

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***GALLERIA MELLONELLA* (L.) (LEPIDOPTERA:
PYRALIDAE)' NİN SON LARVAL İNSTAR
PROTEOMUNUN ZAMAN VE SICAKLIĞA
BAĞLI ANALİZİ**

**Hazırlayan
Güler TOPRAK**

**Danışman
Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ
Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ**

Doktora Tezi

**Ocak 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***GALLERIA MELLONELLA* (L.) (LEPIDOPTERA:
PYRALIDAE)' NIN SON LARVAL İNSTAR
PROTEOMUNUN ZAMAN VE SICAKLIĞA BAĞLI
ANALİZİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Güler TOPRAK**

**Danışman
Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ
Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ**

**Ocak 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Güler TOPRAK



“*Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)’ nın Son Larval İstar Proteomunun Zaman ve Sıcaklığa Bağlı Analizi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Güler TOPRAK

Danışman

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

TEŞEKKÜR

Güvenleri, değerli destekleri, rehberlikleri ve sabırları için danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ ve Sayın Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ'a gönülden teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi üyesi hocalarım Sayın Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ebru SAATÇI'ye destekleri ve kıymetli tavsiyeleri için teşekkür ederim.

Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GenKök) müdürü Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a sundukları imkânlar ve değerli destekleri sebebi ile gönülden teşekkür ederim.

Larva yetiştirme sürecine katkılarından dolayı Enfal ÇÖMLEKÇİ'ye, larva temininde yardımından dolayı Arş. Gör. Ebubekir YÜKSEL'e, proteinlerin analizi için Koç Üniversitesi Proteomik Birimine teşekkür ederim.

Doktora boyunca, desteklerini ve dualarını esirgemeyen tüm dostlarıma, özellikle Binnaz ER, Öğr. Gör. Dr. Dilek SÖNMEZER'e yürekten teşekkür ederim.

Sevgili aileme, en çok da varlıkları ile hayatıma değer katan meleklerim; E. Aybike, A. Toprak, P. Göktürk ve T. Kutay'a. Her şey sizinle güzel ve anlamlı.

Son olarak da sahip olduğum her şey için; Yüce Yaratıcı'ya, Türk Milleti'ne ve Türk Devleti'ne şükürlerimi, minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Güler TOPRAK

Ocak 2022, KAYSERİ

**GALLERIA MELLONELLA (L.) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)' NİN
SON LARVAL İNSTAR PROTEOMUNUN ZAMAN VE SICAKLIĞA
BAĞLI ANALİZİ**

Güler TOPRAK

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, Ocak 2022

Danışmanlar: Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

ÖZET

Sıcaklık canlıya ait birçok metabolik süreci etkileyen önemli bir faktördür. Bu yüzden sıcaklığın metabolik ve fizyolojik etkilerinin anlaşılması, böcek biyolojisi açısından önemlidir. Bu çalışmada değişen sürelerde uygulanan farklı sıcaklıkların son dönem *G. mellonella* larva proteomunda neden olduğu değişimlerin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaçla son dönem larvalar, farklı sıcaklıklara (18 °C, 30 °C ve 37 °C) 24 ve 48 saat boyunca maruz bırakıldı. Larva proteinleri hemolenften ve larva dokularından ayrı ayrı izole edildi. TCA-aseton yöntemi ile toplanan proteinler 2D-PAGE ile ayrıldı. Aynı süre uygulanan 3 farklı sıcaklığın jel görüntüleri karşılaştırıldı ve karakteristik spotlar tespit edilip LC-MS/MS ile tanımlandı. Proteinlerin hücre içi konumları, yer aldığı biyolojik süreçler, birbirleri ile etkileşimleri ve metabolik yollara dağılımı çeşitli biyoinformatik araçlarla tespit edildi. Farklı sıcaklıkların 24 ve 48 saat uygulandığı gruplar için sırasıyla 132 ve 77 protein tanımlandı, 45 adet proteinin ise 24 ve 48 saatlik uygulamalar için ortak olduğu bulundu. Tanımlanan toplam 254 proteinden 79 tanesinin jeldeki olası konumu belirlendi. Proteinlerin büyük oranda sitoplazmik ve mitokondrial yerleşim gösterdiği tespit edildi. Tanımlanan *G. mellonella* proteinlerinin çoğu için herhangi bir biyolojik süreç belirlenemedi. Bu yüzden tanımlanan *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* ve *B. mori* proteinleri tespit edilip biyolojik süreçlere dağılımları yeniden incelendi. Yapılan bu değerlendirmelerde 24 saat uygulamalarında fagozom, endoplazmik retikulum ve karbon metabolizmasına ait proteinler tespit edilirken, 48 saat için TCA döngüsü, proteozom ve karbon metabolizması proteinleri belirlendi. Moleküller arası etkileşim ağları (STRING) da bu sonuçları destekledi. Yirmi dört saat sıcaklık uygulamalarına ait 34 proteinin çeşitli stres tiplerine karşı gösterilen hücresel tepki süreçlerinde, 8 proteinin ise ısı stresiyle ilişkili süreçlerde yer aldığı anlaşıldı. Diğer taraftan 48 saatlik uygulamada stresle ilgili

21 proteinden yalnızca 2'sinin doğrudan sıcaklık stresi ilgili olduğu tespit edildi. Ayrıca uygulama süresinin larva proteomunda değişiklikler meydana getirdiği, sıcaklık ve süre değişimlerinden en fazla etkilenen süreçlerin taşıma ve protein kontrol yolları olduğu sonuçlarına ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: *Galleria mellonella*, larva, sıcaklık, zaman, proteom, LC-MS/MS



**TIME-AND TEMPERATURE-DEPENDENT ANALYSIS OF LAST LARVAL
INSTAR PROTEOME OF *GALLERIA MELLONELLA* (L.) (LEPIDOPTERA:
PYRALIDAE)**

Güler TOPRAK

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis, January 2022

Supervisors: Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

ABSTRACT

Temperature is an important factor affecting many metabolic processes of organisms. Therefore, understanding the metabolic and physiological effects of temperature is important for insect biology. This study aimed to determine effects of different times and temperatures on *G. mellonella* larvae proteome. For this purpose, the last instar larvae were exposed to different temperatures (18 °C, 30 °C and 37 °C) for 24 and 48 hours. Larvae were separated into hemolymph and other parts. Proteins were isolated by the TCA-acetone method and separated by 2D-PAGE. For each time, gels of 3 different temperature were compared and characteristic spots were detected and identified by LC-MS/MS. The intracellular location, the biological processes, interactions and distribution to metabolic pathways of the proteins were determined by various bioinformatics tools. For the groups in which different temperatures were applied for 24 and 48 hours, 132 and 77 proteins were identified, respectively, and 45 proteins were found to be common for 24- and 48-hour treatments. After determining the possible location of 79 of the 254 proteins identified in the gel, it was revealed that most of the proteins were in the cytoplasmic and mitochondrial regions. The biological process(s) in which many of the identified proteins are involved could not be detected. Therefore, *D. melanogaster* and *B. mori* counterparts of *G. mellonella* proteins were detected and placed into biological categories. Proteins belonging to phagosome, endoplasmic reticulum and carbon metabolism were detected in 24-hour treatments while proteins in 48-hour treatments took part in TCA cycle, proteosome and carbon metabolism. Also protein interaction networks (STRING) supported the results. Thirty-four proteins identified at the 24-hour treatments were involved in the cellular response to various types of stresses and 8 of which were related to heat stress. On the other hand, only 2 of the 21 stress-related proteins were directly related to heat stress for 48-hour treatments.

In addition, it was concluded that temperature periods changed the larval proteome, and the most affected processes by temperature-time treatments were the transport and protein control pathways.

Keywords: *Galleria mellonella*, larvae, temperature, time, proteome, LC-MS/MS.



İÇİNDEKİLER

GALLERIA MELLONELLA (L.) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)' NİN SON LARVAL İNSTAR PROTEOMUNUN ZAMAN VE SICAKLIĞA BAĞLI ANALİZİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR	xiv
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Sıcaklık ve Böcek Biyolojisine Etkileri.....	3
1.1.1. Sıcaklığın Böcek Gelişimine Etkileri	4
1.1.2. Sıcaklığın Böcek Morfolojisine Etkileri	6
1.1.3. Sıcaklığın Böcek Yaşam Süresine Etkileri	7
1.1.4. Sıcaklık Değişimlerine Bağlı Stres	8
1.1.5. Böceklerde Sıcaklık Değişimlerine Yanıt	8
1.1.5.1. Soğuğa Karşı Fizyolojik Tepkiler	9
1.1.5.2. Sıcığa Karşı Fizyolojik Tepkiler	12
1.2. <i>Galleria mellonella</i> (L. 1758) (Büyük Balmumu Güvesi) Gelişimi ve Sıcaklık ..	14
1.2.1. Model Organizma Olarak <i>G. mellonella</i> Larvası	16
1.2.2. <i>G. mellonella</i> Larvası ile Yapılan -Omik Çalışmalar	17
1.3. Proteomik.....	19
1.3.1. Örnek Hazırlama.....	20
1.3.2. 2D-PAGE.....	21

1.3.3. Proteinlerin Kütle Spektrometresi (MS) ile Tanımlanması	22
1.3.4. Biyoinformatik.....	22

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. <i>G. mellonella</i> Kültürü ve Zamana Bağlı Sıcaklık Uygulamaları	24
2.2. Larvalardan Protein İzolasyonu.....	24
2.3. Protein Miktarlarının Belirlenmesi	25
2.4. İki Boyutlu Protein Ayrımı	25
2.5. Jel Görüntülerinin Karşılaştırılması ve Spot Kesimi	26
2.6. Kesilen Spotların Kütle Analizine Hazırlanması	27
2.7. LC-MS/MS Analizi	27
2.8. MS Verilerinin İşlenmesi.....	28
2.9. Biyoinformatik Analiz	29

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. <i>G. mellonella</i> Kültürü, Larvaların Gelişimi ve Farklı Sürelerde Değişen Sıcaklıkların Uygulanmasına ait Değerlendirmeler	31
3.2. Jel Görüntülerinin Karşılaştırılması ve Spot Kesiminin Değerlendirilmesi	34
3.3. MS Verilerinin İşlenmesine Ait Değerlendirme	35
3.4. Tanımlanan Proteinlerin Ontolojik Değerlendirilmesi ve Hücre İçi Yerleşimi	36
3.5. Proteinler Arası Etkileşimlerin İncelenmesi.....	45
3.5.1. <i>G. mellonella</i> Proteinlerine Dizi Benzerliği Gösteren Proteinlerin Etkileşimi-24 Saat.....	45
3.5.2. <i>G. mellonella</i> Proteinlerine Dizi Benzerliği Gösteren Proteinlerin Etkileşimi-48 Saat.....	51
3.5.3. <i>G. mellonella</i> Proteinlerine Dizi Benzerliği Gösteren Proteinlerin Etkileşimi-24 ve 48 Saat Ortak.....	54
3.5.4. Uygulama Sıcaklığı Belirlenen Proteinlerin Dizi Benzerleri ile Oluşturulan Etkileşim Haritası – 24 Saat	57

3.5.5. Uygulama Sıcaklığı Belirlenen Proteinlerin Dizi Benzerleri ile Oluşturulan Etkileşim Haritası – 48 Saat	58
3.6. Stres ile İlgili Proteinlerin Belirlenmesi	58
3.7. Reactome ile Belirlenen Metabolik Yolaklar.....	63
3.7.1. Proteinlerin Metabolik Yolaklara Dağılımı-24 ve 48 Saat Karşılaştırması.....	63
3.7.2. Aynı Süre Uygulanan Farklı Sıcaklıkların Karşılaştırılması-24 Saat	67
3.7.3. Aynı Süre Uygulanan Farklı Sıcaklıkların Karşılaştırılması-48 Saat	68

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Protein İzolasyon Metodunun Değerlendirilmesi	70
4.2. Spot Seçim/Kesim Stratejisinin Değerlendirilmesi	71
4.3. Tercih Edilen MS Yönteminin Değerlendirilmesi.....	72
4.4. MS Sonuçlarının İşlenmesinde Kullanılan Parametrelerin Değerlendirilmesi	73
4.5. Sıcaklık ve Süre Değişkenlerinin Değerlendirilmesi.....	74
4.6. Reactome'a Göre Sıcaklık Değişimlerinin Etkileri.....	75
4.6.1. Yirmi dört Saat 18 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler	75
4.6.2. Yirmi dört Saat 30 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler	77
4.6.3. Yirmi dört Saat 37 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler	79
4.6.4. Kırk sekiz Saat 18 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler	81
4.6.5. Kırk sekiz Saat 30 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler	82
4.6.6. Kırk sekiz Saat 37 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler	82
4.7. Süre Değişiminin Etkileri	83
KAYNAKÇA	92
EKLER.....	108
EK 3.1. Farklı Sıcaklıkların 24 Saat Uygulandığı Gruplara ait Proteinler.....	108
EK 3.2. Farklı Sıcaklıkların 48 Saat Uygulandığı Gruplara ait Proteinler.....	116
EK 3.3. Farklı Sıcaklıkların 24 ve 48 Saat Uygulandığı Gruplara ait Ortak Proteinler	121
EK 3.4. Tanımlanan <i>G. mellonella</i> (değişen sıcaklık-24 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinlerinin yolaklara göre dağılımı.	124

EK 3.5. Tanımlanan <i>G. mellonella</i> (değişen sıcaklık-24 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinlerinin yolaklara göre dağılımı.....	125
EK 3.6. Tanımlanan <i>G. mellonella</i> (değişen sıcaklık-48 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinlerinin yolaklara göre dağılımı.	126
EK 3.7. Tanımlanan <i>G. mellonella</i> (değişen sıcaklık-48 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinlerinin yolaklara göre dağılımı.....	127
EK 3.8. Tanımlanan <i>G. mellonella</i> (değişen sıcaklık-24 ve 48 saat ortak) proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinlerinin yolaklara göre dağılımı.	128
EK 3.9. Tanımlanan <i>G. mellonella</i> (değişen sıcaklık-24 ve 48 saat ortak) proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinlerinin yolaklara göre dağılımı.	129
EK 3.10. Yirmi dört saat uygulamasına ait tanımlanan proteinlerin Reactome ile değerlendirilmesi.	130
EK 3.11. Kırk sekiz saat uygulamasına ait tanımlanan proteinlerin Reactome ile değerlendirilmesi.	136
EK 4.1. Farklı Sıcaklıkların 24 Saat Uygulandığı Grup Hemolenf Proteinlerine ait Kromatogram Örneği.	144
EK 4.2. Farklı Sıcaklıkların 24 Saat Uygulandığı Grup Vücut Doku Proteinlerine ait Kromatogram Örneği.	145
ÖZGEÇMİŞ.....	108

