çıkarılmış ve bunların abdomen kısmından ucu çok ince iğne ile delinerek vücut dışına çıkan hemolenf üzeri etiketlenmiş soğuk ependorf tüpe alınmıştır.

P. turionellae ve *G. mellonella*'nın tesbit edilen pup örnekleri, -20°C'lik derin dondurucuda 30 dakika bekletilmiş ve buzlandırılmış petri kabı üzerine alınmıştır. Bistüri ile abdomen kısmından boyuna kesilerek gastrointestinal sistem dışarı atılmış ve yağ dokusu dış deriden ayrılarak üzeri etiketlenmiş soğuk ependorf tüplere aktarılmıştır.

Ependorf tüplerde toplanan larval ve pup örnekleri +4°C, 5000 devir/dk'da 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sentrifügasyon sonucunda ependorf tüplerinde üstte yağ tabakası, ortada süpernatant (hemolenf) ve altta ise presipitant (hücre ve partiküller) tabakası olmak üzere 3 faz görülmüştür. Mikropipetle süpernatant kısmına dikkatlice girilerek hemolenf ayrılmıştır. Ayrılan hemolenfin bir miktarı kolorimetrik analiz için alınmış, kalan kısmı ise elektroforetik analiz için -20°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.2. Parazitlenmiş ve Parazitlenmemiş (kontrol) Konak Hemolenfinin Alınması.

G. mellonella pupları iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup parazitlenme amacıyla tel kafeslere bırakılmış ve ikinci grup kontrol amacıyla dışarıda bırakılmıştır. Tel kafeslere bırakılan konak pupları *P. turionellae* ergin dişileri tarafından parazitlendikten sonra kafeslerden çıkartılmış ve her iki grup puplarından ilk saatten itibaren 3., 6., 12., 24., 36., 48., 60. ve 72. saatlerde hemolenfleri alınmak üzere beherlere aktarılmış ve hangi saate ait olduğu etiketlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen puplar, aynı laboratuvar şartlarına bırakılmıştır. Parazitlenmiş ilk saat puplarından itibaren süresi dolan puplar -20°C'lik derin dondurucuda 30 dakika donmaya bırakılmıştır. Sonra bu puplar buzlandırılmış petri kabı üzerine alınarak bistüri ile abdomen kısmından boyuna dikkatlice kesilmiş ve gastrointestinal sistem çıkarılmıştır. Ayrıca 24. saat ve sonraki parazitlenmiş konak puplarından parazit larvası uzaklaştırılmıştır. Buzlanmayla donmuş yağ dokusu dış deriden ayrılarak üzerinde saatleri ve grupları yazılmış soğuk ependorf tüplere aktarılmıştır. +4°C, 5000 devir/dk'da 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonunda, mikropipetle süpernatant kısmına dikkatlice girilerek hemolenf ayrılmıştır. Ayrılan hemolenfin bir miktarı kolorimetrik analiz için alınmış, kalan kısmı ise elektroforetik analiz için -20°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

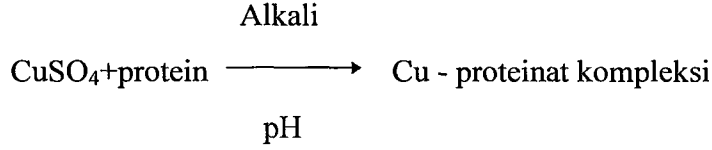
Hemolenf toplanmasında kullanılan bütün ependorf tüplerine melaninleşmeyi önlemek için ve fenol oksidaz aktivitesinin inhibitörü olarak bir miktar kristal feniltioüre ilave edilmiştir (Faye ve ark. 1975, Zupko ve ark. 1993).

3.3. Total Hemolenf Protein Analizlerinin Yapılması.

Toplanan örnekler 0.05M Tris-HCl (pH 6.8) tamponunda ¼ oranında dilue edilmiştir. Bu dilüsyon +4°C, 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilmiş ve berrak kısmından mikropipet yardımıyla 100 µl alınarak total protein analizlerinde kullanılmıştır.

Total protein analizlerinde Biotrol marka ticari kit kullanılmış ve bu çalışma Technicon RA-XT Otoanalizöründe kolorimetrik metotla gerçekleştirilmiştir (Strickland ve ark. 1961).

Deneyin Prensipli:



Proteinlerle reaksiyona giren Cu^{++} iyonu alkali ortamda mavi-menekşe renk kompleksi verir. 550 nm'de oluşan renk kompleksinin absorpsansı alınır.

3.4. Elektroforetik Analizler.

Elektroforez işlemi Laemmli (1970)'e göre yapılmıştır. Protein analizinde Native-PAGE ve SDS-PAGE olmak üzere iki farklı elektroforez tipi uygulanmıştır.

3.4.1. Native ve SDS-PAGE'de Kullanılan Stok Çözeltiler.

3.4.1.1. Akrilamid+N.N'-Metilen Bis Akrilamid Stoğu.

28.8 gr akrilamid (Merck) ve 1.2 gr bis akrilamid (Merck) tartılıp 100 ml'lik balon jode bir miktar distile suda eritilmiş ve son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti Whatman No-1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede +4°C'de saklanmıştır.

3.4.1.2. Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH: 8.6).

18.165 gr tris bazı (Merck) tartılıp yaklaşık 75 ml distile suda çözülerek 6N HCl ile pH 8.6'ya ayarlanmış ve son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti Whatman No- 1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede +4°C'de saklanmıştır. SDS-PAGE için %0.4 oranında SDS ilave edilmiştir.

3.4.1.3. Yığma Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8).

6.05 gr tris bazı tartılıp yaklaşık 60 ml distile suda çözülerek 1 N HCl ile pH 6.8'e ayarlanmış ve son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti Whatman No- 1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede +4°C'de saklanmıştır. SDS-PAGE % 0.4 oranında SDS ilave edilmiştir.

3.4.1.4. Koşturma Tamponu.

1.21 gr tris bazı ve 5.76 gr glisin (Merck) tartılıp 1000 ml'lik balon jodede bir miktar distile suda çözülerek son hacmi litreye tamamlanmıştır. SDS-PAGE için % 0.1 oranında SDS ilave edilmiştir.

3.4.1.5. Örnek Tamponu (4x).

0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8	5.12 ml
Gliserol	8.00 ml
Distile su	7.00 ml
Brom fenol blue	+ <u>çok az miktar</u>

Toplam hacim 20.12 ml'dir.

SDS-PAGE için örnek tamponuna 2.0 gr SDS, 4.0 ml 2-β merkaptotanol ilave edilmiş, distile su miktarı ise 3.0 ml'ye düşürülmüştür. Işıktan korunarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.4.1.6. Boyama Çözeltisi.

Coomassie brillant blue	1.5 gr
İzopropil alkol	250.0 ml
Asetik asit	100.0 ml
Distile su	650.0 ml

Boya çözüldükten sonra Whatman No- 1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.4.1.7. Boya Çıkarıcı Çözelti.

İzopropil alkol	250.0 ml
Glasiyal asetik asit	100.0 ml
Distile su	650.0 ml

Maddeler karıştırılmış ve oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanmıştır.

3.4.1.8. Moleküler Ağırlık Standardı.

Proteinlerin molekül ağırlıklarını hesaplamak için eriyebilen ve liyofilize şeklinde protein standardı (Sigma, Cat. No: M 2789) kullanılmıştır. Kitte bulunan proteinler ve molekül ağırlıkları sırasıyla şöyledir:

α - Laktalbumin	14.2 Kilo Dalton (kD)
Soya tripsin inhibitörü	20.1
Karbonik anhidraz	29.0
Ovalbumin	45.0
Sığır serum albumini	66.0
Fosforilaz b	97.4
β - Galaktosidaz	116.0
Miyozin	205.0

3.4.2. Elektroforez İçin Protein Örneklerinin Hazırlanması.

Toplanan hemolenfler derin dondurucudan çıkarılmış ve 0.05 M Tris-HCl (pH: 6.8) tamponu ile ¼ oranında dilüye edilerek 12500 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Sonra, bu dilüye örnek ¼ oranında tekrar dilüsyona tabi tutulup 12500 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmından 3 hacim örnek + 1 hacim Native PAGE veya SDS-PAGE örnek tamponu alınarak

kariştirilmiştir. SDS-PAGE için hazırlanan örnekler 5 dakika kaynatılarak protein denatürasyonu tamamlanmıştır.

3.4.3. Elektrofrezin Yapılışı ve Değerlendirilmesi.

3.4.3.1. Ayırma Jelin Hazırlanması

Akrilamid/Bis akrilamid (%30)	5.78 ml
Distile su	7.13 ml
1.5 M Tris HCL pH: 8.6	4.33 ml
Amonyum Persülfat (APS)	86.70 µl
Tetra Etil Metilen Diamin (TEMED)	8.16 µl

Maddeler temiz bir beher içerisinde kariştirildikten sonra 0.75 mm aralığa sahip iki cam arasına dökülmüştür. Hava ile teması önlemek için üst kısım doymuş bütanol ile kapatılarak polimerize olması için beklenmiştir. SDS-PAGE için SDS'li ayırma jel tamponu kullanılmıştır.

3.4.3.2. Yığıma Jelin Hazırlanması

Akrilamid/Bis akrilamid (%30)	0.82 ml
Distile su	2.93 ml
0.5 M Tris HCl pH: 6.8	1.25 ml
APS (Merck)	30.00 µl
TEMED (Sigma)	5.00µl

Bu karişım, polimerize olan ayırma jelin üzerindeki bütanol distile su ile yıkandıktan ve tarak yerleştirildikten sonra dökülmüştür. Polimerizasyon oluştuktan sonra tarak çıkarılmış ve tanka yerleştirilmiştir. Tarağın oluşturduğu çukurlukların seviyesini geçecek şekilde koşturma tamponu doldurulmuştur. SDS-PAGE için SDS'li yığıma jel tamponu kullanılmıştır.

3.4.3.3. Örneklerdeki Protein Konsantrasyonlarının Yarı Kantitatif Tayini.

Bunun için spot test kullanılmıştır (Esen 1978). Hazırlanan protein ekstraktlarından şerit halinde kesilen Whatman No 1 kağıdına 2.5 µl emdirilmiştir. Kuruduktan sonra 10 dakika jel boyama solüsyonunda bekletilmiş ve sonra çeşme suyu ile iyice yıkanmıştır. Boyanma derecesine göre örneklerin eşit miktarlarda yüklenmesi sağlanmıştır.

3.4.3.4. Elektroforezin Yapılışı ve Jellerin Boyanması.

Proteinler SDS-PAGE'de 20 ve 35 mA'de, Native PAGE'de ise 20 ve 30 mA'de ortalama 3-4 saat koşturulmuştur. Elektroforez bittikten sonra jeller Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası içinde 1 gece bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra boya çıkarıcı solüsyon içine bırakılmış ve jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır. Son olarak %7'lik asetik asit içerisinde saklanan jeller, ışıklı beyaz bir tablo üzerine konarak karanlık bir odada fotoğrafları çekilmiştir.

3.4.3.5. Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması .

Ayrırma jelde proteinin koştuğu mesafenin izleme boyasının bulunduğu mesafeye oranı Rf değerini vermektedir. Molekül ağırlıklarını bildiğimiz standart proteinlerin her birinin Rf değeri bulunmuştur. Yarı logaritmik kağıtta Rf değeri apsise, proteinlerin molekül ağırlıkları da ordinata konarak bir doğru çizilmiştir. Daha sonra molekül ağırlığı hesaplanacak proteinin Rf değerini bu grafiğe yerleştirerek proteinin molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

3.5. İstatistiksel Analizler.

Total protein bulguları istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Bu maksatla bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları bulunmuştur (Düzgüneş ve ark. 1983, Özdamar 1985).

Aritmetik Ortalama:

$$x = \frac{\sum x_i}{N}$$

Standart Sapması:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}}{N-1}}$$

“t” testi:

Bu test, grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı için yapılmıştır (Düzgüneş ve ark. 1983, Özdamar 1985). Ortalama farklarına ait standart sapmanın hesaplanması için ise sırasıyla şu formüller kullanılmıştır:

$$Sx_1^2 = \frac{(N_1-1).S_1^2 + (N_2-1).S_2^2}{(N_1+N_2)-2}$$

$$Sx_1 - x_2 = \sqrt{Sx_1^2 \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

Yukarıdaki formüllerle hesaplanan değerler aşağıdaki formülde yerine konarak “t” değeri hesaplanmıştır.

$$t = \frac{x_1 - x_2}{Sx_1 - Sx_2}$$

Yukarıdaki formüllerde:

N	: Tekrar sayısı
Σ	: Toplam İşareti
t	: Kritik Oran
X_1	: Her bir Gözlem
SD	: Standart Sapma
$Sx_1 - Sx_2$: Ortalamalar arasındaki farkın hatası
p	: Probabilite “t” hesabından serbestlik derecesine göre bulunan değer
Sx_1	: Her iki gözlemin ortak varyansını ifade etmektedir.

p değeri şu şekilde değerlendirilmiştir (Düzgüneş ve ark. 1983, Özdamar 1985):

$p > 0.05$	ise önemsiz,
$p < 0.05$	ise önemli,
$p < 0.01$	ise çok önemlidir.

4. SONUÇLAR

4.1. Larval ve Pup Gelişimlerine Göre Kolorimetrik Yöntemle Ölçülen Total Hemolenf Protein Değişimi.

4.1.1. Konak *Galleria mellonella* L'nin Gelişim Evrelerine Göre Total Hemolenf Protein Değişimi.

Konak *Galleria mellonella*'nın larval ve pup hemolenfleri ayrılmış ve total hemolenf analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları Tablo 1 'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Konak *Galleria mellonella*'nın gelişim evrelerine göre total hemolenf protein değerleri

Evre	Total Hemolenf Proteini (gr/dl)
	Ortalama ^x ± S.S.
4. larval evre	4.533 ^z ± 0.339 a
5. larval evre	6.733 ± 0.249 b
6. larval evre	8.400 ± 0.327 c
7. larval evre	9.433 ± 0.169 d
Pup evresi	[*] 8.933 ± 0.499 cd

x: Üç tekrarın ortalaması

z: Aynı harfi kapsayan ortalamalar birbirinden farklı değildir (p>0.05)

S.S.: Standart Sapma

Tablo 1'den de görüldüğü gibi 4. larval evreden pup evresine kadar total hemolenf protein miktarının artışında istatiki olarak önemli farklar saptanmıştır. Bu değerlere bakıldığında, 4. larval evreden itibaren 7. larval evreye kadar protein miktarında bir artış görülmüş ve pup evresinde ise istatistiksel olarak önemli olmayan bir düşüş tesbit edilmiştir. Dördüncü ve 5. larval evreler diğer evrelerle karşılaştırıldığında bu artışın çok önemli olduğu (p<0.01) görülmüştür. Altıncı ve 7. larval evreler kendi aralarında karşılaştırıldığında artışın az önemli olduğu (p<0.05)

ve 6. ve 7. larval evreleri pup evresiyle karşılaştırıldığında ise önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.1.2. Endoparazitoid *Pimpla turionellae* 'nın Gelişim Evrelerine Göre Protein Değişimi.