KISALTMALAR

°C	: Santrigrat derece
2D	: İki boyutlu
ACN	: Asetonitril
CHAPS	: 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate
DTT	: Dithiothreitol
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
FDR	: Yanlış Bulgu Oranı
HCl	: Hidroklorik asit
HSP	: Isı şok proteinleri
IAA	: Indole-3-Acetic Acid
IEF	: İzoelektrik Fokuslama
kDa	: Kilodalton
Ma (MW)	: Moleküler ağırlık
MALDI-TOF MS	: Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu- uçuş zamanı kütle spektrometresi
mg	: Miligram
mL	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
NL	: Doğrusal olmayan
n-LC MS/MS	: nano-Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi/ Kütle spektrometresi
PAGE	: Poliakrilamit jel elektroforezi
pI	: İzoelektrik nokta
PMF	: Peptit kütle parmak izi
Protein ID	: Protein Kimliklendirme
rcf	: Bağlı merkezkaç alanı
RNS	: Reaktif Azot Türleri

ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
TCA	: TriChloroAcetic acid
V/V	: Hacim/Hacim
W/V	: Ağırlık/Hacim



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Değişen sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruba ait stres ile ilişkili proteinler.....	60
Tablo 3.2.	Değişen sıcaklıkların 48 saat uygulandığı gruba ait stres ile ilişkili proteinler.....	62



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	<i>G. mellonella</i> A) Yumurta ve 1. larval instar B) Larva, pupa ve kokon görüntüleri.....	15
Şekil 2.1.	Tanımlanan proteinlerin sanal jelde M_w ve pI değerlerine göre yerleştirilmesi.....	29
Şekil 2.2.	Farklı sıcaklık değerlerine özgü proteinlerin jeldeki konumları ve renk kodları (a, b ve c); d) jellerden kesilen tüm spotlarla oluşturulan ikinci sanal jel	29
Şekil 3.1.	Kültürün 10. gününde <i>G. mellonella</i> larvalarının a) çıplak gözle görülen, b) steromikroskop görüntüleri	31
Şekil 3.2.	<i>G. mellonella</i> son instar larva.	32
Şekil 3.3.	Değişen sıcaklıkların 24 ve 48 saat uygulandığı larvaların vücut ağırlıkları.....	32
Şekil 3.4.	BSA ile hazırlanan ve örneklerin protein konsantrasyonlarını belirlemekte kullanılan grafik.	33
Şekil 3.5.	<i>G. mellonella</i> 48 saat a) 18 °C, b) 30 °C ve c) 37 °C vücut örneklerine ait jeller. Oklar ortak, çerçeveler farklı proteinler, d) Kesilen tüm spotların kullanılması ile oluşturulan ikinci sanal jel, e) JvirGel ile oluşturulan ilk sanal jel.	35
Şekil 3.6.	% 12,5 akrilamit jelde yürütülen a) standart protein marker ve <i>G. mellonella</i> 'ya ait b) 24 saat 37 °C Hemolenf, c) 24 saat 37 °C Vücut dokuları, d) 48 saat 18 °C Vücut dokuları jellerinden kesilen proteinler.....	36
Şekil 3.7.	Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruplara ait proteinlerin ontolojik kategorilere dağılımı.....	37
Şekil 3.8.	Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruplara ait proteinlerin hücre içi lokasyonlara dağılımı.....	38
Şekil 3.9.	Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı gruplara ait proteinlerin ontolojik kategorilere dağılımı.....	39

Şekil 3.10.	Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı gruplara proteinlerin hücre içi lokasyonlara dağılımı.....	39
Şekil 3.11.	Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları ortak proteinlerin ontolojik kategorilere dağılımı.	40
Şekil 3.12.	Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları ortak proteinlerin hücre içi lokasyonlara dağılımı.....	40
Şekil 3.13.	Farklı sıcaklıklar-24 saat uygulama grubuna ait <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinlerinin yolak dağılımı.	41
Şekil 3.14.	Farklı sıcaklıklar-24 saat uygulama grubuna ait <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinlerinin yolak dağılımı.	42
Şekil 3.15.	Farklı sıcaklıklar-48 saat uygulama grubuna ait <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinlerinin yolak dağılımı.	43
Şekil 3.16.	Farklı sıcaklıklar-48 saat uygulama grubuna ait <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinlerinin yolaklara dağılımı.	43
Şekil 3.17.	Yirmi dört ve 48 saat uygulama grubuna ait <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinlerinin yolak dağılımı.	44
Şekil 3.18.	Yirmi dört ve 48 saat uygulama grubuna ait <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinlerinin yolak dağılımı.	45
Şekil 3.19.	Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı grup <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinleri etkileşim ağı.....	46
Şekil 3.20.	Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı grup <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinleri etkileşim ağı.....	51

Şekil 3.21. Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı grup <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>D. melanogaster</i> proteinleri etkileşim ağı.....	53
Şekil 3.22. Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı grup <i>G. mellonella</i> proteinlerine dizi benzerliği gösteren <i>B. mori</i> proteinleri etkileşim ağı.....	54
Şekil 3.23. Farklı sıcaklıkların değişen sürelerde uygulandığı grupların ortak proteinlerine <i>D. melanogaster</i> dizi benzerleri ile oluşturulan etkileşim ağı.....	55
Şekil 3.24. Farklı sıcaklıkların değişen sürelerde uygulandığı grupların ortak proteinlerin <i>B. mori</i> dizi benzerleri ile oluşturulan etkileşim ağı.	56
Şekil 3.25. Yirmi dört saat uygulamalarında tanımlanan proteinlerin insandaki benzerlerinin metabolik yollara yerleşimi.....	64
Şekil 3.26. Kırk sekiz saat uygulamalarında tanımlanan proteinlerin insandaki benzerlerinin metabolik yollara yerleşimi.....	65
Şekil 3.27. Yirmi dört saat süre 18 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yollara dağılımı.	67
Şekil 3.28. Yirmi dört saat süre 30 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yollara dağılımı.	67
Şekil 3.29. Yirmi dört saat süre 37 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yollara dağılımı.	68
Şekil 3.30. Kırk sekiz saat süre 18 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yollara dağılımı.	68
Şekil 3.31. Kırk sekiz saat süre 30 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yollara dağılımı.	69
Şekil 3.32. Kırk sekiz saat süre 37 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yollara dağılımı.	69

GİRİŞ

Sıcaklık canlı organizmaların metabolizma, gelişme, üreme, populasyon düzeyi, tür çeşitliliği ve çeşitli ekosistem süreçlerini etkileyen önemli bir etkidir. Bu yüzden organizmaların sıcaklığa karşı fizyolojik tepkileri birçok araştırmaya konu olmuştur. Böceklerin de dâhil olduğu poikloterm hayvanlar için günlük ve hatta saatlik sıcaklık değişimleri bile yukarda bahsedilen değişkenleri önemli ölçüde etkiler [1, 2]. *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) gibi holometabol başkalaşım geçiren böcekler de sıcaklığa bağlı olarak fizyolojik ve biyokimyasal değişimler gösterir.

Sıcaklığın böcek büyümesi ve gelişimi üzerindeki etkisi, böcek fizyolojisinin en iyi araştırılan konularındandır. *G. mellonella* larvalarına, sıcaklığın etkileri kapsamlı olarak çalışılmıştır. Özellikle *G. mellonella* larvalarının 30 °C sabit sıcaklıkta gelişebildiği, 18 °C gibi normalden daha düşük sıcaklıklara maruz kaldığında ise, gelişimsel duraklama yaşadığı bilinmektedir. Kısa süre 0 °C'ye maruz bırakılan larvaların daha sonra aşırı deri değiştirdiği bilinmektedir. Bu durum juvenil hormon konsantrasyonundaki artışa bağlanmıştır [3].

Türe özgü fizyolojik değer aralığında kaldığı sürece sıcaklık; metabolizma, büyüme ve gelişme hızı üzerinde genellikle olumlu etkilere sahiptir. Ancak sıcaklık bu değerlerin dışına çıktığında koruyucu biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalar devreye girer. Oldukça karışık olan bu fizyolojik tepkiler muhtemelen birçok metabolik yolak ve proteinin sürece dâhil olmasından kaynaklanır [4]. Böceklerdeki bu fizyolojik mekanizmaların benzerleri memelilerde de bulunduğundan böceklerle insanlar arasında karşılaştırmalı çalışmalar yapmak mümkündür. Özellikle nöroendokrinoloji, immünoloji, farmakoloji, toksikoloji ve insan enfeksiyonlarına dair modelleme çalışmalarında böceklerden yararlanılmaktadır [5]. Kazanılmış bağışıklık yanıtlarının olmaması, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin omurgalılara büyük ölçüde benzemesi

G. mellonella'nın da model organizma olarak kullanılmasını sağlar. Laboratuvar ortamında kolaylıkla yetiştirilebilmesi, çalışılmasında etik kısıtlamaların olmaması ve kısa yaşam döngüleri yüzünden büyük ölçekli çalışmalarda bu canlıya ait larvalar tercih edilmektedir [6]. Ayrıca *G. mellonella* larvalarının plastik ayırma kabiliyeti canlıya ilgiyi artırmaktadır [7].

Canlılar tüm iç ve dış uyaranlara yanıt olarak fizyolojik ve metabolik ayarlamalar yaparlar. Bu sayede normal biyolojik fonksiyonlarına devam eder, gelişir, farklılaşır ve stres tepkileri geliştirirler. Proteinler değişimlere karşı geliştirilen dinamik süreçlerde önemli rol oynarlar ve proteomik ile proteinlerin detaylı karakterizasyonu ve analizi yapılmaktadır. Proteomik, canlının hücre ve dokularında ifade edilen tüm proteinleri, bunların biyolojik aktivitelerini, posttranslasyonel modifikasyonlarını, protein-protein etkileşimlerini ve uyarana karşı proteomun nasıl değiştiğini belirlemeye çalışır. [8].

Yapılan literatür taramasında sıcaklık ve sürenin *G. mellonella* larva proteomuna etkilerinin araştırıldığı kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple tez çalışmasında *G. mellonella*'nın değişik sıcaklık değerlerine farklı sürelerde maruz bırakılan son dönem larva proteomunda meydana gelen değişimlerin tespiti amaçlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin metabolik yollardaki görevleri ve birbirleri ile etkileşimleri biyoinformatik araçlarla araştırılmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Sıcaklık ve Böcek Biyolojisine Etkileri

Sıcaklık, canlıları birçok yönden etkileyen önemli abiyotik etmenlerdendir. Hücrede gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar sıcaklığa bağlı olarak yürür. Sıcaklık enzimlerin etkinliğini değiştirerek hücresel aktiviteyi etkiler. Bazı dokuların fizyolojisini değiştirir, türlerin coğrafi dağılımını sınırlandırır. Dolayısıyla sıcaklık etmeninin incelenmesi böcek biyolojisi ve ekolojisi açısından oldukça önemlidir [9].

Bir organizmanın canlılığının devam ettiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi böcek davranışı, ekolojisi, fizyolojisi ve evrimsel biyoloji açısından oldukça önemlidir. Bahsi geçen sıcaklık ile ilgili çalışmalar, dinamik veya statik yöntemler kullanılarak yapılır. Dinamik yöntemde sıcaklık sabit bir oranda değiştirilir ve etkileri değerlendirilir. Buna karşılık, statik yöntemde sıcaklık sabit tutulur ve uygulama süresi değişir [10].

Optimum değerlerin altında ve üstünde yer alan sıcaklık değerleri böceklerde strese neden olabilir. Sıcaklık stresi sebebi ile meydana gelen hasar onarılabildiği sürece, böcek yaşamına olumlu katkılar sağlar. Stres uzun süreli olduğunda veya kısa süreli sık periyotlarda tekrarlandığında ise hasar birikimi sebebi ile olumsuz etki yaratır. Ancak ektotermik hayvanların sıcaklık ile ilişkileri her zaman doğrusal değildir. Optimum değerlerin altında ve üstünde yer alan sıcaklık değişimleri farklı etkilere sahiptir. Örneğin sıcaklık değişiminin etkisi ile proteinler denatüre olabilir veya düşük sıcaklıklarda suyun donması ile hücre içi dengeler aniden değişebilir.

Sıcaklıkta meydana gelen dalgalanmalar bir zaman aralığını (mevsimsel) ve sıcaklık geçişlerini (günlük değişimler) kapsar. Böcekler meydana gelen sıcaklık değişimlerine süreye bağlı olarak tepki verir. Bu tepkiler dakikalar içinde gerçekleşecek sertleşmeden,

jeolojik ölçekte gerçekleşecek uyum tepkilerine kadar değişim gösterir. Deneysel çalışmalarda sıcaklık değişimleri, iki sıcaklığın basit değişimi şeklinde uygulanabildiği gibi günlük sıcaklık modellerinin daha karmaşık simülasyonlarını da içerebilir. Sıcaklık değişimleri denemelerine dâhil edilen sıcaklıklar, çalışmanın amacına ve böceğin toleransına göre belirlenmelidir. Amaç, gece-gündüz sıcaklık değişimlerinin etkilerini anlamak ise mevcut sıcaklık değişimleri buna göre ayarlanmalıdır. Sıcaklık değişimlerinin fizyolojik etkileri tespit edilmek isteniyorsa sıcaklık değerleri bu amaca göre belirlenmelidir [11].

1.1.1. Sıcaklığın Böcek Gelişimine Etkileri

Alt-üst sıcaklık sınırını aşacak şekilde değişen sıcaklıklarda böcek gelişimi genellikle gecikir. Bu gecikmeler muhtemelen soğğun veya sıcağın doğrudan zararlı etkilerinden ve bu etkilerin onarılması için yürütülen fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerden kaynaklanır. Buna karşılık alt-üst sıcaklık değerleri arasında kalan sıcaklık dalgalanmaları, böcek gelişiminde hızlanma veya yavaş gelişim veya herhangi bir değişimin yaşanmaması şeklinde olabilir. Yanıtlardaki bu varyasyon uygulanan sıcaklıkların gelişimsel eşiklere olan farklı etkilerinden kaynaklanır [11]. Büyük balmumu güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella*'nın doğal ortamında sıcaklıklar yazın 30 °C'lerde kışın ise 18 °C'lerde seyrederek [12]. *G. mellonella* gelişimi deneysel koşullarda ortam sıcaklığına ve nemine bağlıdır ve optimum gelişim için %65±5 bağıl neme ve 29–33 °C sıcaklığa ihtiyaç duyar [13]. *G. mellonella* larvalarının yumurtadan çıkışı ideal sıcaklıklar olan 24-27 °C arasında 5-8 gün sürer [14]. Yumurtalar 29-35 °C arasında hızlı gelişim gösterirken, 18 °C gibi nispeten düşük sıcaklıklarda gelişim yaklaşık 30 gün sürer. On sekiz derecenin altında *G. mellonella* gelişimi güçlü şekilde inhibe olur ve bu sıcaklık değerinde yumurtadan larva çıkışı olmaz [12]. Uç sıcaklık değerlerinde yumurtalar, örneğin 0 °C'nin altında (4,5 saat) veya 46 °C'nin üstünde (70 dakika) bekletildiğinde yaşayamaz [15]. Benzer şekilde *G. mellonella* larvalarının gelişimi sıcaklık ve besin durumundan etkilenir [13-15]. Düşük (0 °C) veya sub-optimal sıcaklıklar (18 °C) larva gelişimini farklı şekillerde etkilerken, sub-optimal sıcaklık diapozal aresti tetikleyebilir [16].

Omurgasız fizyolojisi, biyokimyası ve moleküler biyolojisi açısından önemli model organizmalardan *Manduca sexta* yumurtası ve larvası, bir günlük döngü boyunca

düzenli olarak 20–25 °C veya daha fazla sıcaklık dalgalanmaları yaşar ve larvalar yazın 40 °C'nin üstünde sıcaklıklarla karşılaşır. Larva gelişimi sırasında sıcaklık dalgalanmalarının sayısı ve zamanlamasının *M. sexta*'nin hayatta kalmasına, büyümesine ve gelişmesine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 0-3 °C arasında günlük sıcaklık dalgalanmalarına maruz bırakılan larvalar incelenmiştir. Elde edilen bulgular tekrarlanan sıcaklık dalgalanmalarının larva ve sonraki yaşam evreleri üzerindeki karmaşık etkilerini göstermiştir. Larva gelişiminin erken ve orta aşamalarında ısı dalgalanmalarına maruz kalan son dönem larvaların gelişme sürelerinde uzama ve daha az kütle kazanımı görülmüştür. Larva gelişiminin 3. ve 4. instarında meydana gelen dalgalanmaların ise ortalama yaşam süresini kısalttığı ve pupa oluşturma başarısını azalttığı tespit edilmiştir [17]. Çevre koşullarındaki değişiklikler serbest yaşam aşamalarını, konak-parazit etkileşimlerini ve ekosistem işleyişini etkileyebilir. Parazitik filum Nematomorpha'nın bir üyesi olan ait *Chordodes nobilii*'nin larvalarının enfektivitesi üzerinde sıcaklık, pH ve bunların birlikte etkisinin araştırıldığı bir çalışmada larvalar, sıcaklık (18, 23 ve 28 °C), pH (7, 8 ve 9) ve zaman periyotlarının (24 ve 48 saat) faktöriyel kombinasyonları ile muamele edilmiştir. Sonuçlar, tüm değişkenler arasında oldukça önemli bir etkileşim olduğunu göstermiştir [18]. *Spodoptera littoralis* larvası ile yürütülen bir çalışmada insektisit ve sıcaklık etkileşiminin sonraki nesillere etkileri araştırılmıştır. Çalışmada dört sıcaklıkta (23, 25, 27 ve 29 °C) yetiştirilen larvalara üç farklı konsantrasyonda insektisit uygulanmıştır. Sadece 2 °C'lık sıcaklık değişimlerinin larvaların hayatta kalması, gelişme süresi, pupa vücut kütlesi gibi normlar üzerinde geniş etkileri olduğu tespit edilmiştir [19]. Sivrisineklerin yaşamları özellikle sıcaklığa son derece duyarlıdır ve sıcaklık rekabet eden sivrisinek türleri arasında belirleyici olabilir. Yaşam alanları çakışan iki istilacı sivrisinek türü *Aedes aegypti* ve *Anopheles stephensi* arasında sıcaklığa bağlı rekabetin araştırıldığı bir çalışmada beş sıcaklıkta (16-32 °C) farklı tür içi ve türler arası yoğunluklarda yetiştirilen sivrisinek kohortları izlenmiş ve büyüme oranları türün sıcaklığa bağlı rekabet kabiliyetini belirlemekte kullanılmıştır. Elde edilen veriler tüm sıcaklıklarda asimetric rekabet gücüne sahip *Ae. aegypti*'in baskın istilacı tür olduğunu göstermiştir. *Ae. aegypti* larvaları tüm sıcaklıklarda hayatta kalmayı başararak ve daha kısa sürede gelişim göstererek bu avantajı yakalamıştır. Bu durum sıcaklığın doğrudan ve dolaylı olarak antropolojik etkilerine işaret etmektedir [20]. Hem doğada hem de laboratuarda sıcaklık uygulamalara net yanıt verebilen *Drosophila subobscura* ile

yapılan bir çalışmada kontrol koşullarının ~ 8 °C üzerinde bir gelişim sıcaklığı uygulandığında, üreme performansı üzerinde geri döndürülemez hasarlar meydana gelmiştir. Böceğin gelişim aşamasına bağlı olarak ısı dalgalanmalarının kritik sonuçları olabileceği belirtilmiştir. Gelişimin erken aşamalarında karşılaşılan yüksek sıcaklıkların popülasyon açısından zararlı sonuçları olduğu belirtilmiştir [21].

1.1.2. Sıcaklığın Böcek Morfolojisine Etkileri

Erişkinlerin vücut boyutu, şekli ve simetrisi, gelişim sırasında yaşanan streslerden etkilenir. Böceğe zarar verecek nitelikteki sıcaklık dalgalanmaları fenotipik varyasyonu ve gelişimsel istikrarsızlığı artırır. Sıcaklık-boyut kuralı gereği daha yüksek sıcaklıklarda gelişen böcekler küçük morfolojiye sahiptir. Küçülen vücut boyutları, büyük olasılıkla, enerji tüketimi-yapısal kullanım dengesinde (daha yüksek sıcaklıklarda enerjinin büyük bir kısmı metabolizmaya yönlendirilir) etkilidir. Ayrıca yüksek sıcaklıklar erken olgunlaşmayı teşvik eder. Bu etki muhtemelen sıcaklığın büyüme hızından ziyade farklılaşma hızını etkilemesinden kaynaklanır. Ancak sıcaklık dalgalanmalarının hücre farklılaşmasına etkisine ilişkin bilgiler sınırlıdır [11].

Sıcaklık artışları *Anopheles* cinsi sivrisineklerin ömrünü, vücut boyutunu, gonotropik döngü uzunluğunu ve verimliliğini azaltmaktadır. Normalin üstünde seyreden sıcaklıkların, larva boyutlarını küçülttüğü, yumurtadan çıkan birey sayısını azalttığı ve pupa evresini kısalttığı gösterilmiştir. *Anopheles stephensi*'nin hayatta kalma oranı ve gelişmesi sıcaklık artışına bağlı olarak azalmıştır [22]. Renk polimorfizmi gösteren *Acyrtosiphon pisum* ile yapılan bir çalışmada düşük sıcaklıklarda (1, 4, 8 ve 14 °C) değişen sürelerde (3, 6, 12 ve 24 saat) büyütülen bezelye bitinin pigment genlerinin etkilendiği tespit edilmiştir. Renk polimorfizmi ve düşük sıcaklıklar arasındaki etkileşimin karotenoid metabolizmasına ait genlerin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir [23]. *Gryllus firmus* kanat dimorfizmi gösteren ilginç bir böcek türüdür. Kısa kanatlı iken uçamayan *G. firmus*, uzun kanatlara sahip olduğunda uçabilmektedir. *Gryllus*'ta gözlenen kanat dimorfizmine sıcaklık ve kuraklık stresi etkilerinin araştırıldığı çalışmada, biyolojik özellikler (cinsiyet, vücut kütlesi, kanat, tehdit algısı) ve çevresel değişkenler (sıcaklık, kuraklık) arasında oldukça dinamik etkileşimler olduğu gösterilmiştir [24]. Karıncalarda vücut şeklinin ve boyutunun iklimle değişip değişmediği ve bu ilişkinin kaslara özgü olup olmadığının incelendiği bir çalışmada

2.206 karıncadan 26.472 coğrafi referanslı morfometrik ölçüm alınmış; sıcaklığın en etkili varyasyon kaynağı olduğu tespit edilmiştir. Karıncaların soğuk ortamlarda daha küçük olduğu, büyüklük ve sıcaklık arasındaki ilişkinin üreme kastlarında (yani kraliçeler ve erkekler) daha etkili olduğu gözlenmiştir. Karınca morfolojilerinin yaşam öyküleri ile yakından ilgili olduğu belirtilmiştir [25]. Sıcaklıktaki geçici ani düşüşlerin kırmızı palmye biti *Rhynchophorus ferrugineus*'un morfolojik özellikleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada kalınlık ve yoğunluk açısından kütikül özelliklerinde bir farklılık gözlenmezken, yağ cisimciği içeriğinin azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte hem iç hem de dış morfolojide belirli gelişimsel gecikme gözlemlendiği belirtilmektedir [26].

1.1.3. Sıcaklığın Böcek Yaşam Süresine Etkileri

Sıcaklık değişimlerinin yaşam süresine olumlu, olumsuz veya nötr etkilerinden bahsetmek mümkündür. Sıcaklığın arttığı veya azaldığı durumda bir hasar meydana gelirse; hasarın onarılması veya somatik dengenin devam ettirilmesi arasında yapılacak tercih yaşam süresini farklı derecelerde etkiler. Dönüşümlü olarak sıcak ve soğuğa maruz bırakılan böceklerde sıcak periyotta ROS artışı ve yaşlanma meydana gelir. Sıcaklık değişimi ROS meydana getirmiyorsa yaşam süresine etki etmeyeceği tahmin edilir.

Sıcaklık dalgalanmaları ile birlikte metabolik hız da dalgalanır. Bu durum fizyolojik ve kronolojik yaşın birbirinden farklı olmasına neden olur. Yani gelişimin erken evrelerinde bile olsa artan metabolik hız fizyolojik yaşı artırır ve yaşam süresi kısalır. Bu durum sıcaklık dalgalanmalarının yaşam süreleri üzerinde çelişkili görünen etkilerini açıklamakta önemli bir değerlendirmedir [11].

Mısır ve şeker kamışı ana zararlısı olarak kabul edilen *Sesamia cretica*'nın iki farklı popülasyonuna ait üreme ve yaşam parametreleri değişen 10 farklı sıcaklık açısından araştırılmıştır. 12 °C'de yumurtadan çıkış gözlenmezken, yaşam süreleri ve üreme kapasitesi sıcaklığa bağlı olarak değişmiştir [27]. *Drosophila melanogaster* larvalarına uygulanan soğuk stresinin erginlerin ölüm/hayatta kalma ve uyum parametreleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada bir dizi ölümcül olmayan etki meydana gelmiştir. Bu etkiler arasında pupa evresine geçişte gecikme, ergin ömür uzunluğunda kısalma ve dişilerde görülen verimlilikte azalma sıralanmıştır [28]. Kahve zararlısı *Hypothenemus*

hampei ile yapılan araştırmada, *H. hampei*'nin gelişme süresinin sıcaklıktan etkilendiği, 30 °C eşik sıcaklığına kadar artan sıcaklıklarda yaşam döngüsünü daha hızlı tamamladığı ve bu sıcaklığın üzerinde ise yavaşladığı gösterilmiştir [29]. Yüksek ve düşük bağıl nem de farklı sıcaklıkların kısa süreli uygulandığı yetişkin *Drosophila simulans*'larda sıcaklık ve kuraklık direnci incelenmiş ve kombine uygulanana stresin uyumu olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Strese maruz kalan bireylerin daha kısa ömre sahip olduğu tespit edilmiştir [30]. Yeni yaşam alanlarına yayılım gösterdiği tespit edilen olan *Chilo partellus* üzerine sıcaklık, bağıl nem (RH) ve kombine etkileri incelenmiş ve bu parametrelerin zararlının gelişim süresini, ergin ömür uzunluğunu, potansiyel verimliliğini ve reel verimliliğini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir [31].

1.1.4. Sıcaklık Değişimlerine Bağlı Stres

Böcekler yumurtadan yetişkine gelişim sırasında çoğu kez sıcaklık dalgalanmalarına maruz kalır. Değişen sıcaklıklara verilen yanıtta tür ve stres etkeninin özellikleri önemlidir. Böceklerde sıcaklık değişimlerine verilen cevap, dalgalanmaların böceğin optimum sınırlarını aşıp aşmaması ile ilgilidir. Sıcaklık ve süreye bağlı olarak sıcaklık değişimleri karşısında böceklerin hayatta kalması ve meydana gelen hasarı onarması mümkün olabilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda meydana gelen ısı hasarları ise soğuk kaynaklı hasarlar kadar kolay tamir edilememektedir [11].