Endoparazitoid *Pimpla turionellae* L'nin larval ve pup evrelerinde total hemolenf protein analizleri yapılmış ve Tablo 2 'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Endoparazitoid *Pimpla turionellae*'nin gelişim evrelerine göre total hemolenf protein değerleri

Evre	Total Hemolenf Proteini (gr/dl)
	Ortalama ^x ± S.S.
4. larval evre	9.467 ^z ± 0.377 a
5. larval evre	11.200 ± 0.979 a
Prepup evre	8.400 ± 1.306 ab
Genç pup evre	5.600 ± 0.864 bc
Orta yaşlı pup evre	5.600 ± 0.327 bc
Yaşlı pup evre	5.333 ± 0.499 c

x : Üç tekrarın ortalaması

z : Aynı harfi kapsayan ortalamalar birbirinden farklı değildir ($p>0.05$)

S.S.: Standart Sapma

Tablo 2 'den de görüldüğü gibi 4. larval evreden yaşlı pup evresine kadar total hemolenf miktarlarında önemli farklılıklar saptanmıştır. Bu değerlere bakıldığında, larval evrelerde protein düzeyleri yüksek bulunurken pup evrelerinde bu değerler düşmüştür. İstatistiksel analizlerine bakıldığında, 4. larval evre genç, orta yaşlı ve yaşlı pup evreleriyle karşılaştırıldığında çok önemli fark ($p<0.01$) bulunmuştur. Beşinci larval evre genç, orta yaşlı ve yaşlı pup evreleriyle karşılaştırıldığında oluşan farkın çok önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.01$). Prepup

yaşlı pup ile karşılaştırıldığında oluşan farkın az önemli olduğu ($p < 0.05$) ve diğer evreler arasında oluşan farkın ise önemsiz olduğu ($p > 0.05$) tesbit edilmiştir.

4.2. Endoparazitoid *Pimpla turionellae* Tarafından Parazitlenmiş ve Parazitlenmemiş Konak *Galleria mellonella* Pupunda Total Hemolenf Protein Değişimi.

Endoparazitoid *Pimpla turionellae* tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak puplarından ilk saatten itibaren 72. saate kadar hemolenfleri alınmış ve total protein analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Endoparazitoid *P. turionellae* tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş *G. mellonella* pupunda farklı sürelerdeki total hemolenf protein değerleri

Süre	<i>G. mellonella</i> pupu total hemolenf proteini (gr/dl)	
	Parazitlenmemiş pup Ortalama ^x ± S.S.	Parazitlenmiş pup Ortalama ^x ± S.S.
İlk saat ^z	8.530 ± 0.499 a	4.667 ± 0.189 b
3. saat	6.400 ± 0.327 a	6.267 ± 0.499 a
6. saat	9.470 ± 0.488 a	6.400 ± 0.377 b
12. saat	8.800 ± 0.377 a	7.867 ± 0.139 b
24. saat	6.400 ± 0.864 a	6.667 ± 0.189 a
36. saat	8.933 ± 0.377 a	7.467 ± 0.377 b
48. saat	6.000 ± 0.327 a	7.200 ± 0.327 b
60. saat	7.267 ± 0.169 a	7.067 ± 0.754 a
72. saat	6.267 ± 0.377 a	8.267 ± 0.754 b

x : Üç tekrarın ortalaması

z : Aynı satırda aynı harfi kapsayan ortalamalar birbirinden farklı değildir ($p > 0.05$)

S.S.: Standart Sapma

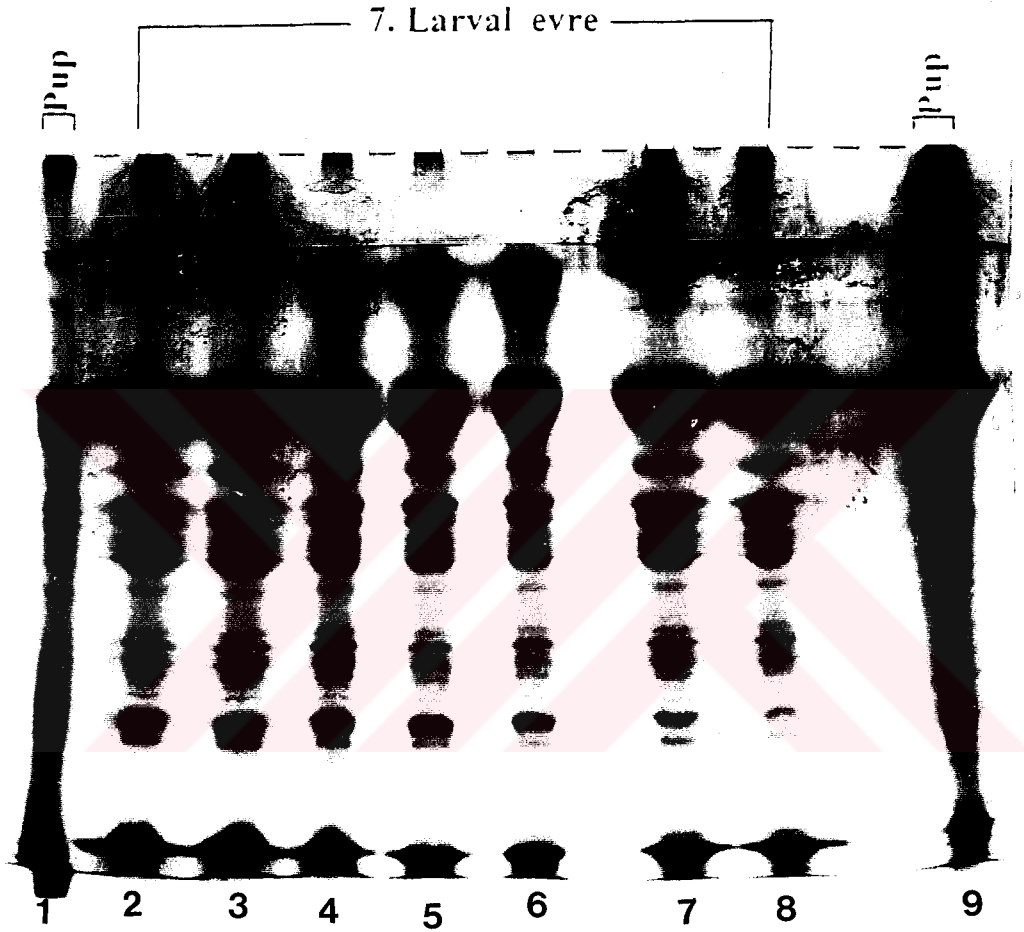
Tablo 3'te görüldüğü gibi, genel olarak bakıldığında, parazitlenmiş pupadaki total hemolenf protein miktarı parazitlenmemiş kontrol pupa göre 48. saate kadar istatistiksel olarak önemli düşüş göstermiş, buna karşılık bu saatten sonra total protein miktarı önemli oranda parazitlenmeyle birlikte artmıştır. İstatistiksel analizlerine bakıldığında, parazitlenmiş konak kontrolleriyle karşılaştırılmış, ilk ve 6. saatlerde oluşan farkın çok önemli olduğu ($p<0.01$), 12., 36., 48. ve 72. saatlerde ise oluşan farkın az önemli olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır. Tablodan da görüldüğü gibi diğer saatlerde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.3. Elektroforetik Analizler.

4.3.1. Hemolenf Proteinlerinin Elektroforetik Ayırımı İçin Optimizasyonu.

Laboratuvar kültür şartlarında yetiştirilen konak *G. mellonella* ve endoparazitoid *P. turionellae* 'nın larval ve pup evrelerinden alınmış olan hemolenf örneklerinin elektroforetik analizleri için SDS-PAGE'de standartizasyon çalışması yapılmıştır.

Bu çalışma için iki farklı hemolenf örnek seçilerek 12500 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilmiş ve dilüye edilmeden %10'luk SDS-PAGE'de direkt koşturulmuştur (Şekil 1.1).

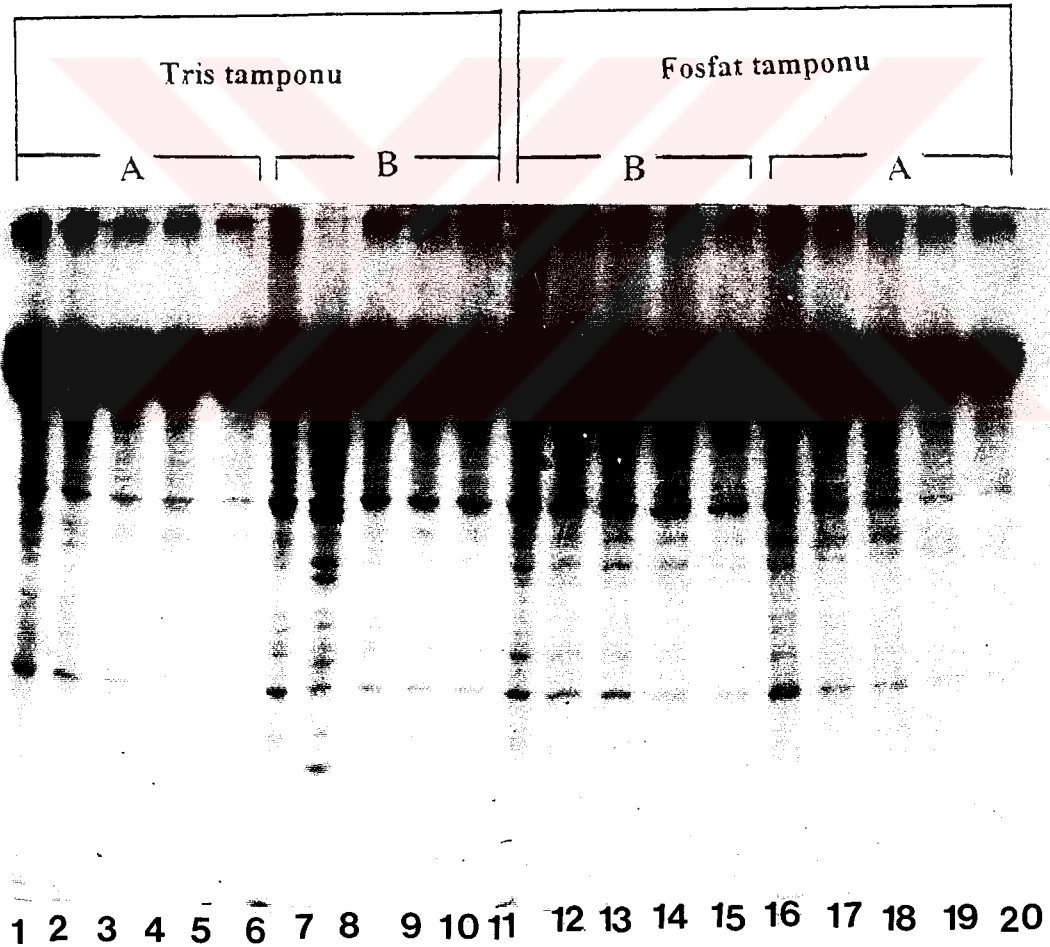


Şekil 1.1. Farklı hemolenf örneklerinin SDS-PAGE’de direkt koşturulması

Şekil 1.1’de, *G. mellonella*’nın 7. larval evre ve pup evresi hemolenf proteinlerinin değişik miktarlarda apliedildiğinde oluşan elektroforetik profilleri görülmektedir. Pup hemolenfi 5 μ l uygulandığında (Hat 1) 10 μ l’lik uygulamaya göre (Hat 9) daha iyi bir ayırım görülmüştür. Larval hemolenf miktarı sırasıyla 10, 9, 8, 7, 6, 5 ve 4 μ l şeklinde (sırasıyla, Hat 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8) uygulandığında proteinlerin ayırımında farklılıklar görülmüştür. Yüksek miktarlarda (10 ve 9 μ l) ve düşük

miktarlarda (5 ve 4 μ l) uygulandığında yığıma jelinden başlamak üzere ayırıcı jelde de devam eden büyük miktarlarda partiküller görülmüştür. 6 ve 5 μ l'lik uygulamalarda ise bu partiküller ortadan kalkmıştır. Dolayısıyla, bu deneyde, örnekteki toplam protein miktarının azaltılmasıyla jelde görülen bu agregatların elimine edildiği görülmektedir.

Oluşan partiküllerin elimine edilmesi için hemolenf örnekleri 0.05 M. pH 6.8 olan tris ve fosfat tamponları ile farklı oranlarda dilüye edildikten sonra SDS-PAGE'de tekrar koşturulmuştur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Farklı hemolenf örneklerinin dilüsyonu sonucu oluşan band profilleri (A: Pup hemolenfi, B: 7. Larva hemolenfi)

Şekil 1.2 'de görüldüğü gibi Şekil 1.1 'da izlenen partiküller tamamen ortadan kalkmıştır. Bu standartizasyon çalışmasında A ile ifade edilen hemolenf örnekler ependorf tübü içerisinde tris (Hat 1-5) ve fosfat (Hat 16-20) tamponlarıyla $\frac{1}{4}$ oranında dilüye edildikten sonra 12500 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/12 oranlarında tekrar dilüsyona tabi tutularak 11300 devir/dk'da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elektroforezde kullanılmak üzere süpernatantları ayrılmıştır.

Şekil 1.2 'de B ile ifade edilen hemolenf örnekleri 12500 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlar tris (Hat 6-10) ve fosfat (Hat 11-15) tamponlarıyla 1/5, 1/10, 1/15, 1/20 ve 1/25 oranlarında dilüye edilmiş ve 11300 devir/dk'da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elektroforezde kullanılmak üzere süpernatantları ayrılmıştır.

Üç kısım A ve B ile ifade edilen süpernatant örnekleri + 1 kısım konsantre örnek tamponu ile karıştırılarak 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Ekstrakte edildikten sonra 10'ar μ l örnekler % 10'luk SDS-PAGE'de koşturulmuştur.

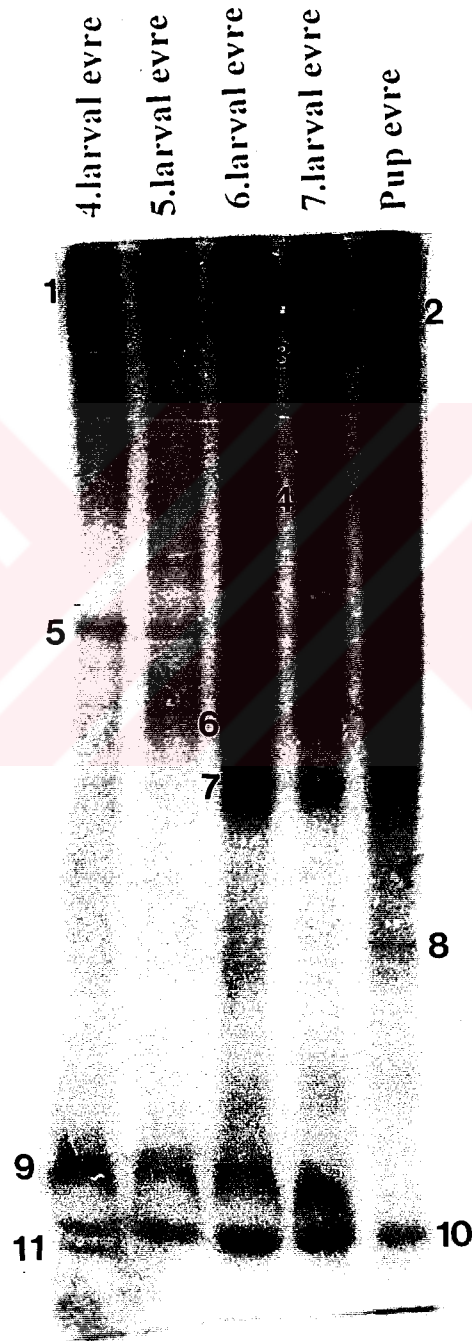
Standartizasyon çalışması sonucunda Şekil 1.2'de A-tris'in 3. Hat band paterni diğer çalışmalar için örnek alınarak hemolenfler elektroforeze bu yöntemle göre hazırlanmıştır.

4.3.2. Larval ve Pup Gelişimlerine Göre Elektroforetik Yöntemle Protein Analizleri.

Bu çalışmada, farklılık gösteren protein bandları değerlendirilmiş ve densitometrik analizlerinde ise tesbit edilebilen pik değerleri %'de miktarlarında verilmiştir.