1.1.5. Böceklerde Sıcaklık Değişimlerine Yanıt

Değişen iklim koşullarında fizyolojik işlevleri yerine getirmek böcekler için oldukça hayatidir. Habitatlarında meydana gelen sıcaklık değişimlerine uzun süre maruz kalan çoğu böcek fizyolojik açıdan zorlanır [32]. Bu zorlayıcı sıcaklık değerleri strese neden olabilir. Strese neden olan sıcaklıklarda ısı dengesini basit tepkilerle sağlamak imkânsızdır. Sıcaklığa gösterilen tepkide metabolik aktivite sonucu ortaya çıkan ısı, vücut örtüsünün özellikleri, çevrenin fiziksel özellikleri ve vücut boyutu önemli etkenlerdir [33]. Ayrıca organizmanın fizyolojik yaşına bağlı olarak sıcaklık değişimine gösterilen tepki önemli ölçüde farklar gösterir [34]. Böceklerde sıcaklığın etkileri ile ilgili çalışmalar genellikle ortalama sıcaklığa veya tolere edilebilir aralıktaki dalgalanmalara verilen tepkiler ile ilgilidir [35].

1.1.5.1. Soğuğa Karşı Fizyolojik Tepkiler

Yeryüzündeki birçok habitat zamana bağlı olarak değişen ölçekte sıcaklık dalgalanmaları yaşar. Kararsız habitatlarda sıcaklık değişimi tüm biyolojik süreçleri çok farklı şekillerde etkiler. Sıcaklığa gösterilen tepki canlı profiline özgüdür ve hücresel süreçlerin karmaşık düzenlenmesini içerir. İnsanlar gibi endotermik organizmalar enerji pahasına vücut öz sıcaklığını sabit tutar. Bununla birlikte ektotermilerin hücreleri genellikle şaşırtıcı derecede geniş bir sıcaklık aralığında yaşayabilir. Sıcaklık uyumunu sağlayan hücresel mekanizmalar ise hala tam olarak bilinmemektedir [36]. Böceklerde düşük sıcaklıklara gösterilen tolerans; böceğin bazal toleransına, meydana gelen stresin onarımına, biyokimyasal tepkinin hızla açığa çıkmasına bağlıdır. Çevre kaynaklı stres etkenine hızla uyum sağlama bir çeşit fenotipik plastisitedir. Hem çevre hem de türün özellikleri, uyarana tepkinin ne ölçüde esnek olduğunu belirler. Böceklerin büyük bir kısmı 0 °C'de veya biraz üzerindeki sıcaklıklarda komaya girerken bazı türler/yaşam evreleri ölebilir bazıları ise tolerans geliştirip hayatta kalabilirler [37].

Sıcaklık metabolik aktivite, gelişme hızı ve büyüme gibi çok sayıda fizyolojik süreci ve biyofiziksel yapıyı eş zamanlı etkiler. Ancak en önemli fizyolojik etkileri enerji metabolizması (glikoliz, TCA döngüsü, ATP sentezi ve dönüşümü), protein şaperonlama ve protein bozulması (proteazom) süreçleri ile ilgilidir [38]. Bir böcekte sıcaklığın etkileri biyokimyasal mekanizmalarca tamponlanabilirse böcek yaşamaya devam eder. Bu tamponlama için ise temel moleküler mekanizmaların sorunsuz çalışması gerekir. Bu temel mekanizmalar sayesinde gerekli metabolitler ve enerji elde edilir; genler, proteinler, kriyoprotektanlar ve biyolojik zarlar eş güdüm içinde çalışır.

Sıcaklık zarlı yapıları fizikokimyasal açıdan etkiler. Sıcaklığa bağlı olarak, hücre membranının açıl zincir içeriği ve paketlenmesi ve ayrıca membran fazı değişir. Bu durumda metaboliz hızda, membran geçirgenliğinde ve membran akışkanlığında değişimler gözlenir [37]. Akışkanlıkta meydana gelen bir değişim sitoplazmik bileşenlerin membran dışına sızmasına neden olabilir. Bu durumda membran potansiyeli kaybolur. Nöromusküler yaralanmalar, termoelastik stres, iyon homeostazının bozulması, kritik gen(ler)in ekspresyonunda inhibisyon gibi çeşitli fizyolojik bozukluklar ortaya çıkar. Soğuk uygulamasını takiben sıcak periyotta ısı şoku

proteinlerinin ekspresyonunda artış, iyon pompalama sistemlerinin elektrokimyasal gradyanlarının yeniden oluşması söz konusudur [38].

Isı şoku tepkisi evrimsel olarak korunan bir savunma mekanizmasıdır. Hızlı ve büyük ölçekli transkripsiyonel bu tepki sayesinde hücre sıcak, soğuk gibi birçok stres etkenine karşı korunur. Normal koşullar altında ısı şoku ana transkripsiyon faktörü (HSF) aktif değildir ve monomer olarak bulunur. Stres başladığında HSF trimerize olur ve ısı şoku proteini (*hsp*) genlerinin promotörlerine bağlanır. Bu da stresle indüklenebilir genlerin senkronize şekilde dakikalar içinde 10-1000 kat aktivasyonu ile sonuçlanır. Hsp genlerinin aktivasyonu ile eşzamanlı olarak, transkripsiyon ve translasyonda yavaşlama veya geçici süre durma görülür [39]. Moleküler şaperonlar minimal stres proteomunun da önemli bir parçasıdır ve yanlış katlanmış/agrege proteinlerin taşıma, katlanma, hatalı katlanmaları açma ve degradasyonu süreçlerinde görev alırlar. Isı stresinin uygulama biçimine bağlı olarak Hsp ekspresyonu profili değişmektedir.

Metabolik yollar sıcaklık bağımlıdır ve düşük sıcaklıkların etkisi ile substrat-ürün arasındaki hassas denge bozulabilir. Enzimatik reaksiyonlarda ve taşıma sistemlerinde meydana gelen dengesizlikler laktik asit ve serbest radikaller (ROS) gibi toksik maddelerin birikmesine, ATP gibi temel metabolitlerin eksikliğine neden olabilir. Ayrıca düşük sıcaklıkların neden olduğu oksidatif stres GSH/GSSG gibi önemli antioksidan moleküllerin oranında değişimlere neden olabilir. Düşük sıcaklıklarda gen transkripsiyonu, mRNA splicing, protein translasyonu ve katlanması sonucu anormal proteinler artabilir. Düşük sıcaklıklarda muhtemelen protein parçalanması, metabolik yolların bozulması ve protein sentezinin azalması nedeniyle önemli ölçüde serbest amino asit birikimi gözlenir [38]. Şekerler, polioller veya serbest amino asitler proteinlerin ve membranların detoksifikasyonu ve stabilizasyonu gibi koruyucu özelliklere de sahiptir. Dolayısıyla bu moleküller sıcaklık dalgalanmaları sırasında hasarın onarımında (veya gelecekteki hasarlardan korunmada) bir role sahiptir [11].

Düşük sıcaklıkla birlikte böceklerde ATP gibi önemli moleküllerin yetersizliği görülür ve enerji için lipid rezervleri kullanılmaya başlanır. Yüksek sıcaklıklarda ise enerji üretim süreçleri yeniden düzenlenir ve temel fizyolojik süreçler için gerekli enerji sağlanır. ATP-bağımlı Hsp'ler, sentezi için ATP gereken kriyoprotektanlar, iyon dengesinde önemli olan membranda yerleşik ATP-bağımlı pompalama sistemleri ve

ATP gerektiren proteoliz süreçlerinin devam edebilmesi için enerji metabolizmasının devamlılığı zorunludur. Artan ATP talebine paralel olarak enerji yollarında görevli proteinlerin sentezi artar. ATP-sentaz bu duruma örnek verilebilir. Hücresel ATP'nin büyük bölümünün sentezinden sorumlu olan ATP-sentazın ekspresyonu sıcak-soğuk döngüleri sırasında artar. Hücre içi ATP seviyelerinin korunmasında önemli bir diğer protein arjinin kinazdır. Bu enzimler sayesinde hayvan hücrelerinde ATP tamponlama işlemi etkin şekilde yürütülür.

Stres etkisi ile meydana gelen hasarlı proteinlerin bir kısmı enzimler tarafından onarılır. Onarılamayan proteinler ise proteolitik bozunma ile uzaklaştırılır ve *de novo* olarak yeniden sentezlenir. Çok alt birimden meydana gelen proteolitik proteazomlar, protein yıkımını düzenleyen merkezi yapılardır. Proteolitik etki için etkin bir ubiquitin sistemine ve ATP hidrolizine ihtiyaç duyulur. Proteolitik aktivite sıcaklığın uygulanma biçimi ile yakından ilişkilidir. Düşük sıcaklık uygulamasını takiben artan serbest amino asit düzeyi proteolitik aktivite ile ilgili olabileceği gibi protein sentezindeki azalmadan da kaynaklanabilir [38]. Hücre içi iskelet bileşenleri sıcaklık değişimlerinden etkilenir. Özellikle aktin gibi proteinlerin yeniden düzenlemesi sayesinde sıcaklık stresi ile başa çıkmak mümkündür. Ayrıca farklı hücrelerde ifade edilen ve aktin monomerlerin/filamentlerin organizasyonunu düzenleyen proteinler de soğuğa toleransın geliştirilmesine etkilidir [38].

Organizmalar homeostazı sürdürmek ve ROS hasarını önlemek için, moleküler antioksidanlar ve antioksidan enzimler dâhil olmak karmaşık mekanizmalar geliştirmiştir. Düşük sıcaklıkta enzimatik reaksiyonların hızı düşer ve solunum zincirinin belirli noktalarında elektron birikir. Sonuçta ROS miktarında ani bir artış görülür. Bu durum hücre içi oksidatif strese karşı antioksidan tepkinin artmasına ve soğuğa adaptasyona neden olur.

Sıcaklık değişiminin etkilediği en önemli molekül grubu enzimlerdir. Sıcaklıktaki değişiklikler, enzimin yapısına ve kinetik özelliklerine etki eder. Zarların akışkanlığını etkileyerek zara bağlı enzimlerin aktivitesini değiştirir. Enzimin substratına bağlanmasını değiştir ve düzenleyici metabolitler ve enzimler arasındaki etkileşimi bozar. Katalize edilen reaksiyonların oranını etkileyerek metabolik kompanzasyonu değiştirebilir [40].

Düşük sıcaklığa uyum için yüzlerce genin transkript seviyelerinde kademeli değişimler meydana gelir. Soğuk etkisi ile birlikte hücre döngüsü genlerinin ifadesi neredeyse durma noktasına gelirken, çok sayıda genin ifadesinde artış gözlenebilir. Sıcaklık değişimlerinden etkilenen genler arasında JAK/STAT sinyal yolu, ras/MAPK kaskatı ve ribozomal ve mitokondriyal biyogeneze yer alan house keeping genleri yer alır [36].

Soğuğa ve ısıya karşı geliştirilen tepkinin farklı olduğu bilinmektedir. Bu farklılığın sebebi tam olarak bilinmese de, kısmen genetik temelli olduğu düşünülmektedir [34].

1.1.5.2. Sıcığa Karşı Fizyolojik Tepkiler

Böcekler fizyolojik işlevlerini düzenlemekte çevresel sıcaklıktan etkilenir. Böcek türlerinin birçoğu, habitatlarında yaşanabilecek sıcaklık değişimlerine tolerans gösteremez. Yüksek sıcaklıklara tolerans geliştirmek için fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların eş zamanlı çalışması gerekir. Bu mekanizmalar arasında sıcaklığın duyuşal ve düzenleyici nöronlar tarafından işlenmesi, stres tepkilerinin ortaya çıkması, metabolik ve hormonal düzenlemeler yer alır. Sıcığa yanıtta kullanılan ilk fizyolojik mekanizma duyuşaldır.

Duyuşal yanıt çevresel sinyali algılayan ve metabolik hızı etkileyen, anaerobik metabolizmanın kullanımı gibi tepkileri tetikleyen nöronlardan ve nörotransmitterlerden meydana gelir. Sıcaklığın etkisi ile iyon değişim (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi) değişimleri bir aksiyon potansiyeli oluşturur ve bu değişim termoreseptör nöronlarca algılanır. Sıcaklık ile ilgili bilgi daha sonra nörosekretuar hücrelere aktarılır ve asetilkolin, biyojenik aminler (oktopamin, dopamin, serotonin, histamin, epinefrin, norepinefrin, tiramin), amino asitler (gama-aminobütirik asit, glutamat) peptitler (adipokinetik hormon, allatotropin, allatostatin, proktolin, protorasikotropik hormon) gibi nöropeptidler eksprese edilir. Sonuç olarak böcekte termotaksi, ısıdan kaçınma, sıcaklık tercihi ve ısı hafızası dâhil olmak üzere birçok fizyolojik ve davranışsal tepki şekillenir. Ayrıca bazı böceklerde termoreseptör nöronlar, tepki verdikleri uyarana göre I) orta derecede ısınma, II) zararlı ısınma, III) orta derecede soğuk ve IV) zararlı soğuk olmak üzere dört sınıfta toplanır. Böcekler sinir sistemleri yüksek sıcaklıklardan olumsuz etkilenirse hayati tehlikeye yaşar ve çoğu zaman geri dönüşümlü bir komaya (sinir ve kas sistemlerinin kapanması) girer. Burada amaç hücreleri hasardan korumak ve onarım

mekanizmalarının ihtiyaç duyacağı enerjiyi korumaktır. Bu ısı komasına, hücre dışı K^+ konsantrasyonunda ciddi artışlar ve merkezi sinir sisteminde elektriksel sessizlik eşlik eder. Yine ısı şoku proteinleri sıcaklığın tetiklediği strese cevapta yer alır ve hücreyi hasarlardan korur. [41].

Organizmalar yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında, metabolizmalarında değişimler meydana gelir. Dinlenme halinde bireylerin temel biyokimyasal süreçlere (örneğin protein döngüsü, glukoneogenez, enzim aktivitesi) enerji harcama hızı “dinlenme metabolik hızı (RMR)” olarak adlandırılır ve harcanan enerjinin %50'sine denk gelir. Bu hız canlının hayatta kalma ve uyum gücü ile ilişkilidir. Uzun süreli yüksek metabolik hız, enerji tüketimindeki fazlalık nedeniyle ölümlere neden olabilir. Ayrıca, daha yüksek metabolik hız daha fazla oksijen tüketimi anlamına gelir. Bu durum solunum sonucu daha fazla serbest radikalın (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali) ortaya çıkmasına neden olur. Serbest radikaller lipidleri, proteinleri ve nükleik asitleri oksidatif hasara uğratar. Buna karşılık, yüksek sıcaklıklara maruz kalan böcekler hücresel hasarı azaltmak için süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon-S-transferaz, askorbik asit ve tiyoller gibi antioksidan savunmaları kullanır.

Metabolik hızı azaltmak, aşırı sıcak gibi stresli koşullardan kurtulmak için önemli bir stratejidir. Metabolik hızı düzenlemekte en temel strateji protein fosforilasyonudur. Bu mekanizma çok sayıda kinaz proteini tarafından gerçekleştirilir ve geri dönüşümlüdür. Bu sayede bazı metabolik genlerin ifadesi baskılanır. Transkripsiyonel ve translasyonel faktörler düzenlenerek enerji metabolizması (esas olarak iyon pompaları) kontrol edilir. Hem mitokondriyal hem de nükleer birçok gen, böceklerin çoğunda RMR'yi belirlemek için birbirleriyle ve çevre ile etkileşim halindedir.

Isı toleransının metabolik belirleyicilerinden biri de oksijendir. Yüksek sıcaklıklarda oksijen ihtiyacı artar. Çünkü artan sıcaklığa bağlı olarak aerobik metabolizma mümkün olan en üst düzeye ulaşır. Sıcaklığın etkisi ile proteinler denatüre olursa aerobik metabolizma düşmeye başlar. Enerji ihtiyacı aerobik metabolizma ile karşılanamazsa devreye anaerobik metabolizma girer. Bu sayede yüksek sıcaklıklarda böceklerin hayatta kalmasını kolaylaştıran tamamlayıcı enerji sağlanır. Anaerobik metabolizma kullanımı, bazı metabolitlerin (laktat, asetat, alanin gibi) birikmesi, trikarboksilik asit döngüsündeki bozulmalar gibi metabolik sonuçlarla karakterizedir.

Bakterilerden omurgalılara kadar tüm canlılar strese neden olan olumsuz çevre koşullarına belirli düzeyde cevap verir. Bu tepki, ısı şoku proteinleri, biyojenik aminler ve nöroendokrin moleküllerin sentezini ve kullanımını içerir [32]. Isı şok proteinleri (HSP), ısı, soğuk, açlık ve zararlı maddelere maruz kalma gibi stres durumlarında sayısal artış gösteren moleküler şaperonlardır. Bu proteinler, yüksek sıcaklıklarda aktif kalamayan diğer proteinlerin denatüre olmasını engeller. En kapsamlı şekilde incelenen HSP'ler HSP20, HSP70 ve HSP90'dır. HSP70 böceklerde sıcaklığa verilen tepkide en yaygın tespit edilen proteindir. Bu proteinlerin varlığı stresin göstergesi olarak değerlendirilebilir [42].

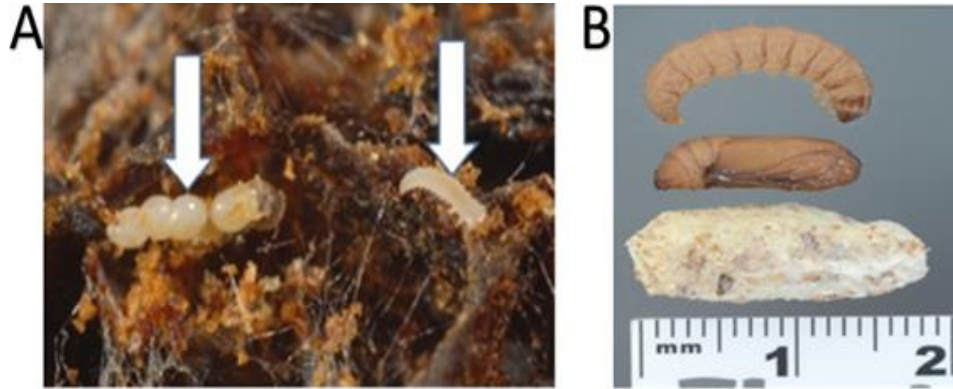
Stresi meydana getiren çevresel koşullar altında fizyolojik tepkilerin temel düzenleyicisi hormonlardır. Böceklerde görülen diyapoz hormonal bir tepkidir. Diyapoz, böceklerin sıcaklık ve kuraklık dâhil olmak üzere zorlu çevre koşullarıyla başa çıkmalarını sağlayan, gelişimin durduğu bir evredir. Diyapoz gen modüllerince kontrol edilen bütünlük bir yanıttır. Diyapoz sırasında, gelişimin durması, yağ rezervlerinin birikmesi, üremede durağanlık, artan stres direnci ve azalan metabolik hız koordinasyonu sağlanır [32]. Yüksek sıcaklığın etkisi ile hemolenfte ecdysone seviyelerinin arttığı ve diyapoz, metamorfoz gibi pek çok sürecin kontrol edildiği bilinmektedir [41].

Tez çalışmasında sıcaklık ve süre değişkenlerinin etkileri *Galleria mellonella* kullanılarak araştırılmıştır. *G. mellonella* larvasına 37 °C uygulandığında (30 °C'ye kıyasla) antimikrobiyal peptit derişiminde artış tespit edilmiştir. Bu durum 37 °C'nin larvada strese neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır [43]. Yirmi sekiz derecenin kontrol sıcaklığı olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, 38 °C'nin *G. mellonella* larvalarında ılımlı ısı şokuna neden olduğu bildirilmiştir [44]. Bir başka çalışmada *G. mellonella* larvaları için 30 °C optimum, 18 °C ise sub-optimal sıcaklık olarak belirlenmiştir. Larva gelişiminin 18 °C'de durduğu ve pupa evresinin geciktiği rapor edilmiştir [16].

1.2. *Galleria mellonella* (L. 1758) (Büyük Balmumu Güvesi) Gelişimi ve Sıcaklık

Büyük balmumu güvesi *G. mellonella* (L.) Lepidoptera takımı, Pyralidae familyasında yer alan arı ürünlerine zarar veren bir böcektir. Holometabol olan *G. mellonella*

yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört dönemde olgunlaşır [Şekil 1]. Yalnızca larva evresinde peteklere zarar verir.



Şekil 1.1. *G. mellonella* A) Yumurta (solda) ve 1. larval instar (sağda) B) Larva, pupa ve kokon (yukarıdan aşağıya sıralama) [15].

G. mellonella ergin dişileri yumurtalarını kovanlara kümeler halinde bırakır. Yumurta sayısı 50-150 arasında değişir. Yumurtalar pembe, krem ve beyazımtırak renktedir. Yumurtadan yeni çıkmış larvalar krem renginde olup 1-3 mm uzunluğundadır ve hareketleri hızlıdır. Yumurtadan yeni çıkan larva derhal yemeye ve ağ örmeye başlar. Baş kapsülü sarımtırak renkte ve protorasic segmentten daha küçüktür. Torasik bacaklar yumurtadan çıkar çıkmaz iyi gelişmişken, abdominal bacaklar larva 3 günlük olana kadar görünmez. Larva gelişimi boyunca 7-10 arasında deri değiştirir ve tüm bu aşamalarda vücutlarına ağ örür. Büyümenin büyük kısmı son 2 instarda gerçekleşir. Yalnızca son instarda bulunan larva kokon örür. Larva dönemi 28 gün ile 6 ay arasında değişim gösterir. Sıcaklık ve besin durumuna göre larva gelişimi 33-55 gün, 29-32 °C arasında ve yüksek nem içeren koşullarda ise 6-7 hafta kadar sürer. Gelişimini tamamlayan larvalar 20-28 mm'ye kadar ulaşabilmektedir [13-15]. Sub-optimal sıcaklıkların (18 °C) larvada diapausal aresti tetiklediği bilinmektedir [16].

G. mellonella'nın doğal yaşam ortamında yazın 30 °C'lerde seyreden sıcaklıklar, kışın 18 °C'ye geriler [12]. Sıcaklığın *G. mellonella* gelişimi üzerine etkisinden faydalanılarak, bu canlı ile mücadele edilmektedir. Fiziksel mücadele uygulamaları arasında yer alan sıcaklık kontrolü ile istila edilmiş arı kovani taraklarının (45-80 °C arasında 1-4 saatlik yüksek sıcaklık) *Galleria* larvalarından temizlendiği görülmüştür. Ayrıca -7 ila -15 °C'de 2-4,5 saat soğuk uygulaması yapıldığında da benzer sonuçlara ulaşılmıştır [13, 45].

Larval gelişim sürecinin ardından pupa evresi başlar. Pupalar sarımsı veya açık kestane renginde olup dönemin sonlarına doğru koyulaşırlar. Pupa evresi 6-55 gün arasında devam eder. Bu evre bir başkalaşım (metamorfoz) dönemi olup bu süreçte beslenme olmaz [14, 15]. *G. mellonella* erginleri açık kahverengi- gri renkte olup şartlara bağlı olarak dişi ömrü 1- 3 hafta, erkek ömrü ise 2 -4 hafta arasında değişir. Pupadan çıkan erginler 24 saat içinde çiftleşir. Genellikle geceleri aktif olup ağız parçaları köreldiğinden beslenmezler [14].

1.2.1. Model Organizma Olarak *G. mellonella* Larvası

Sıçangiller *in vivo* modelleme çalışmalarında yaygın şekilde kullanılır. Fare, sıçan gibi memliler, patojen biyolojisinin anlaşılmasında altın standart olarak düşünülmektedir. Ancak etik, lojistik ve ekonomik gerekçelerden dolayı kullanımlarında sıkıntı yaşanmaktadır. Ayrıca deneysel çalışmalarda ihtiyaç duyulan sayıya ulaşmak, üreme ve yetiştirmeleri için gereken süre çalışmaları yavaşlatmaktadır. Bu durum alternatif canlıların model organizma olarak kullanımına neden oldu. Embriyolu tavuk yumurtası, zebra fish gibi omurgalıların yanı sıra *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ve *Galleria mellonella* larvaları gibi omurgasız canlılar da model organizma olarak kullanılmaya başlandı [46].

G. mellonella larvasının çok sayıda, kolay ve ucuz şekilde elde edilebilir olması, özel laboratuvar donanımlarına ve deneysel kullanımı için etik izne gerek duyulmaması bu canlıyı ideal hale getirmektedir. Kazanılmış bağışıklığın olmaması ve doğuştan gelen bağışıklık cevabın omurgalılara benzerliği, larvalarının 37 °C’ de yaşayabilmesi *G. mellonella*’nın tercih edilmesine katkı sağlamaktadır. Özellikle larvalarının 37 °C’de yaşayabilmesi sıcaklığa bağlı enfeksiyon modellemelerinde kullanımını artırmıştır. 2014–2015 yılları arasında *G. mellonella*’nın enfeksiyon modeli olarak kullanıldığı 200’den fazla yayın bulunmaktadır. Bu çalışmalarda *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii* gibi mikrobiyal ajanlar kullanılmıştır. Enfeksiyon ajanı inoküle edilmeden larvalara genellikle 15 °C sıcaklık uygulanmakta ve 24 saat besinsiz bırakılmaktadır. Enfeksiyon sonrasında ise larvalar değişen sıcaklıklarda (25, 30 ve 37 °C) ve değişen sürelerde (24, 48, 120 saat, 10 gün) bekletilmektedir. Yapılan enfeksiyon çalışmalarında (mikrobiyal ajan uygulanmadan

önce) larvaların bağışıklık cevabını uyarmak için sıcaklığa maruz bırakıldığı da bildirilmektedir [47].

1.2.2. *G. mellonella* Larvası ile Yapılan -Omik Çalışmalar

Son yıllarda dizileme teknolojisinde ve robotik platformlarda görülen gelişmeler, büyük miktarda *in vitro* verinin üretilmesini kolaylaştırmıştır. Ancak bu verilerin *in vivo* doğrulanması için gereken memeli deneyleri zahmetli, pahalı ve etik olarak kısıtlayıcı olmaya devam etmektedir. *G. mellonella* ise bu sınırı ortadan kaldırmaya aday model organizmadır. Patogenez çalışmalarına ilaveten ilerleyen dönemlerde *G. mellonella*'nın yanık yara modeli, biyofilm modeli gibi tıbbi amaçlar için kullanımının artması beklenmektedir.

Genomik, proteomik, transkriptomik yaklaşımlar sayesinde hücresel düzeyde karmaşık biyolojik fonksiyonların anlaşılması mümkün olabilmektedir. Örneğin strese maruz kalma sırasında aktif olan tüm gen setini ve moleküler etkileşimleri belirlemek için omik tekniklerin kullanılması rutin hale gelmiştir. Genomik ve transkriptomik çalışmalar, *G. mellonella* biyolojisi ve konukçu olarak patojenlere verdiği tepkiler hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Farklı gelişim aşamalarından, larva dokularından, hemositlerden ve bağışıklığı uyarılmış larvalardan ekstrakte edilen RNA ile *G. mellonella*'nın ilk kapsamlı transkriptom çalışması yapılmıştır. İfade edilen dizi etiketlerinin yaklaşık %40'ı diğer böceklerin proteinlerine önemli ölçüde benzerdir ve %45'inin işlevi bilinmektedir. Bağışıklıkta işlevi bilinen, protein kodlayan birçok gen tespit edilmiştir. Bu çalışma, *G. mellonella*'daki bağışıklık ve stresle indüklenebilir genler hakkındakiyi bilimizi genişletmiş ve daha kapsamlı konak-patojen çalışmaları için temel sağlamıştır.