4.3.2.1 Konak *G. mellonella* 'nın Larval ve Pup Evrelerinde Protein Değişimi.

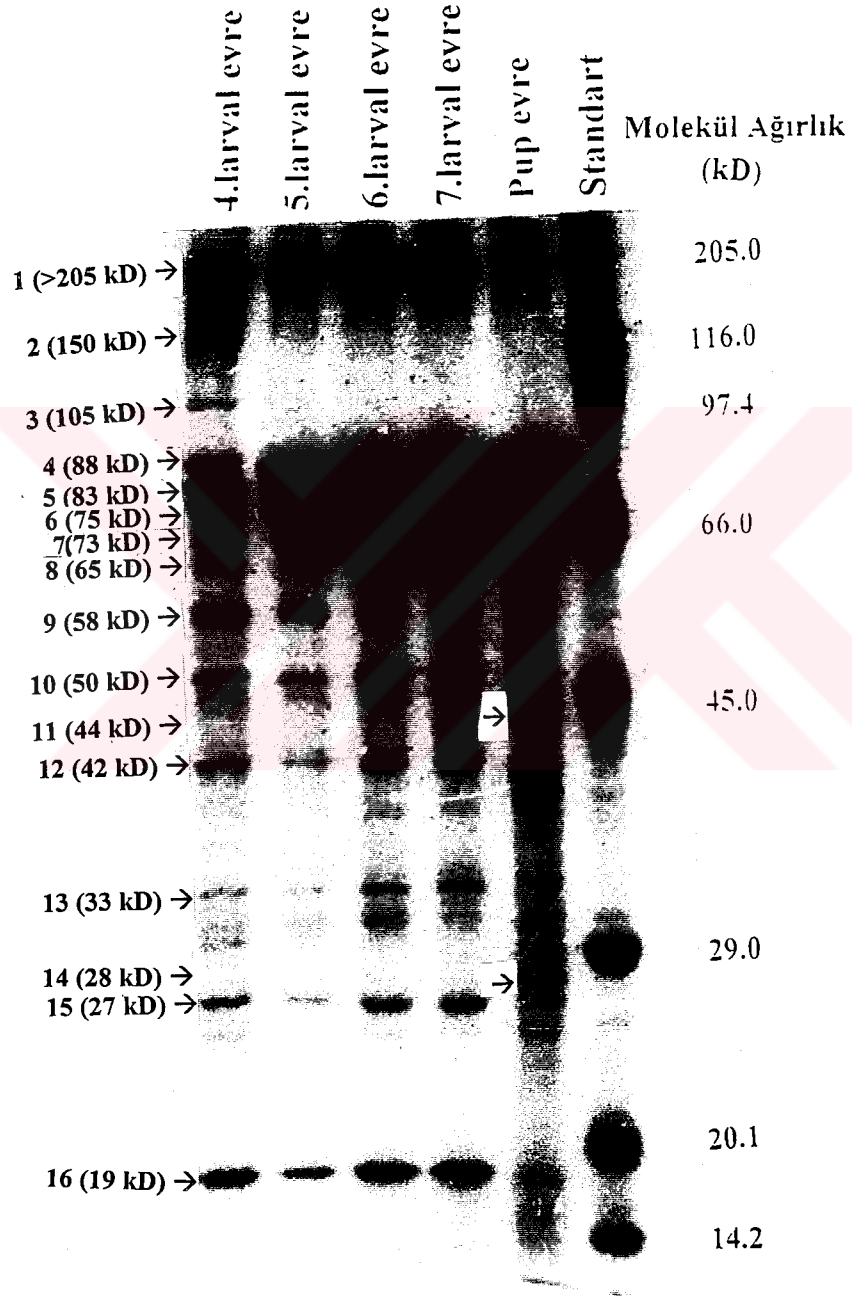
Konak *G. mellonella*'nın 4., 5., 6., 7. larval ve pup evrelerinde Native-PAGE ve SDS-PAGE yöntemleriyle protein ayrımları yapılmıştır (Şekil 2.1 ve 2).



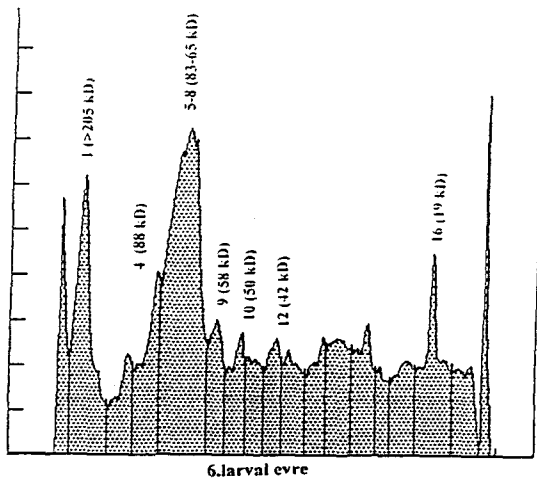
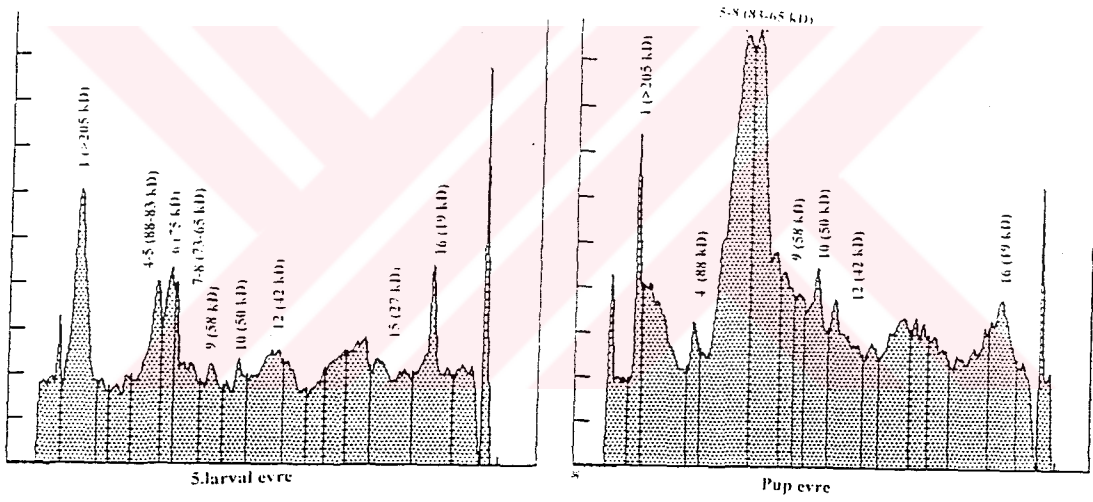
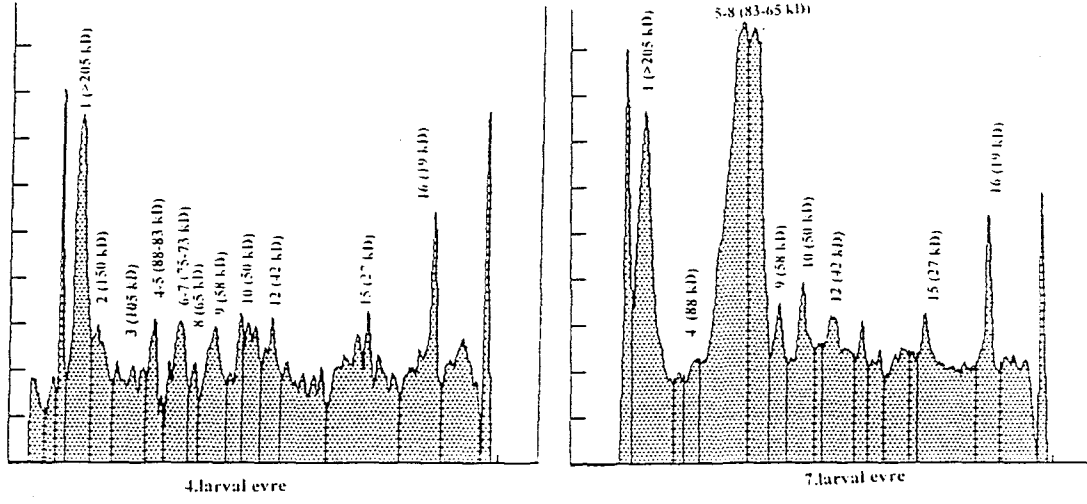
Şekil 2.1. *Galleria mellonella*'nın gelişim evrelerine göre hemolenf proteinlerinin Native-PAGE analizi

Şekil 2.1’da görüldüğü gibi, Native-PAGE ile koşturulan örnekler arasındaki protein bandlarında belirgin farklılık ve benzerlikler izlenmektedir. Yukarıdan aşağıya doğru bakıldığında, 1, 2, 4 ve 10 nolu proteinler larval ve pup evreleri için ortak proteinler olup 4. larval evreden itibaren kademeli olarak bir artış mevcuttur. Üç nolu protein, 4. ve 5. larval evrelerde görülmez iken 6. 7. larval ve pup evrelerinde ortaya çıkmıştır. Beş ve 9 nolu proteinler ise, larva ve pup ayırımında en belirgin proteinlerdir. Bu proteinler larval evrede bulunurken pup evresinde bulunmamıştır. Yedi nolu protein, 6. larval evrede artmış, 7. larval evrede azalmış olarak bulunurken 4. 5. larval ve pup evrelerinde bulunmamıştır. Sekiz nolu protein, sadece pup evrede bulunurken larval evrelerde görülmemiştir. Bu protein pup evresine özgü bir proteindir. Larval evreleri arasındaki bir ayırıcı fark da 11 nolu protein üzerinde izlenmektedir. 4. larval evrede görülen bu protein diğer larval evrelerde görülmemiştir.

Konak *Galleria mellonella*’nın gelişim evrelerine göre hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analizi Şekil 2.2 ve bunların densitometrik analizleri ise Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. *Galleria mellonella*'nin gelişim evrelerine göre hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analizi



Şekil 2.3. Konak *G. mellonella*'nın gelişim evrelerine göre SDS-PAGE' de protein profillerinin densitometrik analizi

Şekil 2.2’de görüldüğü gibi, SDS-PAGE’le koşturulan örneklerin protein profillerinde de farklılıklar izlenmektedir. Bu çalışmada, proteinler molekül ağırlıklarına göre koşturulmuştur. Yukarıdan aşağıya doğru bakıldığında, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15 ve 16 nolu proteinler larval ve pup evreleri için ortak proteinler olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 2 ve 3 nolu proteinler larval evreye özgü proteinlerdir. Bu proteinler şekil üzerinde sırasıyla incelenirse:

Birinci, 9., 10. ve 16. protein bandlarına bakıldığında (sırasıyla yaklaşık, >205, 58, 50 ve 19 kD), bu proteinlerde 4. larval evreden itibaren 7. larval evreye doğru bir artış olduğu izlenmiş ve pup evresinde ise 7. larval evredekinden daha az olduğu görülmüştür. Bu farklılıklar şekil 2.3 ’de de izlenmektedir. Birinci, 9., 10. ve 16. protein bandlarının 4. larval evreden itibaren pup evresine kadar sırasıyla, yaklaşık %11.4-12.3-10.7-12.0-8.7, %5.9-4.0-4.0-3.5-3.6, %4.5-4.3-3.8-5.5-5.4 ve %9.4-9.3-7.9-5.1-5.9 düzeylerinde olduğu tesbit edilmiştir.

İki ve 3. protein bandları (sırasıyla, yaklaşık 150 ve 105 kD) sadece 4. larval evrede izlenirken diğer evrelerde bulunmamıştır. Densitometrik analize bakıldığında (Şekil 2.3), 4. larval evrede 2 ve 3. bandlar okunurken (yaklaşık, sırasıyla % 5.0 ve 6.0) bu bandlar diğer evrelerde değerlendirilememiştir..

Dört, 5., 6., 7. ve 8. protein bandları (sırasıyla, yaklaşık 88, 83, 75, 73 ve 65 kD) 4. ve 5. larval evrelerde çok açık bir şekilde izlenirken protein artışından dolayı 6., 7. larval ve pup evrelerinde sanki büyük bir band görünümünü vermektedir. Şekil üzerinde tek bir band izlenimi veren bu proteinler, jel üzerinde açık bir şekilde izlenmektedir. Proteinler larval evreden itibaren pup evresine kadar kademeli olarak artmıştır. Densitometrik analizlerine bakıldığında, 4. - 5., 6. - 7. ve 8. bandlar tesbit edilebilmiş ve 4. ve 5. larval evrede bu pikler jelde izlendiği gibi ayrılmıştır. Altıncı, 7. larval ve pup evrelerinde ise, jelde olduğu gibi yoğun protein bandları büyük pik çizmiştir. Dördüncü larval evrede bu proteinlerin miktarı sırasıyla %3.4-5.2-1.6 düzeylerindedir. Dördüncü larval evreden itibaren protein artışından dolayı okunan pik değerlerinde artma olmuş ve yaklaşık, sırasıyla %7.8-4.5-5.6 olduğu tesbit edilmiştir. Altıncı, 7. ve 8. bandlara bakıldığında, protein yoğunluğundan dolayı büyük pik çizmiştir.

Onbir ve 14. protein bandlarına bakıldığında (sırasıyla, yaklaşık 44 ve 28 kD), 7. larval evrede azalmış ve pup evresinde ise artmıştır. Bu proteinler diğer larval evrelerde bulunmamıştır.

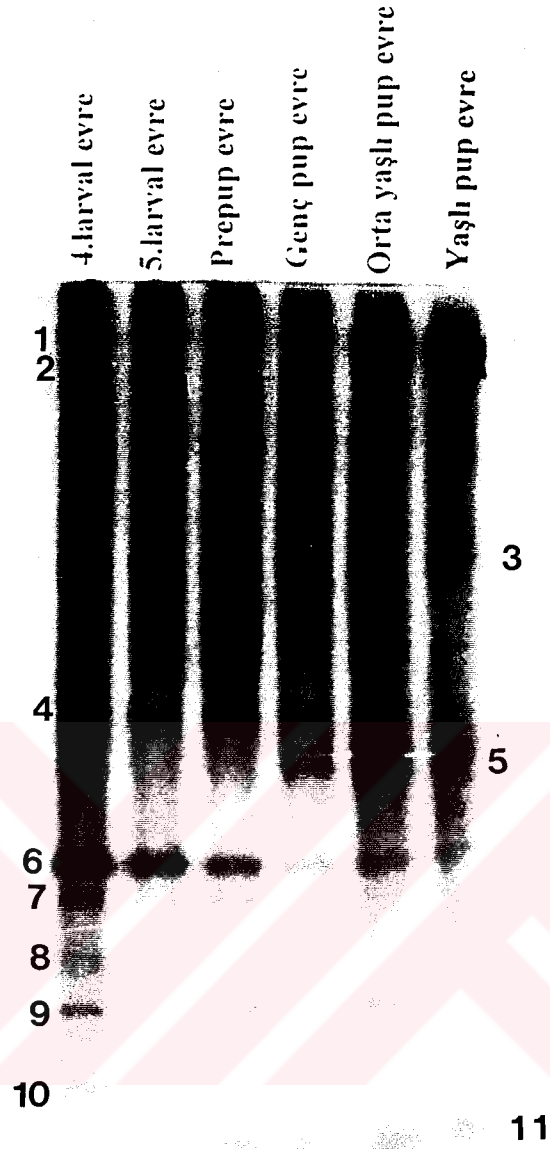
Oniki ve 15. protein bandları (sırasıyla, yaklaşık 42 ve 27 kD) 5. larval evrede azalmış, diğer evrelerde artmıştır. Oniki ve 15. proteinler densitometrik analizde tesbit edilmiş ve 12. band yaklaşık sırasıyla, %4.6-7.8-3.6-6.1-6.6 iken, 15. banda ait pik ise, 6. larval evre ve pup evresinde tesbit edilememiş ve diğer evrelerde sırasıyla, %13.7-7.9-9.6 düzeylerinde bulunmuştur.

Onüçüncü protein bandı (yaklaşık, 33 kD) 7. larval evreye kadar artarken pup evresinde azalmıştır.