G. mellonella'nın ilk genom dizisi 2018'de rapor edilmiştir. Tüm genom shotgun dizileme projesi, anotasyonu tamamlanmamış olsa da *G. mellonella* ve diğer model konakçılar arasındaki homoloji çalışmalarını kolaylaştırmıştır. *G. mellonella*'ya ait genom ve transkriptom verileri kullanılarak bal mumunda da bulunan uzun zincirli hidrokarbonları parçalama potansiyeline sahip enzimler tanımlanmıştır. Kemoresepsiyon mekanizmalarını aydınlatmak için erkek ve dişi *G. mellonella* antenlerinin transkriptomu çalışılmıştır.

Enfeksiyona karşı hem konak hem de patojen tepkilerinin tanımlanması, konakçı-patojen etkileşimlerinin ve enfeksiyon dinamiklerinin tam bir resmini elde etmek için çok önemlidir. *G. mellonella* bakteri-mantar enfeksiyon modellerinde transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde yer alan mikroRNA'lar (miRNA'lar) araştırılmış ve enfeksiyon kaynaklı miRNA'nın yanı sıra nesiller arası bağışıklığın oluşturulmasına katkı sağlayan aday miRNA'lar tanımlanmıştır. Enfeksiyon kaynaklı miRNA'ların dps-miR-210b düzenlemesini azalttığı buna bağlı olarak sitokin üretiminde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgunun bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı insan mikroRNA cevabın anlaşılmasına katkı sağlayacağına inanılmaktadır. Patojen bir mantar olan *Candida albicans*'ın hem fare hem de *G. mellonella*'da enfeksiyonun erken ve geç evrelerinde gen ekspresyon profilleri araştırılmış, hem *G. mellonella* hem de murin konakçıların transkriptom düzeyinde enfeksiyona yanıtı örneklenen zaman noktalarında oldukça benzerlik göstermiştir. Başka bir çalışmada *Beauveria bassiana*'nın *G. mellonella* enfeksiyonu sonrasında farklı zaman noktalarında gen ekspresyon profilleri tanımlanmış ve enfeksiyonun moleküler mekanizması incelenmiştir. Benzer bir yaklaşımla patojenik bakteri *Yersinia entomophaga*'nın *G. mellonella* enfeksiyonu erken, orta ve geç evrelerde transkriptom düzeyinde araştırılmıştır. Bu çalışma ile enfeksiyonun bir veya daha fazla aşamasında aktive edilen *Y. entomophaga* genleri detaylı şekilde tespit edilmiş ve ilgili birkaç virülans faktörün (örn. adezinler, tip III salgılama sistemleri) aktivasyonunu ve enfeksiyon aşamasına özgü konak tepkileri tanımlanmıştır. Bu faktörlerin *Yersinia* virülansı için önemi insan ve fare konakçılarında da gösterilmiştir.

Çeşitli patojenlerle enfekte edilen *G. mellonella* hemositlerine ait RNA'lar sekanslanarak hücre içi patojenlerin konak hücreye verdiği yanıtlar transkriptom düzeyinde aydınlatılmıştır. Bu çalışmalar sayesinde, yüksek ökaryotlarda ve *Drosophila* gibi diğer böcek modellerinde bulunan patojeni tanıma ve bağışıklık tepkileri için anahtar sistemler tanımlanabilmiştir. Yakın tarihli bir çalışmada, zorunlu hücre içi patojen *Coxiella burnetii* ile oluşturulan enfeksiyon modelinde süreç, patojen perspektifinden değerlendirilmiş ve hücre içi enfeksiyon sırasında önemli olan genler tanımlanmıştır. *C. burnetii*'nin gen ekspresyon profilleri *G. mellonella*, memeli hücre hatları ve *in vivo* fare enfeksiyon modelleri arasında benzerlikler göstermiştir. Fungal bir patojen olan *B. bassiana* ile yapılan enfeksiyon modellemesinde hemosit RNA'ları

sekanslanarak hem konakçı *G. mellonella* hem de patojene özgü tepkiler tanımlanmıştır. *G. mellonella* doğal bağışıklığında meydana gelen tepkinin anlaşılmasının, insan bağışıklığının enfeksiyonlara geliştirdiği cevabın anlaşılmasına da katkı sağlayacağı ifade edilmiştir. Tüm veriler değerlendirildiğinde konakçı-patojen etkileşimlerinin moleküler karakterizasyonunda *G. mellonella* modelinin önemi ortaya çıkmaktadır.

G. mellonella bağışıklık sisteminde sıcaklık ve fungal enfeksiyonun eş zamanlı etkilerinin protein düzeyinde araştırıldığı ilk çalışma böceğin genomu sekanslanmadan önce yapılmıştır. Çalışmada tespit edilen peptitler böceğin yakın akrabalarında tanımlanmış peptitler dizi bilgileri kullanılarak tanımlanabilmiştir. *G. mellonella*'nın tüm genom dizi bilgisi tamamlandıktan sonra doğal bağışıklık tepkilerinin araştırıldığı çalışmalarda artış meydana gelmiştir. *Aspergillus fumigatus* enfeksiyonuna karşı hücresel ve humoral bağışıklık tepkisinin araştırıldığı bir çalışmada 252 farklı proteinin zamana bağlı dinamik değişimlerinden bahsedilmektedir. Bir başka çalışmada *C. albicans* ile enfekte edilen *G. mellonella* hemolenf proteomunda meydana gelen değişimler karakterize edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ile enfekte edilen *G. mellonella*'nın hemolenf proteomunun incelendiği bir başka çalışmada zamana bağlı olarak bazı antimikrobiyal proteinlerin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Enfeksiyon sırasında *G. mellonella* ve *M. mycetomatis* proteomlarının araştırılması sayesinde konakçı-patojen etkileşimine ait insan enfeksiyonu için de geçerli olabilecek anahtar proteinler tanımlanmıştır. Proteomik ile organizmada meydana gelen değişikliklerin anlık görüntüsünü yakalamak mümkün olmakta, protein profili oluşturulması ile de geniş tabanlı bilgi elde edilmektedir [48].

1.3. Proteomik

Genom dizilemede yaşanan hızlı ilerleme “fonksiyonel genomik” olarak adlandırılan ve global bir yaklaşımla gen fonksiyonunu ve mRNA, protein ve diğer fonksiyonel seviyelerde interaksiyonu açığa çıkarmayı hedefleyen bir alanın gelişmesine olanak sağlamıştır. Genomik bilgi ile ilgili hızlı gelişmelere rağmen, genom dizisini bilmenin, karmaşık seviyelerde gerçekleşen olayların iç yüzünü açıklamakta yeterli olamayacağı açıktır. Sonuç olarak genom için tamamlayıcı nitelikte olan, proteinlerin yapı, fonksiyon ve etkileşimlerinin çalışıldığı “proteomik” ortaya çıkmıştır. Proteom, genom tarafından sentezlenen tüm gen ürünleri için kullanılan bir terim olup, genomun protein karşılığı

olarak tanımlanmaktadır. Bu gen ürünlerinin analiz edilmesine ise “proteomik” denilmektedir. Proteom, hücresel davranış ve fonksiyonlarını tanımlayan oldukça dinamik ve karmaşık bir alandır.

Proteinlerin hücre içinde temel ve fonksiyonel bileşen olması biyomedikal tabanlı tüm alanlarda proteomik yaklaşımına önem kazandırmıştır. Gen ekspresyonu transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde düzenlenebildiği için, transkript seviyesinin belirlenmesi, hücrenin proteomu hakkında kapsamlı bilgi vermez. Zira yapılan çalışmalar biyolojik sistemlerin transkriptomları ve proteomları arasında doğrudan kurulabilecek özel bir ilişkinin olmadığını göstermiştir. Çünkü mRNA transkriptlerinin çeşitli şekillerde bir araya gelerek protein izoformları oluşturması söz konusudur. Yapılan ön çalışmalarda bir insan mRNA transkripti için 3-6 form proteinin var olabildiğinden söz edilmektedir. Ayrıca biyolojik sisteme ait transkript profili, protein taşınımı, lokalizasyonu ve fonksiyonu için kritik olan posttranslasyonel modifikasyonlar hakkında bilgi vermemektedir. Son olarak proteinler değişen iç ve dış çevre parametrelerine cevap olarak sürekli değişirler ve bu karmaşık dinamik sürece ait birçok bilgi proteom ile elde edilebilmektedir [49, 50].

Top-down ve bottom-up olmak üzere iki farklı yaklaşım ile proteomik çalışmaları yapılmaktadır. Top-down yaklaşımda proteinler bütün halinde analiz edilirken, bottom-up’da proteinler peptitlerine parçalanır ve daha sonra analiz edilir. Proteinlerin analizi, bir işlemler bütünü olup örnek hazırlama, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE), görüntüleme ve analiz, spot tanımlama ve veri tabanı araştırılması basamaklarından meydana gelmektedir.

1.3.1. Örnek Hazırlama

Örnek hazırlama, proteomik çalışmaların belki de en kritik aşamasıdır. Güvenilir ve anlaşılır bilgi elde edebilmek için hazırlanan protein örneğin kalitesi oldukça önemlidir. Proteinlerin izolasyonunda kullanılan standart bir yöntem bulunmamaktadır. Hedef protein/proteinlere göre hücresel fraksiyonlara ayırma, fiziksel veya kimyasal parçalama, istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması, hedef proteinlerin zenginleştirilmesi örnek hazırlama sırasında kullanılan yöntemlerdendir.

1.3.2. 2D-PAGE

İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforezinde (2D-PAGE), proteinler ilk boyut olarak izoelektrik noktalarına (pI) ardından moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. 2D-PAGE tipik olarak, protein ekspresyon profilinde meydana gelecek yeni bir protein spotun gözlenmesi, bir proteinin kaybolması ve protein spotun intensitisinde meydana gelen değişimleri tespit etmek için kullanılmaktadır. Avantajlarının yanı sıra bu yöntemin bir takım teknik sınırlamaları bulunmaktadır.

1) Protein Çözünürlüğü: Tüm proteomu temsil eden bir protein profilinin elde edilmesinde yaşanan zorluklar 2D-PAGE yönteminin en temel problemlerinden biridir. Hücresel proteinler çok çeşitli çözünürlüklere sahiptir ve 2D-PAGE’de kullanılan üre tüm proteinlerin çözünmesi ve IEF sırasında çözünürlüklerinin korunması için yeterli değildir. Ayrıca membran proteinlerinin çözünürlüğünü sağlamak oldukça zordur ve proteinlerin önemli bir kısmı örnek hazırlama ve IEF aşamaları sırasında kaybedilmektedir. Hücresel proteomun yaklaşık %30’ unu meydana getiren hidrofobik proteinler, pI>8 olan proteinler ve büyük moleküler ağırlığı (~200 kDa) olan proteinler IEF sırasında çökebilir ve 2D-PAGE’de yetersiz çözünme meydana gelir. Zwitterionik deterjan kullanımı özellikle hidrofobik proteinlerin çözünmesini artırıcı niteliktedir. Proteinlerin biyofiziksel özelliklerinden faydalananarak fraksiyonlarına ayırmak (hücre içi lokalizasyonlarına bağlı olarak proteinlerin ayrımı) da protein çözünürlüğünü artırıcı yaklaşımlar arasında yer almaktadır.

2) Protein kapasitesi: Herhangi bir zamanda ökaryotik bir hücrede yaklaşık olarak 5000-10000 gen ifade edilmektedir ki, bu da mRNA splicing ve posttranslasyonel modifikasyonlar sayesinde 20-30 bin farklı proteine denk gelmektedir. Ancak 2D-PAGE yöntemi ile 18x20 cm²’ lik bir jelde yaklaşık olarak 3000 protein spot tespit etmek mümkün olmaktadır. Yani 2D-PAGE ile elde edilen proteom profili, tüm proteomu kapsamamaktadır. Hücre içinde en yoğun olan housekeeping proteinler, metabolik enzimler gibi proteinler jelde çok rahat tespit edilebilirken, sinyal molekülleri, transkripsiyon faktörleri gibi düşük yoğunluktaki proteinlerin gözlenmesinde problem yaşanmakta, bu da yanılgılara neden olabilmektedir. Örneğin 2D-PAGE’den önce bir işleme tabi tutulması proteom profilinin daha etkili temsiline yardım etmektedir.

3) Proteinlerin tespiti ve kantitatif değerlendirilmesi: Bir hücrede birçok protein ifade edilmekte ve bu durum proteinlerin tespitinde ve nicelik olarak değerlendirilmesinde bazı sınırlamalar ortaya çıkarmaktadır. Proteinlerin tespitinde kullanılan daha duyarlı boyalar sayesinde daha çok proteinin tespiti sağlanmaktadır. Görüntü analiz programları, protein spotların net şekilde ayrımının yapılmasında, protein ifadesinde nicelik bakımından meydana gelebilecek değişimlerin doğru şekilde tespitinde oldukça etkili olmaktadır. Protein tespitini daha etkili ve doğru yapan algoritmaların geliştirilmesi sayesinde bu problemlerin büyük ölçüde aşılması hedeflenmektedir [49].

1.3.3. Proteinlerin Kütle Spektrometresi (MS) ile Tanımlanması

MS ile peptitlerin kütlesi veya amino asit dizisi gibi yapısal bilgiler elde edilmektedir. Bu bilgiler sayesinde protein veya nükleotit veri bankaları araştırılarak proteinin tanımlanması yapılmaktadır. MS ile protein tanımlanmasında 3 ana aşama bulunmaktadır; Bu aşamalar örnek hazırlama, örneğin iyonize edilmesi ve kütle analizidir. MS ile biyolojik örneğin analiz edilebilmesi için ilk koşul molekülün yüklü olmasıdır. Örneğin çözünmüş iyonlara dönüştürülmesi yaygın kullanılan uygulamadır. Birçok farklı uygulama olmasına rağmen iyonizasyon için en yaygın kullanılan yöntemler Elektrosprey İyonizasyon (ESI) ve Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon (MALDI)'dur. Her iki yöntemde de peptitler proton alarak veya vererek iyonlara dönüştürülür ve iyonlaşma örnek bütünlüğüne ciddi kayıplar vermez. Bu sayede peptitin ve proteinin kütle bilgisi hakkında doğru sonuçlara ulaşılır [51]. Proteomik ifadenin karakterizasyonunda istenen, tüm hücresel proteinlerin miktar, modifikasyon, lokalizasyon ve fonksiyonlarının belirlenmesidir. MS ve sayısal değerlendirmelere dayalı yöntemlerin birleştirilmesi ile proteinler hakkında kapsamlı bilgi sağlayan veri bankaları oluşturulmaktadır. Bu anlamda geniş veri sağlayacak yöntemlerle desteklenebilen MS, protein tanımlama ve karakterizasyon için proteomik çalışmalarının vazgeçilmez bir unsuru olarak karşımıza çıkmaktadır [49].

1.3.4. Biyoinformatik

Peptit kütle parmak izi (PMF) ve fragmentasyon (MS/MS) bilgilerini kullanarak veri bankalarında protein taraması yapan bilgisayar algoritmaları ve yazılımlar (MASCOT, SEQUEST) bulunmaktadır. Genel yaklaşım teorik (in silico) olarak oluşturulan bir proteom haritası ile deneysel olarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması şeklindedir.

Biyoinformatik yazılımlar proteine ait amino asit dizisini analiz ederek proteinin hücre içi yerleşimi, sinyal peptit içeriği, fonksiyonu ve pI/MW değeri gibi oldukça önemli bilgiler sağlamaktadır [51].



2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde; çalışmanın materyalini oluşturan *G. mellonella* larvalarının yetiştirilmesi, süre-sıcaklık uygulamaları, protein elde edilmesi ve ayrılması, süre-sıcaklık etkisi ile değişen proteinlerin belirlenmesi ve bu proteinlerin kütle analizi ile tanımlanması ve biyoinformatik araçlarla değerlendirilme işlemleri açıklandı.

2.1. *G. mellonella* Kültürü ve Zamana Bağlı Sıcaklık Uygulamaları

G. mellonella larvaları ERÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden temin edilip Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Böcek Yetiştirme Laboratuvarında kültüre alındı. Larvalar steril olmayan şartlarda, 30 ± 1 °C'ye ayarlanıp etüvde [Memmert UN110, Almanya] ve 65 ± 5 bağıl nem içeren koşullarda yetiştirildi. Besi yeri olarak; 300 gr mısır unu, 200'er gr süt tozu ve soya unu, 400'er gr kepek, süzme bal ve gliserin ile 100 gr kuru maya karışımı kullanıldı [52]. Homojen bir kültür elde etmek için, bu larvalardan gelişen erginlere ait yumurtalar kullanıldı. Larva gelişimi stereo mikroskop (Leica, Almanya) ile takip edildi ve yumurtaların kültüre alınmasından itibaren 40 gün sonra son dönem larvalar elde edildi. Her bir uygulama için besiyeri içeren cam petrilere, boyu en az 2 cm olan 12 larva alındı. Bu larvalar; 24 ve 48 saatlik sürelerle 18, 30 ve 37 °C olmak üzere üç farklı sıcaklığa maruz bırakıldı. Daha sonra petrilere besin uzaklaştırıldı ve larvalar belirtilen sıcaklıklarda 2 saat daha bekletildi. Kültürden alınan her bir larvanın ağırlığı tespit edilerek tüm işlemler bağımsız olarak üç kez tekrarlandı.

2.2. Larvalardan Protein İzolasyonu

Protein izolasyonunda Cresti ve ark.,[53]'nın kullandığı yöntem takip edildi. Hareketsiz kalana kadar buz üstünde bekletilen 6 larva, yüzey sterilizasyonu için 1000 ünite

penisilin ve 1000 µg streptomisin (Gibco, ABD) içeren dPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (Pan BioTech, Almanya) içine alındı ve steril bistüri ile baş kapsülüne 3. segmentten kesi açıldı. Hemolenf (ortalama 20 µL/birey) toplanıp %10'luk TCA ve 10 mM DTT içeren aseton içine alındı. Hemolenf örnekleri gece boyunca -20 °C'de (Beko, Türkiye) bekletildi. Hemolenfin uzaklaştırılmasının ardından kalan vücut dokuları bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıldı ve %10 TCA ve 10 mM DTT içeren aseton içine alındı. Sürekli vuruşla %80 verimde 50 saniye boyunca sonike edildikten sonra (Sonics Vibra-Cell, ABD) gece süresince -20 °C'de bekletildi. Tüp tabanına çöken vücut parçaları uzaklaştırıldıktan sonra protein izolasyonuna devam edildi. Hemolenf ve vücut örnekleri için aynı olan bu işlemlerde örnekler 15000 rcf'de 5 dk süre ile 4 °C'de santrifüj edildi (Sigma, ABD). Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından pellet üzerine %10 TCA, 10 mM DTT ve aseton karışımı ilave edildi. Karışım vortekslelendikten sonra yeniden santrifüj edildi. Pamuksu ve beyaz bir pellet elde edilene kadar işlem tekrarlandı. Son çöktürmenin ardından pellet üzerine soğuk aseton eklendi. Çöktürme ve soğuk aseton ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı ve elde edilen pellet 30 °C'de 20 dk boyunca vakum konsantratörde (Eppendorf, Almanya) kurutuldu ve daha sonraki işlemler için -20 °C'de muhafaza edildi [54].

2.3. Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Pellet üzerine rehidrasyon tamponu (8 M üre, 2 M thioure, 1x cOmplete Protease Inhibitor kokteyl, %4 CHAPS, 50 mM DTT, %0,6 (v/v) amfolit ve %0,02 bromfenol mavisi) eklenip vortekslelendi. Örnekler ultrasonik su banyosunda (Isolab, Almanya) aralıklarla sonike edildi ve çözünmeyen pellet 15000 rcf'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Taze tüplerde toplanan süpernatant protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanıldı. Bu amaçla Pierce 660 nm kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı ve önerilen protokol takip edildi. Standart grafik oluşturmak için kitte yer alan BSA kullanıldı. Standartların ve örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrik olarak tespit edildi (Shimatzu, UV1800). Standart grafik çizilerek örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

2.4. İki Boyutlu Protein Ayrımı

pH 3-10 NL 17 cm'lik strib (BioRad, ABD) 300 µg/350 µL olacak şekilde protein yüklendi. Protein yüklü stripler oda koşullarında gece boyu pasif rehidrasyona bırakıldı.

Fokuslama için Protean® i12 Cell (BioRad, ABD) kullanıldı. İkişer saat sırası ile 250 V (hızlı), 500 V (hızlı), 750 V (hızlı), 1000 V (doğrusal), 5000 V (doğrusal), 8000 V (doğrusal) elektrik uygulandı. 50000 Vh'e ulaşana kadar fokuslamaya devam edildi [55]. Fokuslama sonrası stripler önce 10 mg/mL DTT, sonra 40 mg/mL IAA içeren dengeleme tamponunda (6 M üre, %30 gliserol, %2 SDS ve 50 mM Tris-HCl; pH, 8.8) 20 dk süreyle inkübe edildi. Stripler 20 mA/jel akım altında %12'lik akrimalid jelde yürütüldü. Koşma tamponu olarak 1x Tris-Glisin-SDS (25 mM Tris, 192 mM Glisin ve %1'lik SDS; pH, 8.3) kullanıldı. Jeller %40 EtOH, %10 asetik asit, %50 ultra saf su ile hazırlanan solüsyonda 1 saat süreyle fikse edildi. Ultra saf su ile iki kez yıkanıp 1x Colloidal Commassie Brilliant Blue boya (%10 amonyum sülfat, %1,2 O-fosforik asit, %30 metanol ve %2 stok boya (%6 Coomassie G-250)) ile boyandı [56]. Uygulamadan 24 saat sonra boya uzaklaştırıldı, jeller ultra saf su ile yıkandı ve ChemiDoc MP (BioRad, ABD ile görüntülenip imajları kaydedildi.

2.5. Jel Görüntülerinin Karşılaştırılması ve Spot Kesimi

Süreye bağlı her bir sıcaklık için belirlenen jeller karşılaştırıldı. Aynı süreye ait 3 farklı sıcaklığın jelleri karşılaştırılarak spot farklılıkları tespit edildi. Yalnızca uygulamaya özgü olarak ortaya çıkan ve/veya kaybolan spotlar jellerden kesildi ve kütle analizi için hazırlandı. Kesilen spotlar gruplandırıldı ve MS analizi için 4 tüp oluşturuldu. Bu tüplerin spot içeriği aşağıda gösterildiği gibidir.

1. Tüp: 24 saat boyunca 18, 30 ve 37 °C'ye maruz bırakılan larvanın hemolenf proteomlarının karşılaştırması sonucu tespit edilen özgün spotlar.
2. Tüp: 24 saat boyunca 18, 30 ve 37 °C'ye maruz bırakılan larvanın vücut doku proteomlarının karşılaştırması sonucu tespit edilen özgün spotlar.
3. Tüp: 48 saat boyunca 18, 30 ve 37 °C'ye maruz bırakılan larvanın hemolenf proteomlarının karşılaştırması sonucu tespit edilen özgün spotlar.
4. Tüp: 48 saat boyunca 18, 30 ve 37 °C'ye maruz bırakılan larvanın vücut doku proteomlarının karşılaştırması sonucu tespit edilen özgün spotlar.

2.6. Kesilen Spotların Kütle Analizine Hazırlanması

Kesilen spotların toplandığı ve her grup için oluşturulmuş 4 tüpe 500 µl 100 mM amonyum bikarbonat/asetonitril (ACN) (1:1 v/v) tamponu eklendi ve 30 dk boyunca termomikserde (Eppendorf, Almanya) çalkalandı. Süre sonunda solüsyon uzaklaştırıldı ve yeniden 500 µl amonyum bikarbonat/ACN tamponundan eklendi. Coomassie boya tamamen uzaklaşana kadar bu işlemler tekrarlandı. Daha sonra her bir tüpe 500 µl ACN eklenip çalkalamaya devam edildi. ACN uzaklaştırıldıktan sonra spotlar vakum konsantratörde kurutuldu. In-gel digestion için her bir tüpe jel parçalarının üzerini kapatacak kadar tripsin (Promega, ABD) enzimi eklenip gece boyu 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her bir tüpe %0,4 (v/v) formik asit içeren %3 ACN (v/v) eklenmiş ve ultrasonik banyoda 5 dk sonike edildi. Oda sıcaklığında 10000 rcf’de 10 sn santrifüjün ardından, peptit içeren süpernatant her bir grup için etiketlenmiş temiz, düşük protein bağlayan tüplere aktarıldı. Tüpte kalan jel parçaları üzerine %0,4 (v/v) formik asit içeren %50 (v/v) ACN eklendikten sonra sonikasyon-çöktürme basamakları tekrarlandı ve alınan süpernatantlar, peptitlerin toplandığı ana tüplere aktarıldı. Tüpte kalan jel parçaları üzerine bu kez %100 ACN eklenip santrifüjlendikten sonra toplanan süpernatant, diğer tüm peptitlerin bulunduğu tüplere eklendi. Bu sayede peptit karışımı içeren 4 tüp elde edildi. Peptit karışımları ZipTip C18 (Millipore, Almanya) ile temizlendikten sonra vakum konsantratör yardımı ile kurutuldu. Kütle analizi yapılana kadar toz halde -80°C’de (Sanyo, Japonya) muhafaza edildi [57].

2.7. LC-MS/MS Analizi

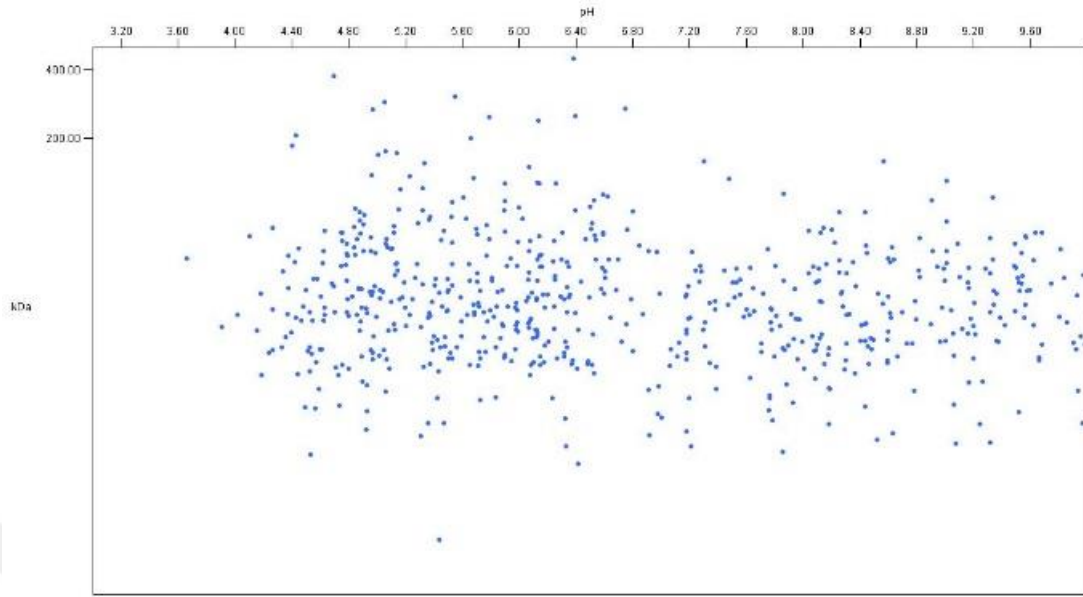
Hazırlanan peptit karışımlarının analizi Koç Üniversitesi Proteomik Biriminde hizmet yapıldı. Protein tanımlamaları Thermo Scientific Q Exactive Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with nano Liquid Chromatography, UltiMate 3000 NCS-3500RS (n-LC MS/MS) cihazı kullanılarak yapıldı. Örnekler 3 tekrarlı olarak, 300 nL/dk akış hızında, 120 dk süre ile koşturuldu. Örnek ayrımı için 75 µm i.d. x 25 cm C18 kolon (Reposil-Gold C18, 3 µm, 200 Å, Dr.Maisch) kullanıldı. 400-1500 m/z aralığında kütle taraması yapıldı. Döngü başına en yoğun intensiteye sahip 15 iyon seçilip fragmentlerine ayrıldı ve DDA (data-dependent acquisition) modda analiz edildi (Full MS/dd-MS2 TopN mod). *Bombyx mori* (UP000005204), *Papilio machaon* (UP000053240), *Operophtera brumata* (UP000037510), *Papilio xuthus*

(UP000053268) ve *Danaus plexippus* (UP000007151) türlerinin UniProt referans proteomlarından oluşturulan 78.569 proteinlik veri tabanı hazırlandı (UniProt, 14.06.2017). Veri tabanı taramalarında Mascot (Matrix Science, ABD) ve Sequest, protein tanımlanmasında ise Thermo Discoverer 2.3 (Thermo Fisher Scientific, ABD) programları kullanıldı. Bu işlemler sırasında FDR (False Discovery Rate) oranı %0,01 olarak belirlendi.