4.3.2.2. Endoparazitoid *P. turionellae*'nin Larval ve Pup Evrelerinde Protein Değişimi.

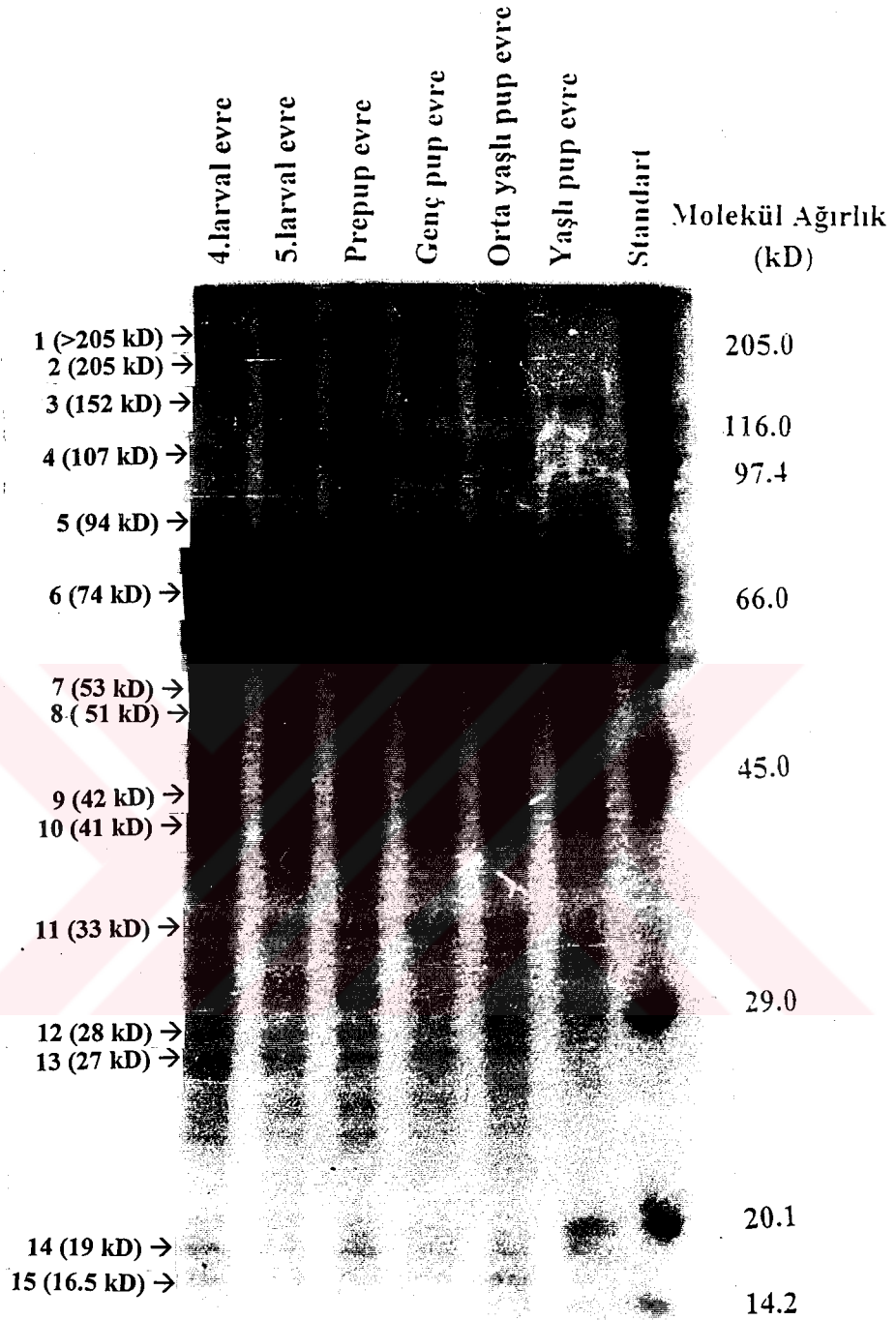
P. turionellae'nin larva ve pup hemolenfleri ayrılmış, Native-PAGE ve SDS-PAGE yöntemleriyle protein ayırımları yapılmıştır.

Şekil 3.1'da görüldüğü gibi, Native-PAGE'de yukarıdan aşağıya doğru bakıldığında protein profillerinde önemli bir çok fark izlenmektedir. Bir ve 11 nolu proteinlerinin larval evreden pup evresine doğru kademeli olarak arttığı izlenirken, 6 nolu proteinin ise larvadan pupa doğru kademeli olarak azaldığı görülmüştür. Üç nolu protein sadece orta yaşlı ve yaşlı pup evrelerinde, 5 nolu protein ise genç, orta yaşlı ve yaşlı pup evrelerinde izlenirken diğer evrelerde izlenmemiştir. Yedi, 8 ve 10 nolu proteinler ise 4. ve 5. larval ve prepup evrelerinde görülürken daha sonra zamanla kaybolmuştur. Dokuz nolu protein ise yaşlı pup evresi hariç bütün evrelerde bulunmuştur.

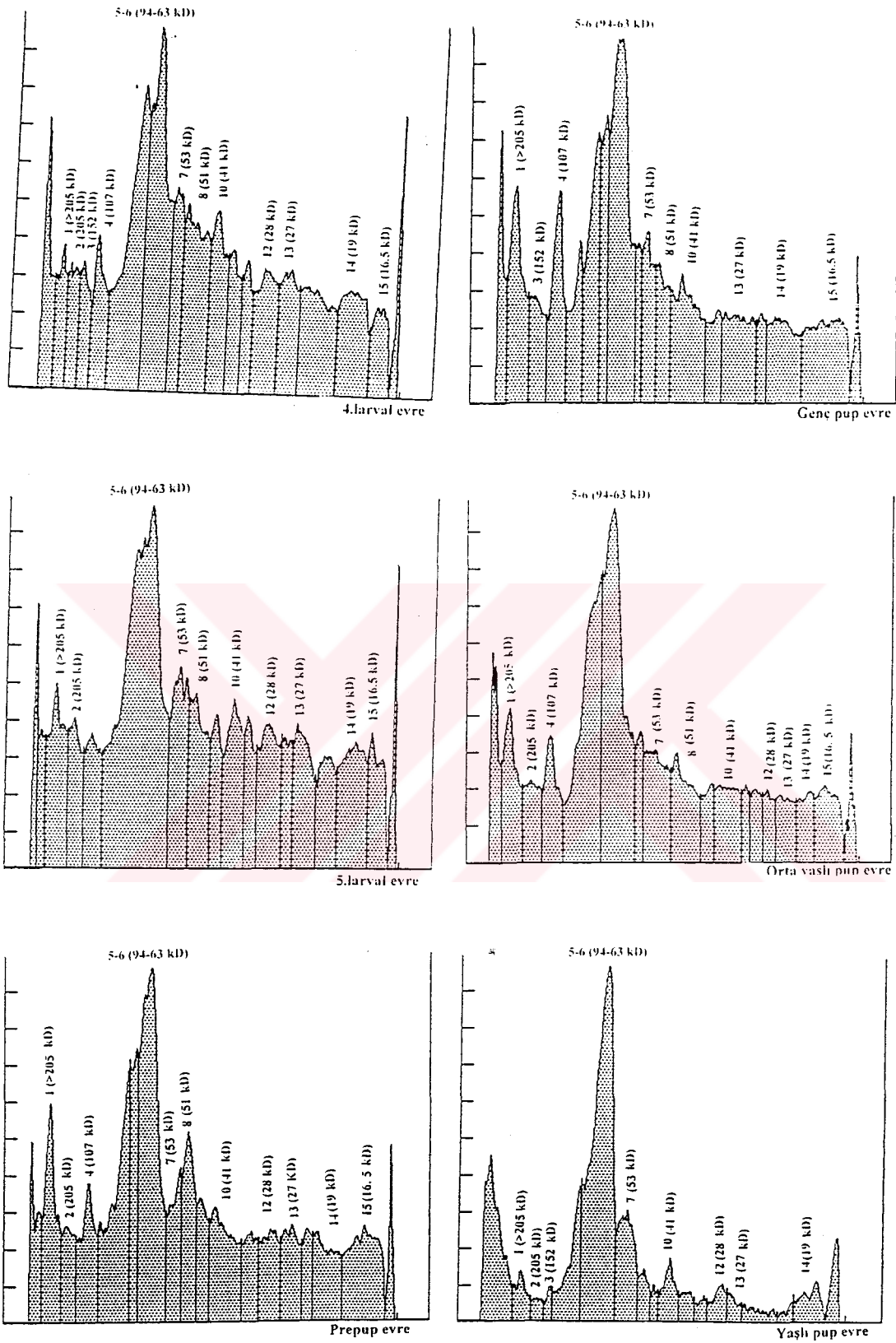


Şekil 3.1. *Pimpla turionellae*'nin gelişim evrelerine göre hemolenf proteinlerinin Native-PAGE analizi

Pimpla turionellae'nin gelişim evrelerine göre hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analizi şekil 3.2 bunların densitometrik analizleri şekil 3.3'de görülmektedir.



Şekil 3.2. *Pimpla turionellae* 'nın gelişim evrelerine göre hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analizi



Şekil 3.3. Endoparazitoid *P. turionellae*'nin gelişim evrelerine göre SDS-PAGE protein profillerinin densitometrik analizi

Şekil 3.2 'de görüldüğü gibi, *P.turionellae*'nin gelişim evrelerinde protein profillerinde önemli farklılıklar izlenmektedir. Bu çalışmada, larval ve pup evreleri arasında ortak ve ayırıcı proteinler tesbit edilmiştir. Protein miktarlarında evrelere göre de farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu proteinleri, tesbit edilebilen densitometrik değerleriyle birlikte sırasıyla inceleyecek olursak; 1. protein bandı (>205 kD) 5. larva, prepup ve genç pup evrelerinde yoğun şekilde bulunurken, 4. larva ve orta yaşlı pup evrelerinde azalmış ve yaşlı pup evresinde ise yok denecek kadar azalmıştır. Densitometrik analizde (Şekil 3.3), 1. banda karşılık gelen pik 4. larval evreden pup evreye kadar sırasıyla %3.1-2.0-6.6-7.1-6.0 ve 2.9 olduğu tesbit edilmiştir.

İkinci protein bandı (yaklaşık 205 kD) 4. larva, prepup ve orta yaşlı pup evrelerinde eşit miktarlarda bulunurken 5. larval evre ve yaşlı pupta azalmıştır. Genç pupta ise bu protein bulunamamıştır. Bu proteinin densitometrik değerlendirilmesi ise genç pupta pik oluşmamış ve diğer evrelerde tesbit edilmiş ve yaklaşık, sırasıyla %3.0-2.9-3.4-3.8 ve 1.2 düzeylerindedir.

Üçüncü protein bandı (yaklaşık 152 kD) bütün evrelerde eşit miktarlardadır. Bu proteinin miktarı az olduğu için 4. larva, genç pup ve yaşlı pup evrelerine ait pik tesbit edilmiş ve değerleri sırasıyla %2.8-3.8 ve 1.1 düzeylerindedir.

Dört ve 5. protein bandları (sırasıyla, yaklaşık 107 ve 94 kD) 4. larval evreden prepup evresine doğru artmış, bu evreden sonra ise azalmıştır. Dördüncü protein bandı 4. larval evreden orta yaşlı pup evresine kadar sırasıyla %4.2-4.4-5.4-6.0 ve 4.9 düzeylerinde iken yaşlı pupta bu proteinler çok az miktarda olduğu için densitometrik olarak değerlendirilememiştir. Beşinci protein bandı ise 6 nolu proteine yakın olduğu için densitometrik tesbiti yapılamamıştır.

Altı numaralı band, şekilde tek band görünümündeyken jelle bakıldığında 5 farklı protein içerdiği görülmüştür. Bu proteinlerin molekül ağırlıkları yaklaşık, sırasıyla 83, 74, 69, 65 ve 63 kD civarındadır. Jel üzerindeki değerlendirmede 74 kD'lik protein diğer evrelerde eşit miktarlarda bulunurken yaşlı pupta kaybolmuştur. Jelde görülebilen diğer proteinler bütün evrelerde eşit miktarlarda olduğu görülmüştür.

Yedi ve 8 nolu proteinler (yaklaşık, sırasıyla 53 ve 51 kD) 4. larval evreden orta yaşlı pup evresine kadar eşit miktarlarda iken, yaşlı pup evresinde ise çok artmıştır. Yedinci ve 8. protein bandlarına ait piklere bakıldığında, protein artışından dolayı yaşlı pufta değerlendirilememiştir. Dördüncü larval evreden orta yaşlı pup evresine kadar bu proteinler sırasıyla, %4.3-6.4-4.4-4.8-7.3 ve %9.0-5.8-5.5-3.9-6.5 düzeylerinde olduğu tesbit edilmiştir.

Dokuzuncu protein bandında (yaklaşık 42 kD) larval evreden prepup evresine doğru bir artış olurken, genç puftan yaşlı pupa kadarki evrelerde bulunmamıştır.

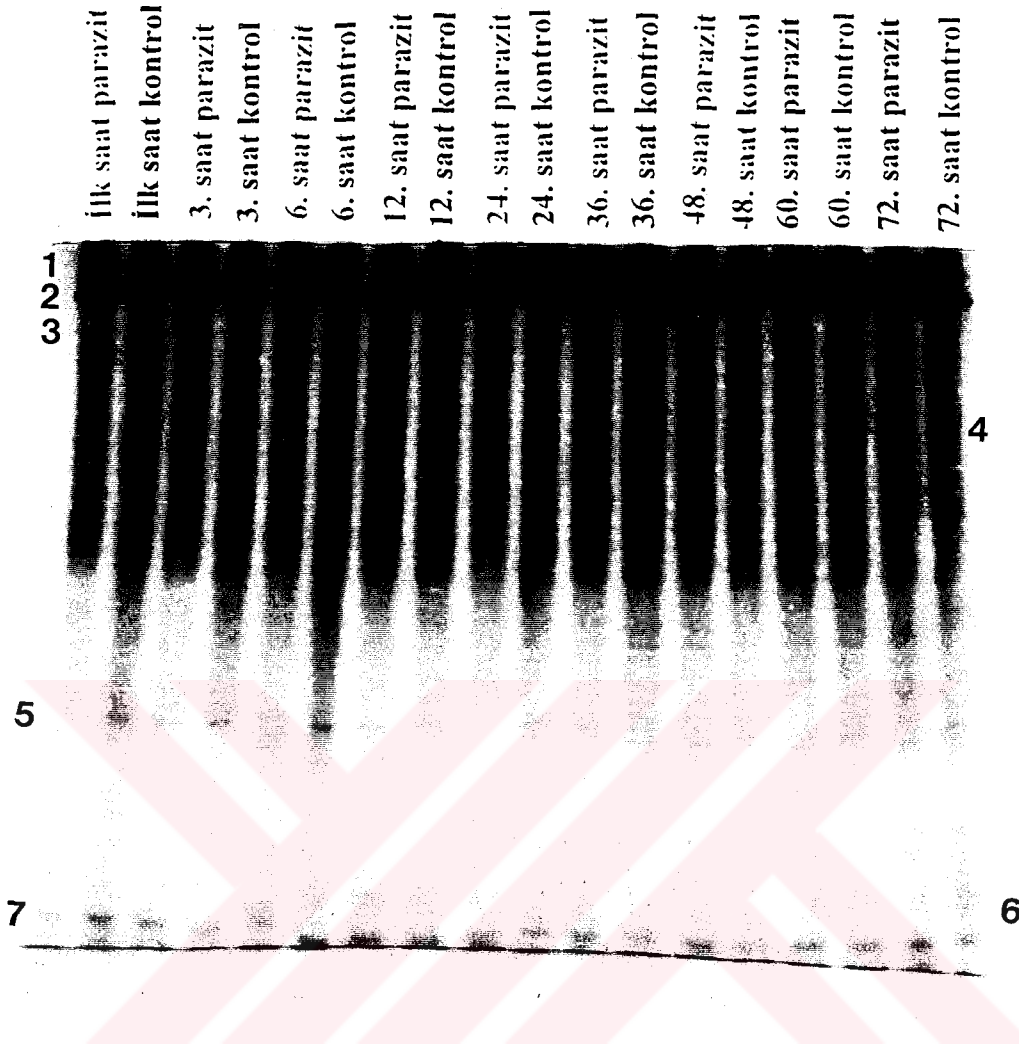
On, 12 ve 13 nolu protein bandlarında (yaklaşık, sırasıyla 41, 28 ve 27 kD) larval evreden yaşlı pup evresine doğru kademeli bir azalma olduğu görülmüştür. Bu proteinler densitometrik olarak değerlendirilmiş ve sırasıyla %6.1-6.0-7.0-8.0-5.2-4.1 %5.9-5.9-4.1-2.3-2.6 ve %4.8-5.0-4.2-6.3-3.4-1.5 düzeylerinde iken 12. band genç pufta tesbit edilememiştir.

Onbirinci protein bandı (yaklaşık 33 kD) orta yaşlı pupa kadar izlenmiş, yaşlı pufta ise ortadan kaybolmuştur. Bu bandların densitometrik olarak tesbit edilememiştir.

Öndördüncü protein bandı (yaklaşık 19 kD) bütün evrelerde görülürken, 15. protein bandı (yaklaşık 16.5 kD) orta yaşlı pup evresine kadar görülmüştür. Öndördüncü protein bandına ait piklerin değerleri, larvadana pupa kadar sırasıyla, %6.3-6.5-4.9-6.0-3.0 ve 4.0 düzeylerindedir. Onbeş nolu protein bandına ait piklerin değerleri ise sırasıyla %3.0-3.7-7.7-8.3-5.0 düzeylerinde iken bu pik yaşlı pufta görülmemiştir.

4.3.3. Parazitlenmiş ve Parazitlenmemiş Konak Puplarında Protein Değişimi.

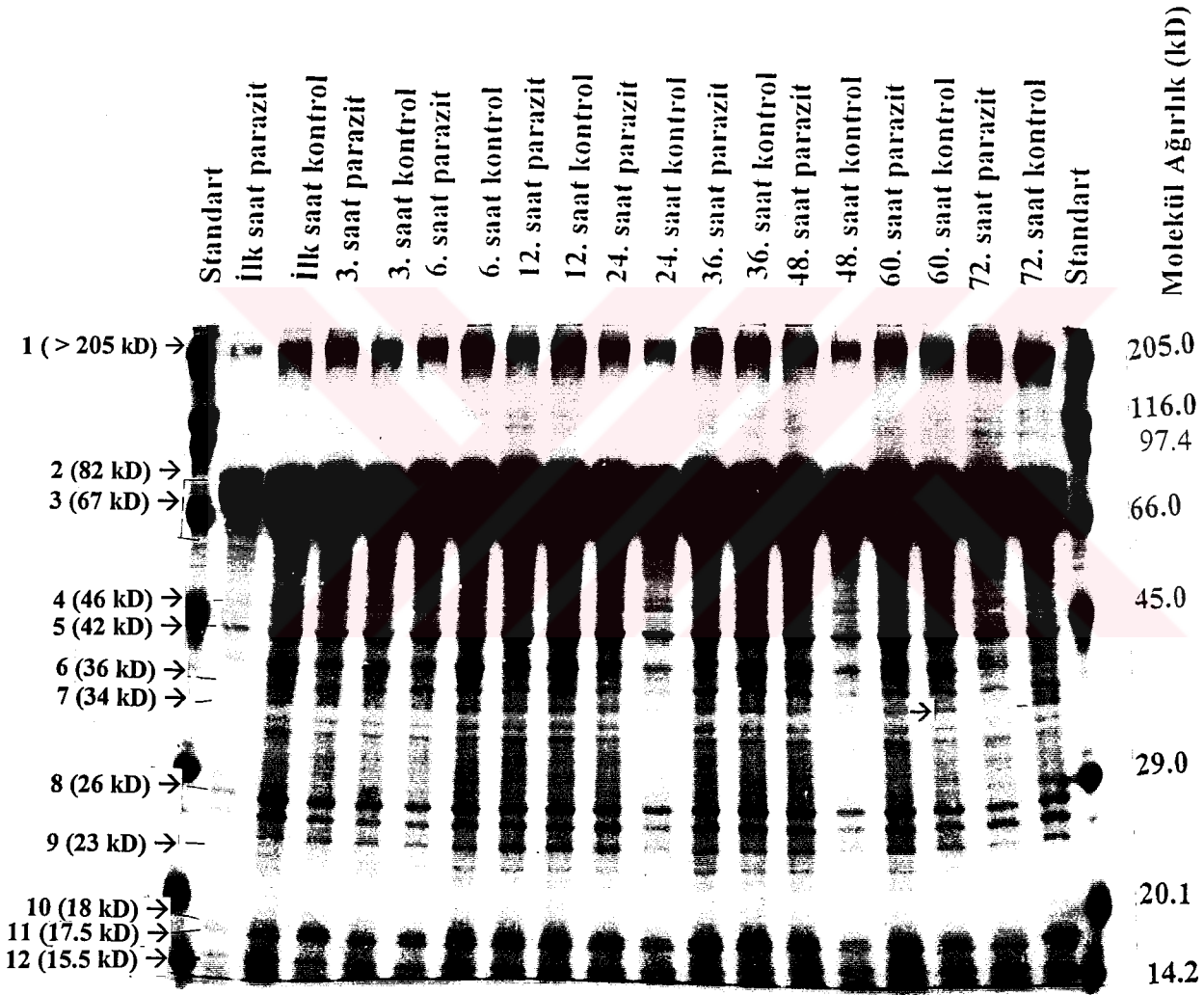
Endoparazitoid *P. turionellae* tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak *G. mellonella* pup hemolenfleri ilk saatten itibaren 3., 6., 12., 24., 36., 48., 60. ve 72. saatlere kadar ayrılmış ve PAGE'de proteinleri koşturulmuştur (Şekil 4.1 ve 2).



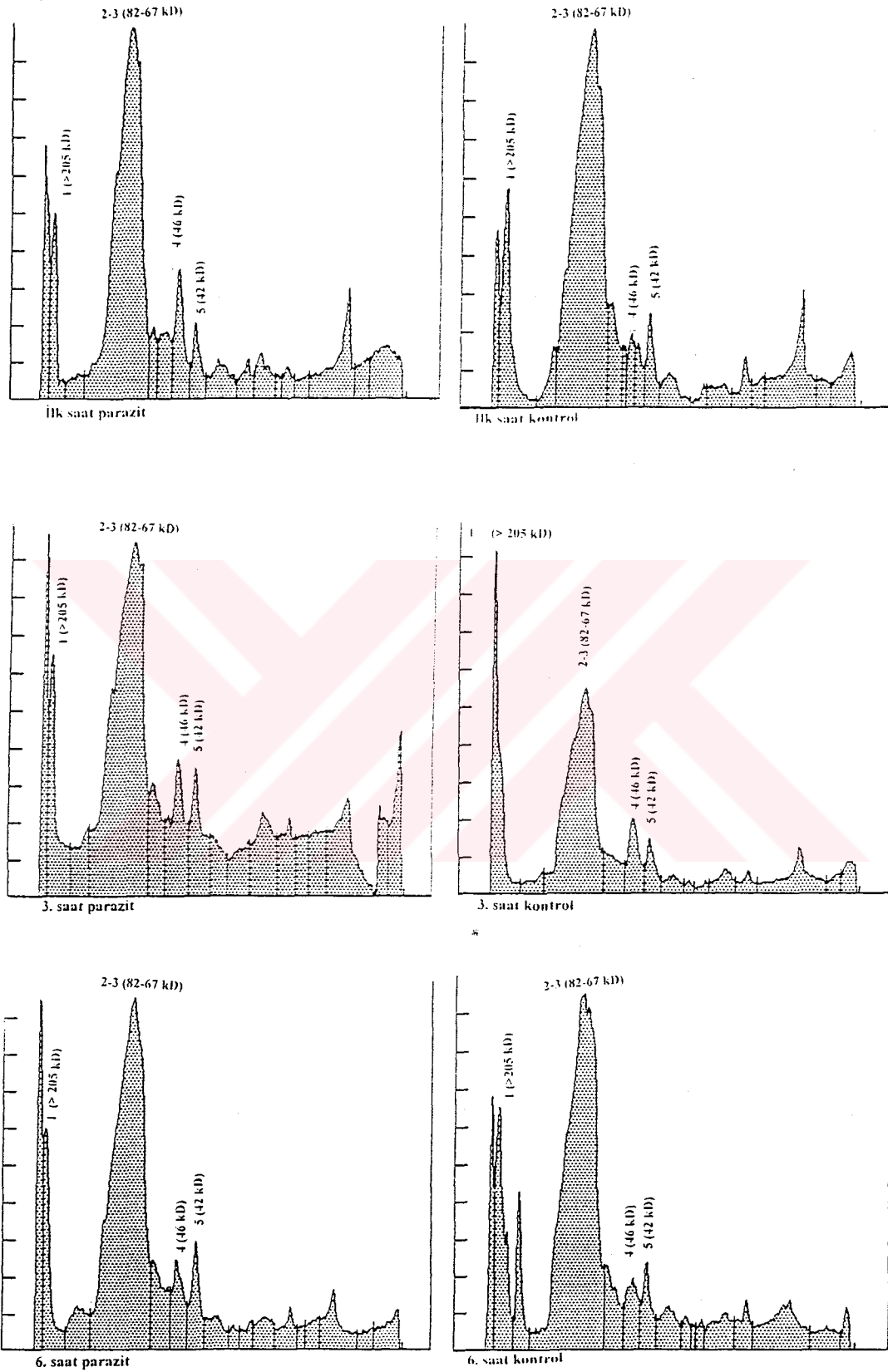
Şekil 4.1. *P. turionellea* tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş *G. mellonella*'nın değişik zamanlardaki pup hemolenf proteinlerinin Native-PAGE analizi (Parazit: Parazitlenmiş konak, Kontrol: Parazitlenmemiş konak)

Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi, Native-PAGE protein profillerinde göze çarpan farklılıklar izlenmektedir. Yukarıdan aşağıya doğru protein bandlarına bakıldığında, 1 ve 2 nolu protein bandlarında 72. saate kadar bir değişiklik izlenmemiştir. Üçüncü protein bandı 3. saate kadar hem parazitlenmiş konakta hem de kontrolünde izlenmiştir. Dört nolu protein bandı 6. saatten itibaren belirgin hale gelmiş ve 24. saatten itibaren parazitlenmiş konakta artmıştır. Beş nolu protein 24. saate kadar parazitlenmiş konakta azalırken, bu saatten sonra artmıştır. Altı numaralı protein 6. saatten sonra görülmeye başlamış ve kontrollerine göre genel olarak azalma izlenmiştir. Yedi nolu protein bandı ilk saatte, parazitlenmiş konakta azalırken diğer saatlerde artmıştır.

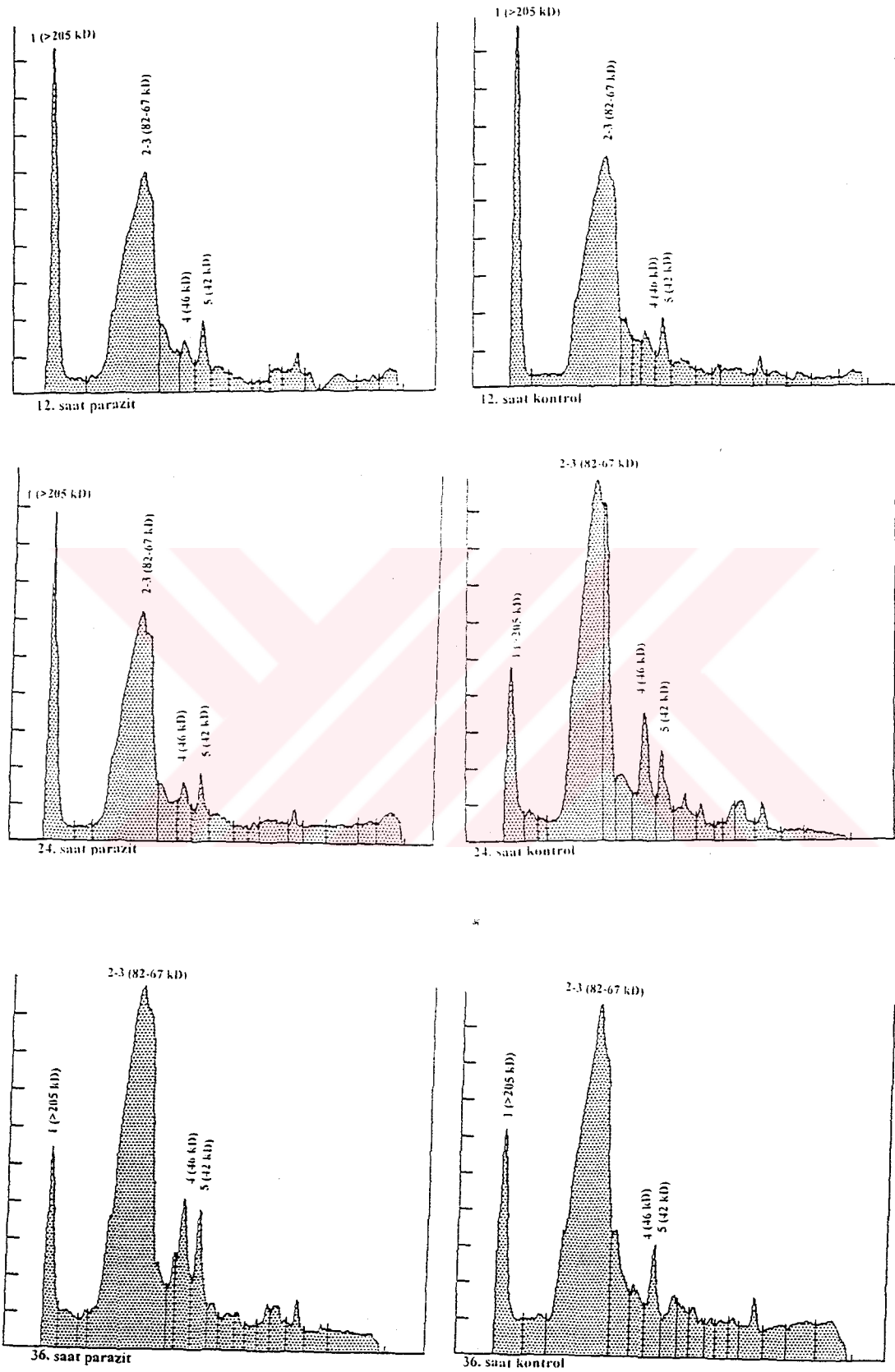
Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak *G. mellonella* puplarının değişik zamanlara göre SDS-PAGE analizi şekil 4.2 ve bunların densitometrik analizleri şekil 4.3, 4 ve 5’de gösterilmiştir.



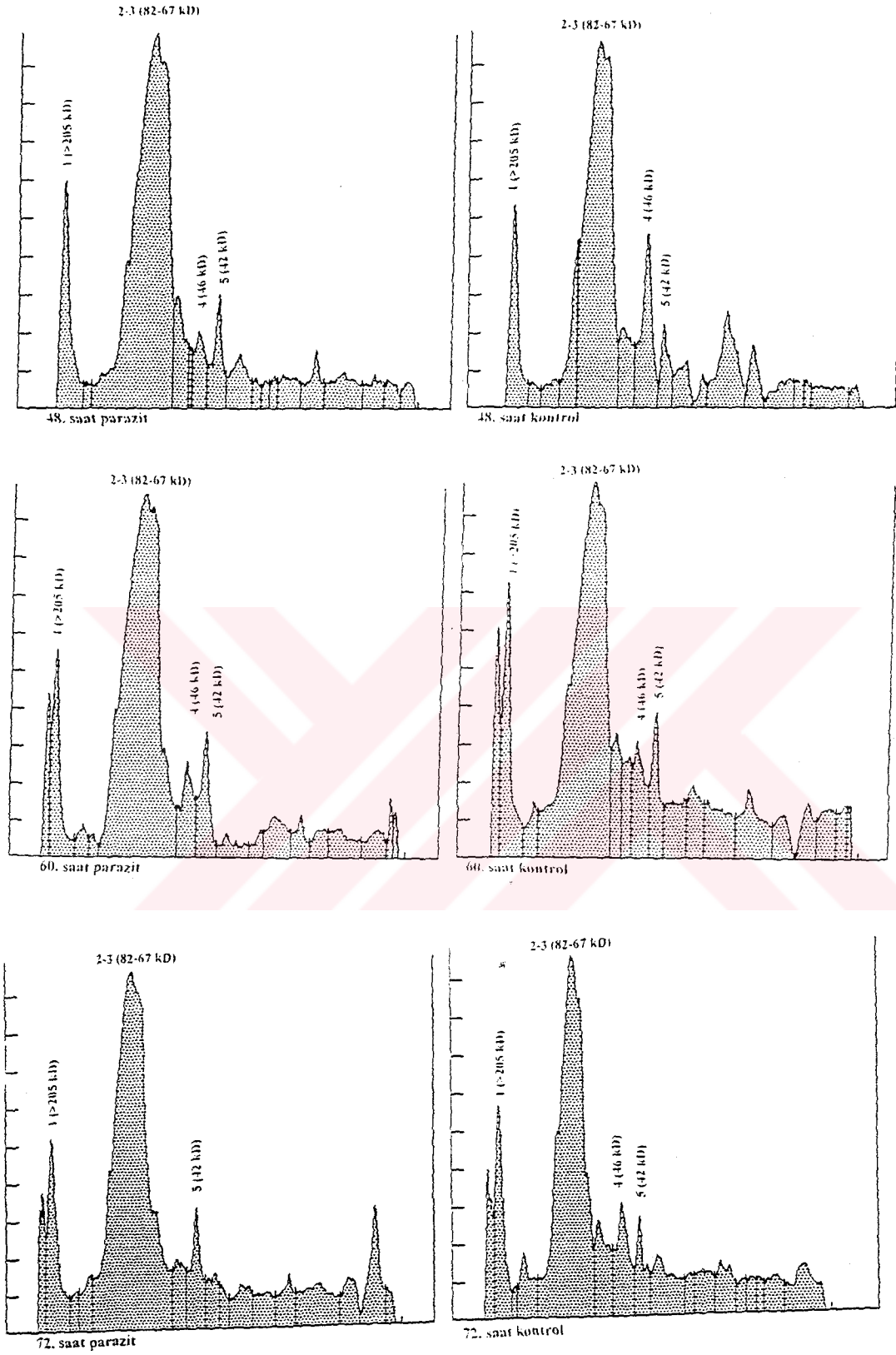
Şekil 4.2. *P. turionellae* tarafından parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak *G. mellonella*'nın değişik zamanlardaki pup hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE analizi (Parazit: Parazitlenmiş konak, Kontrol: Parazitlenmemiş konak)



Şekil 4.3. Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak pupalarında ilk ve 6. saatlerdeki SDS-PAGE protein profillerinin densitometrik analizi



Şekil 4.4. Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak puplarında 12. ve 36. saatlerdeki SDS-PAGE protein profillerinin densitometrik analizi



Şekil 4.5. Parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak pupalarında 48. ve 72. saatlerdeki SDS-PAGE protein profillerinin densitometrik analizi

SDS-PAGE analizlerinde görüldüğü gibi, parazitlenmiş ve parazitlenmemiş konak hemolenfinde genel olarak ortak proteinler içermektedir. Bu çalışmada, parazitlenmeyle oluşan yeni bir protein bandı görülmemiştir. Fakat, protein konsantrasyonu yönüyle farklılıklar görülmektedir. İlk saatte, parazitlenmiş konağın protein miktarında genelde bir azalma izlenmektedir. Parazitlenmeyle, zamanla bazı proteinlerde azalma ve bazı proteinlerde de artma görülmüştür. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, her bir parazitlenmiş konak kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında, 1. protein bandı (>205 kD) kontrollerine göre genel olarak azalmıştır. Densitometrik analizinde ise, bu proteine karşılık gelen pikler ilk saatten itibaren 72. saate kadar önce parazitlenmiş sonra kontrolleri olmak üzere yaklaşık, sırasıyla %5.0-9.0 (İlk saat), %6.6-18.1 (3. saat), %6.1-9.6 (6. saat), %18.8-16.7 (12. saat), %16.1-8.4 (24. saat), %7.1-10.1 (36. saat), %9.3-8.1 (48. saat), %7.7-8.2 (60. saat) ve %7.9-7.6 (72. saat) düzeylerinde olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 4.3, 4 ve 5).

İki ve 3. protein banlarına bakıldığında, şekil 4.2’de iyi değerlendirilememesine rağmen bu band, protein yoğunluğundan dolayı tek band görünümünde izlenmektedir. Jele bakıldığında, 2 nolu protein bariz olarak diğerinden ayrılmıştır. İki nolu proteinin (yaklaşık 82 kD) 24. saate kadar parazitlenmiş konakta kontrollerine göre azaldığı ve bu saatten sonra arttığı görülmüştür. Üç nolu proteinin ise (yaklaşık 67 kD) ilk saatte parazitlenmiş konakta kontrollerine göre azaldığı ve bu saatten sonra arttığı görülmüştür. Densitometrik analizde ise, 2. ve 3. protein bandları birbirine çok yakın ve protein miktarı çok yoğun olduğu için büyük pik çizmiştir. İlk saatten 72. saate kadar önce parazitlenmiş konak ve sonra kontrolü olmak üzere yaklaşık, sırasıyla, %45.0-48.7 (ilk saat), %35.9-44.0 (3. saat), %47.0-48.8 (6. saat), %50.2-53.1 (12. saat), %46.8-58.3 (24. saat), %55.2-47.1 (36. saat), %55.2-49.4 (48. saat), %58.8-42.8 (60. saat) ve %51.7-41.7 (72. saat) olarak tesbit edilmiştir. Onbir ve 12 nolu proteinler ise (yaklaşık, sırasıyla, 17.5 ve 15.5 kD), parazitlenmiş konakta kontrolüne göre 24. saate kadar azalmış ve bu saatten sonra artmıştır.

Dördüncü, 5., 6., 7., 8., 9. ve 10. protein bandları (yaklaşık, sırasıyla 46, 42, 36, 34, 26, 23 ve 18 kD) parazitlenmiş konakta genel olarak azalmıştır. 36 ve 34

kD'luk proteinler 24. saatten itibaren parazitlenmiş konakta kontrollerine göre azalmış ve 34 kD' luk protein parazitlenmiş konağın 72. saatinde kaybolmuştur. 18 kD'luk proteinin ise 36. saatten sonra azaldığı ve 72. saatte kaybolduğu , aksine, bu saatte, kontrolünde bariz bir şekilde artma olduğu görülmüştür. Densitometrik değerlendirmede ise, 4. protein bandı, önce parazitlenmiş konak sonra kontrolü olmak üzere yaklaşık, sırasıyla %5.6-4.1 (ilk saat), %6.4-6.4 (3. saat), %4.3- 3.8 (6. saat), %3.8-3.8 (12. saat), %3.7-6.2 (24. saat), %6.9-3.3 (36. saat), %3.5-9.0 (48. saat), %5.2-5.0 (60. saat), ve %yok-6.8 (72. saat) düzeylerinde olduğu tesbit edilmiştir. Beşinci protein bandı, önce parazitlenmiş konak sonra kontrolü olmak üzere yaklaşık, sırasıyla %2.9-3.1 (ilk saat), %4.8-3.4 (3. saat), %4.3-3.4 (6. saat), %4.1-4.2 (12. saat), %4.2-4.5 (24. saat), %5.8-4.5 (36. saat), %4.5-3.2 (48. saat), %5.2-4.2 (60. saat), ve %5.0-3.8 (72. saat) düzeylerinde olduğu tesbit edilmiştir. Diğer proteinler ise densitometrik olarak değerlendirilememiştir.



5. TARTIŞMA

Larval evrede hemolenf protein düzeyleri beslenmeye bağlı olarak artmaktadır (Jones ve ark 1986). Böceklerde, hemolenf proteinlerinin pup evresinde düşüşünün nedeni, prepup evresinde bu proteinlerin yağ dokusu tarafından tutulmasından dolayıdır (Ray ve ark. 1987). Buna ilaveten, yağ dokusu tarafından tutulan proteinler ergin dokuların gelişiminde kullanılmıştır (Roberts ve Brock 1981). Larval evrede sentezlenmiş proteinler ergin evreye kadar her deri değiştirme sırasında bir önceki evreye göre azalmaktadır (Wyatt ve Pan 1978).

Bu çalışmada görüldüğü gibi, larval evrede hemolenf proteinleri beslenmeye bağlı olarak artmakta ve pup evrelerinde ise yağ dokusunda depo edilerek azalmaktadır. Depo edilen proteinler ergin dokunun oluşumuna katılmaktadır. Bu nedenle hemolenf proteinleri pup evresinde azalmıştır. Yapılan bu çalışma diğer araştırmacıların çalışmalarını desteklemektedir.

Larval serum proteini veya doku proteini Dipter ve Lepidopter'lerin majör hemolenf proteinleridir. Larval evre sonunda bu majör proteinler total hemolenf proteinlerinin yaklaşık %50' sini oluşturmaktadır. Bu proteinler böcek gelişiminde kritik rol oynamaktadır (D'Cruz ve Day 1985).

Bu çalışmalar sırasında, ergin *Galleria mellonella*'nın kanat ve ekstremiteleri ve *Pimpla turionellae*'nin dişi ovipozitoru ve ekstremitelerinde anormallikler gözlenmişti. Bu anormallikler, majör hemolenf protein düzeylerindeki düşüşe bağlı olabilir. Bilindiği gibi, *P. turionellae* kültürleri *G. mellonella* pupundan hazırlanmaktadır. *G. mellonella* pupunda, larvadan pup evresine aktarılan majör protein miktarının düşük olmasından dolayı konak içinde beslenen *P. turionellae* larvası bu proteini yeterli miktarlarda alamadığı ve fizyonomisinde anormalliklerin meydana geldiği düşünülebilir.

Farklı türler üzerinde yapılan çalışmalarda, total hemolenf protein düzeylerinde farklılıkların olduğu bildirilmiştir (Wigglesworth 1972).

Bu çalışmada, *P. turionellae* ve *G. mellonella*'da görülen total hemolenf protein düzeylerindeki genel farklılıklar muhtemelen ayrı tür oluşlarından ileri gelmektedir.

Parazitler, konak hemolenfinin kalitatif ve kantitatif değişimlerine neden olmaktadır. Hemolenf protein konsantrasyonları üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda, parazitlenmiş konak ile parazitlenmemiş konak arasında ilişki kurulmuştur (Schmidt ve Platzer 1980, Womersley ve Platzer 1982, Beckage ve ark. 1989). Parazitlenmiş konağın hemolenf bileşiminde değişimler görülürken parazitlenmemiş kontrollerinde bu değişimler görülmemiştir (Beerntsen ve Christensen 1990).

Bu çalışmada da böyle bir ilişki kurulmuştur. Parazitlemenin ilk saatinde, total hemolenf protein düzeyinde, parazitlenmemiş kontrolüne göre parazitlenmiş konakta hızlı bir düşüş görülmüştür. Hızlı düşüşün nedeni, endoparazitoid yumurtalarını bırakırken muhtemelen immün sistemini bozacak bir takım maddeler enfekte etmesine bağlanabilir.

Parazitoid larvası yumurtadan çıkar çıkmaz beslenme evresine başladığı için, konak hemolenf proteinlerinin azalması düşünülürken aksine artmıştır. Bu artışın nedeni, endoparazitoid larvası tarafından konak yağ dokusu kullanılırken, konak hücrelerinin parçalanması ve doku proteinlerinin hemolenfe geçmesi veya endoparazitoidin salgılamış olduğu protein yapısındaki bir takım maddelerden olabilir.

Diğer bir yaklaşım da, enfeksiyon halinde konak hücrelerinin bol miktarlarda üretilen hücre dışına salgıladığı "Akut Faz Proteinleri" veya "Akut Faz Reaktanları" denilen (Tiftik 1996) proteinler olabilir.

Parazitlenmemiş konak pupunun total hemolenf protein düzeylerinde, ilk saatten 72. saate kadar kendi aralarında değişimler görülmüştür. Bu değişim, konağın metabolizmasına bağlıdır. Çünkü, ergin dokuların oluşabilmesi için hemolenf proteinleri kullanılmaktadır.

Hemolenf proteinlerinin SDS-PAGE'de ayrılması için farklı yöntemler uygulanmıştır (Ferkovich ve ark. 1983, Hurd ve Arme 1984, Ragsdale ve Furgala 1987, Ray ve ark. 1987, Beckage ve ark. 1987, Beckage ve Kanost 1993).

Bu çalışmada, protein yoğunluğunu azaltarak partikülleri uzaklaştırmak için dilüsyon ve sentrifügasyon işlemleri uygulanmıştır. Çünkü ilk çalışmada (şekil 1. 1), santrifüj edilen hemolenf örnekleri poliakrilamid jelde, Laemmli (1970)'ye göre koşturulmuş, proteinlerle birlikte yer yer jel üzerinde ve çoğunluğu jel içinde olan partiküllerin koştugu izlenmiştir. En iyi band paterni elde etmek amacıyla dilüsyon metodu uygulanmıştır. Protein yoğunluğunu azaltmak ve partikülleri elimine etmek için fosfat ve tris tamponlarıyla farklı oranlarda dilüsyona tabi tutup örnekler SDS-PAGE'de tekrar koşturulduğunda, protein bandlarının en iyi Tris-HCl tampon dilüsyonuyla ayrıldığı görülmüştür. Bu nedenle, 3. hattaki ¼'lük dilüsyon diğer elektroforetik analizlerde uygulanmıştır. Bu çalışmada, PAGE' de görülen partiküller muhtemelen hücre metabolik artık maddeleri veya protein türevleri olabilir. Çünkü, protein türevleri, proteinlerin parçalanması ile meydana gelmektedir (Tietz 1987).

Fujiwara ve Yamashita (1990)'nın yapmış oldukları araştırmada, *Bombyx mori* hemolenfinde son larval evrenin ilk gömlek değiştirmeye başlamasından itibaren bitişine kadar majör protein denilen yeni proteinler bulunmuş ve bu protein larval evreden pup evresine dönüşmesinde azalmıştır. Bu proteinin *B. mori* için larval spesifik protein olup molekül ağırlığının 30 kD olduğu bildirilmiştir. İmmünolojik çalışmalarda, *B. mori*'deki 30 kD'luk larval spesifik proteinde farklılıklar görülmüştür. (Izumi ve ark. 1981, Sakai ve ark. 1988). Bu protein lipoforine benzemekte, fakat depo proteinlerinden farklılık göstermektedir. Bu protein 4. larval evrede aktif olarak sentezlenmiş ve hemolenfe salınmıştır (Roberts ve Brock 1981, Fujiwara ve Yamashita 1990, Martel ve Law 1991).

Bu çalışmada, her iki türün larval spesifik protein veya majör proteinin 33 kD molekül ağırlıklı protein olduğu düşünülmektedir. 33 kD'luk protein 4. larval evreden son larval evreye kadar artmış ve *G. mellonella*'nın pup evresinde ise çok azalmış, *P. turionellae*'nin ise orta yaşlı pup evresine kadar azalmış ve yaşlı pupunda kaybolmuştur. Her iki türde de 33 kD' luk proteinin bulunması ve pup evrelerinde kaybolması bu proteinin aynı fizyolojik ve biyokimyasal özelliğe sahip olduğunu düşündürmektedir. *P. turionellae*'de görülmesi ise bu proteinin konaktan alındığı düşüncesini vermektedir.

İki türe ait bir protein benzerliği de >205 kD'luk proteindir. Bu protein 4. larval evreden pup evresine kadar artmış ve pup evresinde ise azalmıştır. Fakat, >205 kD'luk protein hakkında bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu protein, bir larval serum proteini olabilir. 33 kD ve >205 kD'luk proteinlerin 4. larval evrede az miktarlarda olması, bu evrede protein sentezinin başladığı izlenimini vermektedir.

30 kD'luk proteinin sentezi juvenil hormon düzeyinin azalmasıyla başlamıştır (Izumi ve ark. 1984, Koeppe ve ark. 1984, Jefferies ve Roberts 1990). Juvenil hormonu, böceklerde, normal gelişim ve büyümeyi düzenlemektedir (Venkatesh ve ark. 1990, Okot-Kotber ve Prestwich 1991).

33 kD' luk protein juvenil hormonunun fonksiyonuna benzer larval gelişim ile ilgili bir protein olabilir. Bu nedenle, çalışmadaki 33 kD'luk protein tesbiti diğer araştırmacıların çalışmalarını desteklemektedir.

Elektroforez yöntemiyle farklı böcek türlerinin hemolenf protein analizleri yapılmış ve her bir türe özgü protein bulunmuştur (Florkin ve Jeuniaux 1974). Ergezen ve Abdül-Aziz (1991)'in yapmış olduğu çalışmada ise, *G. mellonella* ve *Oncopeltus fasciatus*'un hemolenf proteinleri elektroforetik yöntemle ayrılmış ve gelişimleri arasında önemli farklılıklar saptanmıştır.

Bu çalışmada, iki farklı tür araştırılmıştır. *G. mellonella* ve *P. turionellae*'nin larval gelişimlerinde birbirine yakın proteinler olduğu gibi farklı proteinler de bulunmuştur. Bu farklı proteinler türün kendine has proteinleridir. Elektroforetik protein profillerine bakıldığında, larval evreleri birbirinden ve pup evresinden ayıran proteinler görülmüştür (Şekil 2. 1, Şekil 2. 2, Şekil 3. 1, Şekil 3. 2). *G. mellonella* ve *P. turionellae* arasında da benzer ve farklı proteinler bulunmuştur. Larval hemolenfte proteinlerin yoğun görülmesinin nedeni, larvanın yağ dokusu tarafından sentezlenip hemolenfe salınmasına bağlı olabilir.

Bazı araştırmalarda, *G. mellonella*'nın larval gelişiminde hemolenf proteinleri çalışılmış ve depo proteinlerin genetik yapısı, sentezi ve kimyasal özellikleri üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmıştır (Miller ve Silhacek 1982a ve 1982b, Ray ve ark. 1987).

Ray ve ark. (1987)'nin yapmış oldukları çalışmada, *G. mellonella* 'nın larval hemolenfde 74, 76, 81 ve 82 kD'luk larval hemolenf proteinleri saptamışlardır. Bu

proteinlerin depo protein olduğu bildirilmiştir. 82 kD'luk protein son larval evrede fazla miktarda sentezlenmiştir. Son larval evrede, larval hemolenf protein geninin metamorfik deri değişiminde düzenleyici bir rolü vardır. 82 kD'luk protein sentezinin benzer bir fonksiyona sahip olduğu bildirilmiştir. Son larval evrede bu proteinin sentezlenmesiyle metamorfik deri değişimi düzenlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada 81-82 kD'luk proteinler ile düşük moleküler ağırlıklı proteinler (21-22, 24-26 kD) arasında ilişki kurulmuş ve gelişime bağlı olarak farklılıklar meydana geldiği bildirilmiştir.

Miller ve Silhacek (1982a), 74-92 kD aralığında dağılan ve tek band görünümünde olan proteinlerin depo proteinleri olduğunu bildirmişlerdir.

Bulgularımızda, bu depo proteinleri, *G. mellonella* 'da 73, 75, 83 ve 88 kD ve *P. turionellae*'da ise 65, 69, 74 ve 83 kD olarak saptanmıştır. Depo proteinleri ile ilgili Ray ve ark. (1987)'nin bulgularıyla bu çalışma arasında farklılıklar görülmüştür. Bu farklılıklar molekül ağırlıkları yönündedir. Laboratuvar koşulları, kültürlerdeki besinsel farklılıklar böcek proteinlerini etkileyebilir. Beslenme faktörünün proteinler üzerine etkisi olabileceği ve bu nedenle depo proteinlerinde farklılıklar meydana gelebileceği kanısındayız. Bu farklılıklar, ayrıca, gömlek değiştirme evreleri ve larval ve pup yaşına da bağlı olabilir.

Parazitlenmiş konakta, gelişime bağlı olarak fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu fizyolojik değişikliklerin birisi de konağın parazitlendiği evrede kalması ve bir sonraki evreye geçmesinin engellenmesi şeklindedir (Jones 1986, 1989, Soldevila ve Jones 1991). Parazitoid larvası konak içerisinde beslenirken bir çok besin arasında hemolenf proteinlerini kullanmış ve bu nedenle, konağın hemolenf protein profillerinde bir takım değişiklikler meydana gelmiştir (Ferkovich ve ark 1983, Davies ve Vinson 1986). Fizyolojik değişiklikler ile konağın savunma mekanizmasının baskılanması arasında ilişki kurulmuştur (Guzo ve Stoltz 1985, Stoltz ve Guzo 1986, Beckage ve ark. 1987).

Bu çalışmada, *P. turionellae*'nin ergin dişileri tarafından parazitlenmiş *G. mellonella* puplarının içerisinde parazitoid çıkmasa dahi, konağın pup evresinde kaldığı ve yaşam fonksiyonunu yitirdiği izlenmişti. Parazitlenmeyle konağın aynı evrede kalması, diğer araştırmacıların görüşünü desteklemektedir.

Lawrence (1990)'nin yapmış olduğu çalışmada, parazitlenmiş *Anastrepha suspensa* pupunda 24 ve 36. saatlerde 24 kD'luk protein gösterilmiş ve bu protein parazitlenmeye bağlı spesifik protein olarak tanımlanmıştır. Ferkovich ve ark. (1983) ise, böyle proteinlere "parazitizm spesifik protein" adını vermişler ve 24 kD'luk proteinin glikoprotein yapısında olduğunu, Rolle ve Lawrence (1994a) çalışmalarında bildirmişlerdir.

Beckage ve ark. (1989)'nin yapmış oldukları çalışmada konak *M. sexta* ve parazitoid *Cotesia congregata*'nın konak parazit sisteminde, 5. saatten sonra parazitin oluşturduğu 33 kD'luk protein görülmüştür. Bununla birlikte *C. congregata*'nın over kaliksinden salınmış Polydnvirüs'ün enjeksiyonu ile parazitlenmiş *M. sexta*'nin hemolenfinde 33 kD'luk proteinin meydana gelmesine neden olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, Schmidt ve ark. (1990), parazitlenmeyle oluşan 42 kD'luk proteine virüslerin neden olduğunu bildirmişlerdir. Virüslerin bu proteini konak hemolenf ve yağ dokusuna salgıladığı ileri sürülmüştür.

Parazitoid *Compoletis sonorensis*'in kalix sıvısında yıkanan yumurta, parazitlenme boyunca konak *Heliiothis virescens* içine enjekte edilmiştir. Konağın savunma sistemine rağmen endoparazitoidin gelişimi başarılmıştır. Çünkü yumurta, hemositik kapsül oluşturmasıyla korunmuştur. Böylece, savunma sistemine karşı oluşan maddeler parazitoid tarafından fagosite edilmiştir (Ford 1986, Miller ve Silhacek 1992, Strand ve Pech 1995). Cook ve ark. (1984)'nin araştırmasında ise, *C. sonorensis* tarafından parazitlenmiş *H. virescens*'in hemolenfinde sentezlenmiş 50-55 kD proteinlerinin glikoproteinler olduğu bildirilmiştir.

Luckhart ve Webb (1996)'in çalışmalarında Polydnvirüs'ün olmadığı, fakat, kalix sıvısında overe ait 29-36 kD protein grupları bulunmuştur. Bu proteinlerin ergin dişi üreme organında sentezlendiği ve oviposizyon sırasında konağa salındığı bildirilmektedir. Bu proteinler parazitlenmiş konak hemolenfinde parazitlenmenin 3. saatinden 96. saatine kadar görülmüştür. Bu proteinlerin glikoform yapısında olduğu bildirilmiştir.

Konakların içine parazitler tarafından bırakılan glikoproteinler patojenite oluşumu ve enzimatik aktiviteyi sergilemektedir. Ayrıca glikoproteinlerin konak için

potansiyel zararlı faktörler olduğu ve parazit beslenmesine katkıda bulunduğu düşünülür (Rolle ve Lawrence 1994b).

Bu çalışmanın ilk saatteki protein profillerine bakıldığında, parazitoidin yumurtasını bırakmasıyla bütün proteinler kontrolüne göre azalmıştır. Bununla birlikte >205, 46 ve 42 kD'luk proteinler ilk saatten itibaren ve 36, 34, 26, 23 ve 18 kD'luk proteinler ise ilerleyen saatlerde azalmıştır. Parazitlenmiş konaktaki protein miktarının azalması, endoparazitoidin yumurta ve larvasının korunması amacıyla parazitoidin bir tepkisi olabilir. Bu tepki, parazitin yumurta ile birlikte bu proteinlerin azalmasını etkileyen bir takım maddelerin salgılanması şeklinde olabilir.

Parazitlenmiş konakta 3. saatten sonra 67 kD' luk proteinin, 24. saatten sonra 15.5 ve 17.5 kD'luk proteinlerinin ve 36. saatten sonra ise 82 kD' luk proteinin artması konağa enjekte edilen maddelere veya yumurtadan çıkmış parazitoide karşı bir savunma proteinleri olabilir.

Genel olarak, 3. saatten itibaren parazitlenmiş konakta artan proteinler ise, konağın salgıladığı savunma proteinleri olduğu düşüncesini vermektedir. Çünkü, parazitoid ovipozitorunu konağa batırır batırmaz parazit-konak etkileşimi başlamaktadır.

Diğer bir yaklaşım da, ilk saatten 24. saate kadar parazitlenmiş konakta artan proteinler, konağın homeostazisini bozan parazitoid yumurtasıyla birlikte salgılamış olduğu proteinler ve 24. saatten sonra azalan proteinler ise parazitoidin kullanmasıyla azalan proteinler olabilir. Çünkü, konak içine bırakılmış *P. turionellae*'nin yumurtası laboratuvar şartlarında 24 saatin sonunda açılır ve 1. larval evreleri hemen beslenmeye başlar. Özellikle, parazitlenmiş konakta 18 kD'luk protein 36. saatten itibaren azalmaya başlamış ve 72. saatte kaybolmuştur. Bu bulgumuz, parazitoid larvasının bu ve bunun gibi proteinleri kullanarak azalttığı ve muhtemelen tamamen tükettiği düşüncesini vermektedir.

Bu çalışmada, parazitoid yumurtasını bıraktıktan sonra yeni proteinler görülmemiştir. Yeni protein bandlarının bulunmaması *P. turionellae*'nin over kaliksinden bırakılan bir virüsün olmadığı düşüncesini vermektedir. Bu düşüncemiz, Luckhart ve Webb (1996)' in çalışmasını desteklemektedir. Parazitlenmeyle belirli

sürelerde protein miktarlarındaki artma veya azalma yönündeki bulgularımız ise diğer araştırmacıların bulgularını desteklemektedir.

Böceklerde en önemli larval serum proteini (LSP-1) ile memelilerdeki C bağlayıcı protein arasında yapısal ve fonksiyonel benzerlikler D'Cruz ve Day (1985) tarafından araştırılmıştır. C inhibitörleri yüksek moleküler ağırlıklı proteinler olup hücre lysis'inin (hücre erimesi) inhibitörü olarak iş görmektedir. Bu iş 75-80 kD' luk proteinlerin azaltılması şeklindedir.

Omurgalılarda akut faz proteinleri adı verilen proteinler mevcuttur. Enfeksiyon dönemlerinde artış gösteren bu proteinlerin konsantrasyonlarında artış oranları ve zamanları birbirinden farklıdır. Bu proteinler α_1 antitripsin (55 kD), α_1 asit glikoprotein (40 kD), seruloplazmin (160 kD), C₄ proteini (206 kD), Fibrinojen (340 kD), C₃ proteini (180 kD) ve C-reaktif protein (120 kD)' leridir (Tiftik 1996). Parazitlenmeyle artan proteinler ile akut faz proteinleri arasında bir ilgi kurulabilir.

Şekil 2.1 ve 3.1'ya bakıldığında *G. mellonella*'nın pup evresinde az miktarda görülen 33 kD'luk proteinin, *P. turionellae* larvası tarafından beslenme evresinde alındığı ve sadece larval evrelerinin aynı proteini sentezlediği sonucuna varılmıştır. Bu protein yaşlı pup evresine kadar taşınmış ve bu evrede kaybolmuştur. Bu proteinin her iki türün çok önemli bir proteini (majör protein) olup ergin dokuların teşekkülünde kullanılmıştır. *P. turionellae*'nin yaşlı pupu oluşunca hemen hemen ergin dokuların teşekkülü tamamlanmaktadır. Bu nedenle, orta yaşlı pup evresi sonuna kadar bu protein kullanılmıştır. *G. mellonella*'nın pup evresi meydana gelir gelmez hemolenf örnekleri alındığı için bu protein az da olsa görülmüştür. Pup evresinin ergine dönüşümü sırasında hemolenf örneklerinin alınması durumunda 33 kD'luk proteinin muhtemelen kaybolacağı düşünülmektedir. 33 kD'luk proteinin gelecek çalışmalara ışık tutacağı kanaatine varılmıştır. Ayrıca, parazitlemenin proteinler üzerine etkisinde, *P. turionellae*'nin konak hemolenf proteinlerini etkileyecek bir virüs salıp salmadığı konusunun araştırılması ve parazitlenmeyle miktarı artan proteinlerin ise akut faz proteinleri yönünden gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanaatine varılmıştır.

6. LITERATÜR

- ARME, C., COATES, A. (1973) *Hymenolepis diminuta*: Active transport of α -aminoisobutyric acid by cysticeroid larvae. Inf. J. for Parasitology, 3, 553-560.
- BALDWIN, W. F. HOUSE, H. T. (1952) Factor sinfluencing the specific gravity of insect hemolymph. Can., Ent., 84, 131-139.
- BALLARINO, J., MA, M., DING, T. LEMISON, C. (1991) Development of male-incubated ovaries in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Biochem. and Physiol., 16-18, 220-234.
- BECKAGE, N. E. (1982) Effects of parasitism by *Apanteles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm *Manduca sexta* . Gen. Comp. Endocr., 47, 308-322.
- BECKAGE, N. E. (1985) Endocrine interactions between endoparasitic insects and their hosts. Ann. Rew. Entomol., 30, 371-413.
- BECKAGE, N. E. (1991) Host-parasite hormonal relationships: A common theme? Exp. Parasitology, 72, 332-338.
- BECKAGE, N. E. KANOST, M. R. (1993) Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* . Insect. Biochem. Molec. Biol., 23:5, 643-653.
- BECKAGE, N. E., RIDDIFORD, L.M. (1982) Effects of parasitism by *Apanteles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm *Manduca sexta* . Gen. Com. Endocr., 47, 308-322.
- BECKAGE, N. E., TEMPLETON, T. J. (1986) Physiological effects of parasitism by *Apanteles congregatus* in terminal-stage tobacco hornworm larvae. J. Insect. Physiol., 32:4, 299-314.
- BECKAGE, N. E., NESBIT, D. J., NIELSEN, B. D., SPENCE, K. D., BARMAN, M. A .E. (1989) Alteration of hemolymph polypeptides in

- Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*: a two-dimensional electrophoretic analysis and comparison with major bacteria-induced proteins. *Archs. Insect. Biochem. Physiol.*, 10, 29-45.
- BECKAGE, N. E., TEMPLETON, T. J., NIELSEN, B. D., COOK, D. J., STOLTZ, D. B. (1987) Parasitism-induced hemolymph polypeptides in *Manduca sexta* (L.) larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata* (say). *Insect. Biochem.*, 17: 3, 439-455.
- BECKAGE, N. E., METCALF, J. S., NESBIT, D. J., SCHLEIFER, K.W., ZETLAN, S. R., DE BURON, I. (1990) Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasitized *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnavirus. *Insect. Biochem.*, 20:3, 285-294.
- BEERNTSEN, B. T., CHRISTENSEN, B. M. (1990) *Dirofilaria immitis*: Effect on hemolymph polypeptide synthesis in *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. *Exp. Parasitology*, 71, 406-414.
- BREWER, F. D., GLICK, B., VINSON, S. B. (1973) A comparative study of selected tissues from the parasitoid *Cardiochiles nigriceps*, its susceptible host *Heliothis virescens* and a resistant host *Heliothis zea* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B, 567-574.
- BRONSKILL, J. K. (1961) A cage to simplify the rearing of the greater wax moth *Galleria mellonellae* (Pyralidae). *J. Lep. Soc.*, 102-104.
- COOK, D. I., STOLTZ, D. B., VINSON, S. B. (1984) Induction of a new haemolymph glycoprotein in larvae of permissive hosts parasitized by *Campoletis sonorensis*. *Insect. Biochem.*, 14:1, 45-50.
- CORBET, S. A. (1968) The influence of *Ephestia kuehniella* on the development of its parasite *Nomeritis canescens*. *J. Exp. Biol.*, 48, 291-304.

- DAVIES, D. H., VINSON S. B. (1986) Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation in vitro by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. J. Insect. Physiol., 32:12, 1003-1010.
- D'CRUZ, O. J. M., DAY. N. K. (1985) Structural and functional similarities between the major hemolymph protein of fall armyworm and Cat C₄ binding protein of the complement sistem. Develop. And Comp. Immunology, 9, 541-550.
- DEAN, R. L., LOCKE, M., COLLINS, J. V. (1985) Structure of the fat body, in Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, (Ed. By Kerkut, G.A. ve Gilbert, L. I.). 3, 155-210, Pregamon Press.
- DUHAMEL, R. C., KUNKEL, J. G. (1983) Cockroach larval-specific protein, a tyrosine-rich serum protein. J. of Biol. Chem., 258: 23, 14461-14465.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ T., GÜRBÜZ F., (1983). İstatistik Metodları. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay., Ankara.
- ERGEZEN, S. S., ABDÜL-AZİZ, S. (1991). Comparison of hemolymph and fat body electrophoretic protein patterns during development of *Galleria mellonella* (Holometabola) and *Oncopeltus fasciatus* (Hemimetabola). Doğa-Tr. J. of Biology, 15: 2, 94-107.
- ESEN, A. (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. Anal. Biochem., 89, 264-273.
- FAYE, I., PYE, A., RASMUSON, T., BOMAN, H. G., BOMAN, I. A. (1975) Insect immunity II. simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. Infection and Immunity, 12: 6, 1426-1438.
- FERKOVICH, S. M., GREANY, P. D., DILLARD, C. (1983) Changes in haemolymph proteins of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), associated with parasitism by the braconid parasitoid *Cotesia marginiventris* (Cresson). J. insect Physiol., 29:12, 933-942.

- FLORKIN, M., JEUNIAUX, C. (1974) Hemolymph: Composition in The Physiology of Insecta (Ed. by Rockstein, M.). 5, 255-308, Academic Press London.
- FORD, S. E. (1986) Comparison of hemolymph proteins from resistant and susceptible Oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). J. of Invertebrate Pathology, 47, 283-294.
- FUJIWARA, Y., YAMASHITA, O. (1990) Purification, characterization and developmental changes in the titer of a new larval serum protein of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem., 20: 7, 751-759.
- GOLD, S. M. W., DAVEY, K. G. (1989) The effect of juvenile hormone on protein synthesis in the transparent accessory gland of male *Rhodnius prolixus*. Insect Biochem., 19:2, 139-143.
- GRZELAK, K., KUMARAN, A. K. (1986) Developmental changes in the larval fat body during metamorphosis in *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol., 32: 5, 445-453.
- GUZO, D., STOLTZ, D. B. (1985) Obligatory multiparasitism in the tussock moth, *Orgyia leucostigma*. Parasitology, 90, 1-10.
- HUGHES, J. A., HURLBERT, R. E., RUPP, R. A., SPENCE, K. D. (1983) Bacteria-induced haemolymph proteins of *Manduca sexta* pupae and larvae. J. Insect. Physiol., 29:8, 625-632.
- HURD, H., ARME, C. (1984) Pathophysiology of *Hymenolepis diminuta* infections in *Tenebrio molitor*: Effect of parasitism on haemolymph proteins. Parasitology, 89, 253-262.
- INAGAKI, S., YAMASHITA, O. (1986) Metabolic shift from lipogenesis to glycogenesis in the last instar larval fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem., 16: 2, 327-331.
- IZUMI, S., KIGUCHI, K., TOMINO, S. (1984) Hormonal regulation of biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. Zool. Sci., 1, 223-228.

- IZUMI, S., FUJIE, J., YAMADA, S., TOMINO, S. (1981) Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. *Biochemica et Biophysica*, 670, 222-229.
- JEFFS, S. A., ARME, C. (1984) *Hymenolepis diminuta*: Protein synthesis in cysticercooids. *Parasitology*, 88, 351-357.
- JEFFERIES, L. S., ROBERTS, P. E. (1990) A new method of detecting hormone binding proteins electroblotted onto glass fiber filter: Juvenile hormone binding proteins from grasshopper hemolymph. *J. Steroid Biochem.* 35:3, 449-455.
- JONES, D. (1986) *Chelonus sp*: Suppression of on host ecdysteroids and developmentally stationary pseudoparasitized prepupae. *Exp. Parasitology*, 61, 10-17.
- JONES, D. (1987) Material from adult female *Chelonus sp*. direct expression of altered developmental programme of host Lepidoptera. *J. Insect Physiol.*, 33:2, 129-134.
- JONES, D. (1989) Protein expression during parasite redirection of host (*Trichoplusia ni*) *Biochemistry. Insect Biochem.*, 19:5, 445-455.
- JONES, D., JONES, G., RUDNICKA, M., CLICK, A., RECK-MALLECZEWEN, U., IWAYA, M. (1986) Pseudoparasitism of host *Trichoplusia ni* by *Chelonus ssp*. As a new model system for parasite regulation of host physiology. *J. Insect Physiol.*, 32:4, 315-328.
- KAJIURA, Z., YAMASHITA, O. (1989) Stimulated synthesis of the female-specific storage protein in male larvae of the silkworm *Bombyx mori* treated with juvenil hormone analog. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 12, 99-109.
- KANOST, M. R., KAWOOYA, J. K., LAW, J. H., RYAN, R. O., VAN HEUSDEN, M. C., ZIEGLER, R. (1990) Insect haemolymph proteins. *Advances in Insect Physiol.*, 22, 299-396.
- KAWOOYA, J. K., LAW, J. H. (1983) Purification and properties of microvitellogenin of *Manduca sexta* role of juvenile hormone in

- appearance and uptake. *Biochem. and Biophysiol. Research Communications*, 117:2, 643-650.
- KEELEY, L. L. (1985) Physiology and Biochemistry of The Fat Body, In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Ed. By Kerkut, G. A. ve Gilbert, L. I.). 218-348, Pergaman press.
- KOEPPE, J. K., PRESTWICH, G. D., BROWN, J. J., GOODMAN, W. G., KOVALICK, G. E., BRIERS, T., PAK, M. D., GILBERT, L. I. (1984) Photoaffinity labeling of the hemolymph juvenil hormone binding protein of *Manduca sexta*. *Biochemistry*, 23, 6674-6679.
- KUNKEL, J. G., LAWLER, D. M. (1974) Larval-specific serum protein in the order Dictyoptera-I. Immunologic characterization in larval *Blattella germanica* and cross-reaction throughout the order. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47B, 697-710.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680-685.
- LAWRENCE, P. O. (1990) The biochemical and physiological effects of insect hosts on the development and ecology of the insect parasites: An overview. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 13, 217-228.
- LEVENBOOK, L. (1985) Insect storage proteins. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Ed. Kerkut, G. A. ve Gilbert, L. I.). 10, 307-346. Pergamon Press. Oxford.
- LOCKE, M., COLLINS, J. V. (1968) Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *J. of Cell Biology*, 36, 453 - 483
- LUCKHART, S., WEBB, B. A. (1996) Interaction of a wasp ovarian protein and Polydnavirus in host immune suppression. *Develop. and Comp. Immunology*, 20:1, 1-21.
- MARINOTTI, O., DE BIANCHI, A. G. (1983) A larval haemolymph protein in the eggs of *Rhynchosciara americana*. *Insect Biochem*, 13:6, 647-653.

- MARTEL, R. R., LAW, J. H. (1991) Purification and properties of an ommochrome-binding protein from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. of Biol. Chem., 226:32, 21392-21398.
- MILLER, S. G., SILHACEK, D. L. (1982a) Identification and purification of storage proteins in tissue of the greater wax-moth, *Galleria mellonella* (L.). Insect Biochem., 12, 277-291.
- MILLER, S.G., SILHACEK, D. L. (1982b) The synthesis and uptake of haemolymph storage proteins by the fat body of the greater wax-moth, *Galleria mellonella* (L.). Insect Biochem., 12, 292-300.
- MILLER, S. G., SILHACEK, D. L. (1992) Binding of riboflavin to lipophorin and a hexameric protein in the hemolymph of *Heliothis virescens*. Insect Biochem. Molec. Biol., 22: 6, 571-583.
- OKOT-KOTBER, B. M., PRESTWICH, G. D. (1991) Identification of a juvenile hormone termite, *Reticulitermes flavipes*, by photoaffinity labeling. Insect Biochem., 21: 7, 775-784.
- ÖZDAMAR, K. (1985) Biyoistatistik. 8-21 ve 276-314, Bilim ve Teknik Yay., İstanbul.
- RAGSDALE, D., FURGALA, B. (1987) A seriological approach to the defection of *acarapis woodi* parasitism in honey bees using an enzyme-linked immunosorbent assay. Apidologie, 18:1, 1-10.
- RAY, A., MAMMEL, N. A., ORCHEKOWSKI, R. P., KUMARAN, A. K. (1987) Isolation of two cDNA clones coding for larval hemolymph proteins of *Galleria mellonella*. Insect Biochem., 17:4, 603-617.
- RIDDIFORD, L. M., LAW, J. H. (1983) Larval serum proteins of Lepidoptera. in the larval serum proteins of insects (Ed. By Scheller, K.). 75-85, Thieme Stuttgart.
- ROBERTS, O. B., BROCK, H. W. (1981) The major serum proteins of Dipteran larvae. Experientia, 37:2, 103-109.
- ROLLE, R. S., LAWRENCE, P. O. (1994a) Characterization of a 24 kD parasitism-specific -protein from pharate pupae of the Caribbean fruit

- fly, *Anastrepha suspensa*. Arch. Insect Biochem. and Physiol., 25, 227-244.
- ROLLE, R. S., LAWRENCE, P. O. (1994b) Purification of a 24 kD parasitism-specific hemolymph protein from pharate pupae of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. Arch. Insect Biochem. and Physiol., 27, 265-285.
- ROSELL, R., COONS, L. B. (1991) Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis*. J. Insect Biochem., 21:8, 871-885.
- RYAN, R. O., KEIM, P. S., WELLS, M. A., LAW, J. H. (1985) Purification and properties of a predominantly female-specific protein for the hemolymph of the larva of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. of Biological Chem., 260: 2, 782-787.
- RYAN, R. O., COLE, K. D., KAWOOYA, J. K., WELLS, M. A., LAW, J. H. (1988) Identification and characterization of a novel post-larval hemolymph protein from *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 9, 81-90.
- SAKAI, N., MORI, S., IZUMI, S., HAINO-FUKUSHIMA, K. A., OGURA, T., MAEKAWA, H., TOMINO, S. (1988) Structures and expression of mRNAs coding for major plasma proteins of *Bombyx mori*. Biochim. Biophys., 949, 224-232.
- SCHMIDT, S. P., PLATZER, E. G. (1980) Changes in body tissues and hemolymph composition of *Culex pipiens* in response to infection by *Romanomermis culicivorax*. J. of Invertebrate Pathology, 36, 240-254.
- SCHMIDT, O., ANDERSON, K., WILL, A., SCHUCHMANN-FEDDERSEN, I. (1990) Virus-like particle proteins from a Hymenopteran endoparasitoid are related to a protein component of the immune system in the Lepidopteran host. Arch. Insect Biochem. Physiol., 13, 107-110.

- SOLDEVILA, A.I., JONES, D. (1991) Immunoanalysis of unique protein in *Trichoplusia ni* larvae parasitized by the braconid wasp *Clelonus curvimaculatus*. *Insect Biochem.*, 21:8, 845-856.
- STOLTZ, D. B., GUZO, D. (1986) Apparent haemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma distria* larvae. *J. Insect Physiol.*, 32: 4, 377-388.
- STRAND, M. R., PECH, L. L. (1995) Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Ann. Rev. Entomol.*, 40, 31-56.
- STRICTLAND, R. D., FREEMAN, M. L., GURUK, F. T. (1961) Copper binding by proteins in alkaline solution. *Anal. Chem.*, 33, 153-158.
- THOMPSON, S. N. (1982) Effects of parasitization by the insect parasite, *Hyposoter exiguae*, on the growth, development and physiology of its host *Trichoplusia ni*. *Parasitology*, 84, 491-510.
- THOMPSON, S. N. (1990) Physiological alterations during parasitism and their effects on host behaviour. In "Parasitism and Host Behaviour" (Eds. By Barnard, C. J, ve Behnke, J. M.). 64-94, Taylor and Francis, London.
- TIETZ, N. W. (1987) Fundamentals of Clinical Chemistry. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- TİFTİK, A. M. (1996) Klinik Biyokimya. MIMOZA Basım, Yayım ve Dağıtım A. Ş., Konya.
- UENO, K., NATORI, S. (1982) Activation of fat body by 20-hydroxyecdysone for the selective incorporation of a storage protein in *Sarcophaga peregrina* larvae. *Insect Biochem.*, 12, 185-191.
- VENKATESH, K., ABDEL-AAL, Y. A. I., ARMSTRONG, F. B., ROE, R. M. (1990) Characterization of affinity-purified juvenile hormone esterase from the plasma of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. of Biological Chem.*, 265: 35, 21727-21732.
- VINSON, B., IWANTSCH, G. F. (1980) Host regulation by insect parasitoids. *Q. Rev. Biol.*, 55, 143-165.

- WANG, X. Y., COLE, K. D., LAW, J. H. (1989) The nucleotide sequence of a microvitellogenin gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Gen. Comp. Endocr., 80, 259-268.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1972) The Principles of Insect Physiology. 411-413, Published in the USA. By Harsfed press.
- WOMERSLEY, C., PLATZER, E. G. (1982) The effect of parasitism by the mermithid *Romanomermis culicivorax* on the dry weight and hemolymph soluble protein content of three species of mosquitoes. J. of Invertebrate Pathology, 40, 406-412.
- WYATT, G. R. (1980) The fat body as a protein factory, in Insect Biology in The Future (Ed. By Locke, M. ve Smith, D. S.). 201-226, Academic Press.
- WYATT, G. R., PAN, M. L. (1978) Insect plasma proteins. Ann. Rev. Biochem., 47, 779-817.
- ZUPKO, K., SKLAN, D., LENSKY, Y. (1993) Proteins of the honeybee (*Apis mellifera L.*) body surface and exocrine gland secretions. J. Insect Physiol., 39: 1, 41-46.