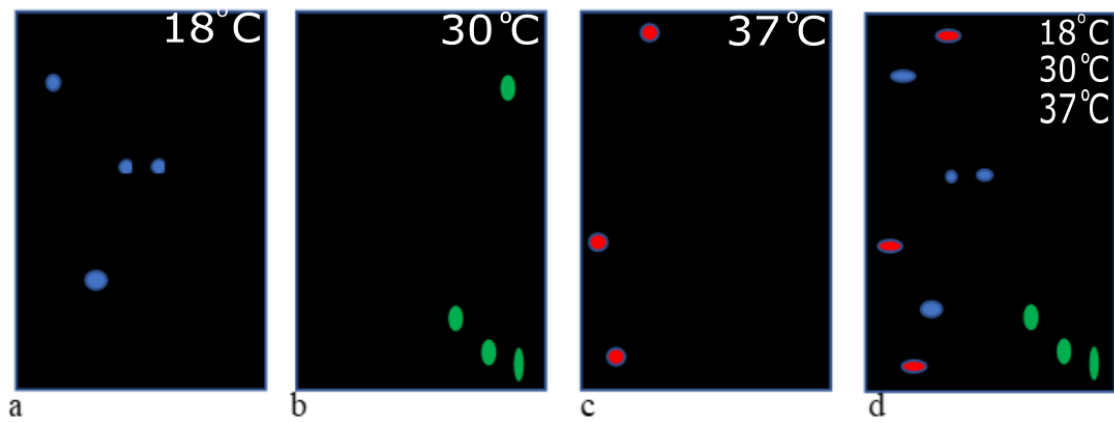
2.8. MS Verilerinin İşlenmesi

Kütle spektroskopisi sonucu her bir örnek için yürütülen teknik tekrar bulguları karşılaştırıldı ve ortak olan proteinler tespit edildi. Tespit edilen bu proteinlerden izoelektrik noktası pH 3-10 ve moleküler ağırlığı 10-250 kDa dışında kalanlar değerlendirme dışı bırakıldı. Yüksek güvenilirliğe (high confidence) sahip, en az 3 tekrar etmeyen peptit içeren proteinler tespit edilip, sıcaklık süre etkisinin değerlendirilmesinde kullanıldı.

Yirmi dört ve 48 saat karşılaştırması için tanımlanan proteinler web tabanlı InteractiVenn programı ile gruplandırıldı. Farklı sıcaklıkların larva proteomuna etkisini tespit etmek için ise iki sanal jel hazırlandı. Bu jellerden ilki tanımlanan proteinlerin UniProt kimlikleri kullanılarak internet tabanlı JvirGel programı ile oluşturuldu (Şekil 2.1). İkinci sanal jel ise uygulaması süresi aynı olan, 18, 30 ve 37°C jellerinden kesilen tüm spotların temsili jel konumlarının birleştirilmesi ile oluşturuldu. İkinci sanal jelde her sıcaklık bir renk ile temsil edildi (Şekil 2.2). İki sanal jel birbiriyle karşılaştırıldı ve bu şekilde kesilen proteinlerin ait olduğu jeldeki konumları belirlendi.



Şekil 2.1. Tanımlanan proteinlerin sanal jelde M_w ve pI değerlerine göre yerleştirilmesi.



Şekil 2.2. Farklı sıcaklık değerlerine özgü proteinlerin jeldeki konumları ve renk kodları (a, b ve c); d) jellerden kesilen tüm spotlarla oluşturulan ikinci sanal jel.

2.9. Biyoinformatik Analiz

Biyoinformatik değerlendirmeler öncesinde 24 saat 18, 30 ve 37 °C hemolenf ve 24 saat 18, 30 ve 37 °C vücut doku gruplarından kesilen ve tanımlanan proteinlere ait bilgiler tek bir listede birleştirildi. Aynı işlem tanımlanan 48 saate ait hemolenf ve vücut doku proteinleri içinde tekrarlandı. Tanımlanan *G. mellonella* proteinlerinin hücre içi konumları, UniProt ve WoLF PSORT kullanılarak belirlendi. Proteinlerin görev aldığı biyolojik süreçlerin tespitinde yine UniProt kullanıldı. Tanımlanan *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* ve *B. mori* proteinleri UniProt

Blast ile tespit edildi. Benzerlik için anlamlı alt sınır değeri %50 olarak seçildi. *G. mellonella* proteinleri ile anlamlı benzerlik gösteren *D. melanogaster* ve *B. mori* proteinleri kullanılarak etkileşim haritaları oluşturuldu. Protein etkileşimlerinin tespitinde String Version 11.0 veri tabanı kullanıldı. Minimum etkileşim skoru 0,9 olarak belirlendi, bunun dışında varsayılan parametreler kabul edildi. *D. melanogaster* ve *B. mori* proteinleri için yolak dağılımı String, KEGG ve FlyBase ile belirlendi. Tanımlanan metabolik süreçlerin insandaki benzerleri Reactome ile tespit edildi.

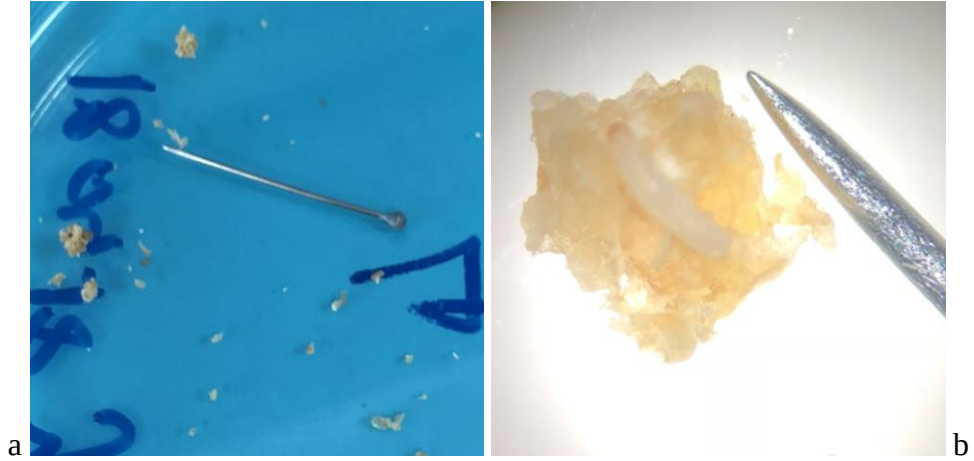


3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. *G. melonella* Kültürü, Larvaların Gelişimi ve Farklı Sürelerde Değişen Sıcaklıkların Uygulanmasına ait Değerlendirmeler

Mevcut fiziksel koşullarda (karanlık, 30°C, %65±5 bağıl nem) ve suni besi yerinde yetiştirilen böceğin yumurtadan ergine gelişim süresi yaklaşık 60 gün olarak tespit edildi. Kültürün 10. gününde ilk evre larvalar görüldü (Şekil 3.1a ve 1b). Kırk beşinci günden sonra ise pupa gelişimi gözlemlendi. Ergin çıkışı ise kültürün 55. gününde gerçekleşti. Son instar larva için örnekleme 40. günde yapıldı. Son dönem larvaların uzunluklarının ise 2-2,5 cm arasında değiştiği tespit edildi (Şekil 3.2).

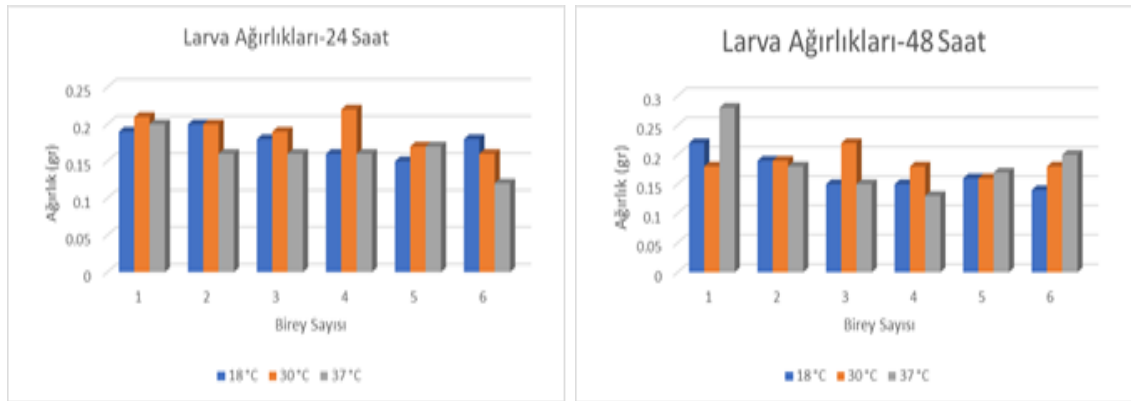


Şekil 3.1. Kültürün 10. gününde *G. mellonella* larvalarının a) çıplak gözle görülen, b) steromikroskop (25x) görüntüleri (Leica).

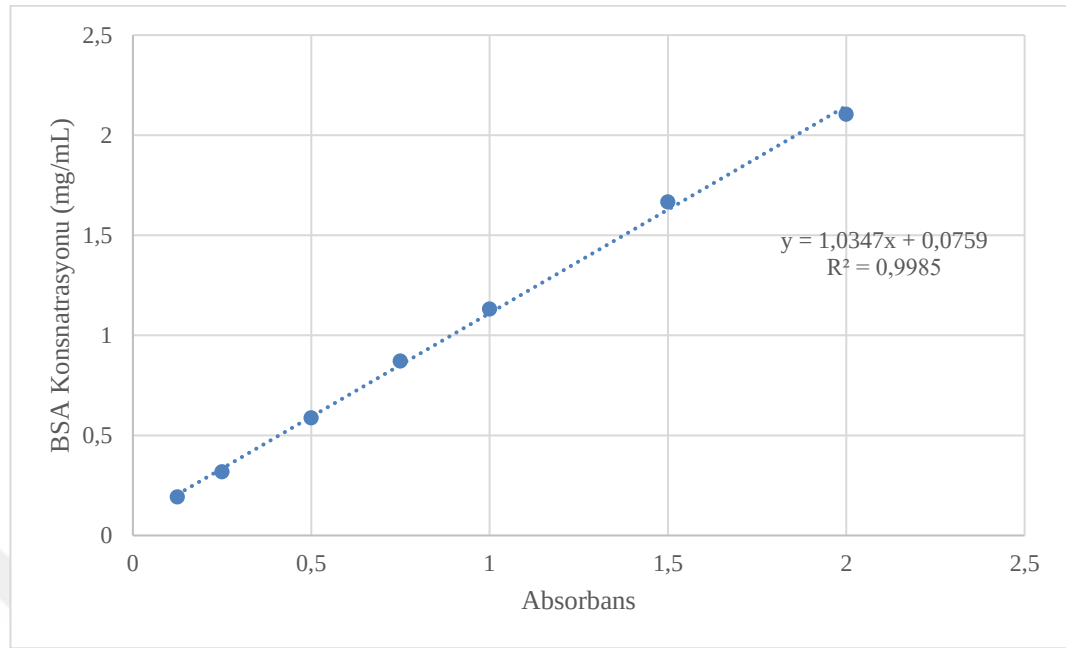


Şekil 3.2. *G. mellonella* son instar larva.

Besin bulunan cam petrilerin her birine, en az 12 larva yerleştirildi ve 24 ve 48 saat boyunca 18°C, 30°C ve 37°C'de inkübatörde muhafaza edildi. Süre sonunda kalan besin petriyelerden uzaklaştırıldı ve larvalar 2-3 saat daha ait oldukları sıcaklıklarda tutuldu. Benzer büyüklüklerde 6 larva seçilerek protein izolasyonu için kullanıldı (Şekil 3.3). Hazırlanan örneklerin protein konsantrasyonlarını belirlemekte BSA ile hazırlanan standart grafik kullanıldı (Şekil 3.4.)



Şekil 3.3. Değişen sıcaklıkların 24 ve 48 saat uygulandığı larvaların vücut ağırlıkları.



Şekil 3.4. BSA ile hazırlanan ve örneklerin protein konsantrasyonlarını belirlemekte kullanılan grafik.

Böcek integümentinde bulunan proteinlerin izolasyonu ve kirlilik olarak değerlendirilen diğer biyomoleküllerin uzaklaştırılması için TCA-aseton yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. TCA-aseton protokolü sonikasyonla desteklenip, izolasyon etkinliği artırıldı. Yürütülen çalışmada örnek sayısının etkisini belirlemek için bir normalizasyon yapılmadı. Ağırlık ve boy uzunluğu yakın/benzer 6 örnek kullanıldı. Larva vücut uzunluğunun ve ağırlığının gelişimsel süreçle ilişkili olduğu [58] bilindiğinden genellikle 2-2,5 cm boya ve 150-200 mg ağırlığa larvalar protein izolasyonunda kullanıldı (Şekil 3.3). Besin ve boşaltım ürünlerinin protein izolasyonu ve fokuslama üzerine olumsuz etkileri olabileceği ihtimaline karşı, larvalar işlemler öncesi kısa süreli besinsiz bırakıldı. Bu durumun larvalar için stres meydana getireceği ihtimali düşükte olsa göz ardı edilmemelidir.

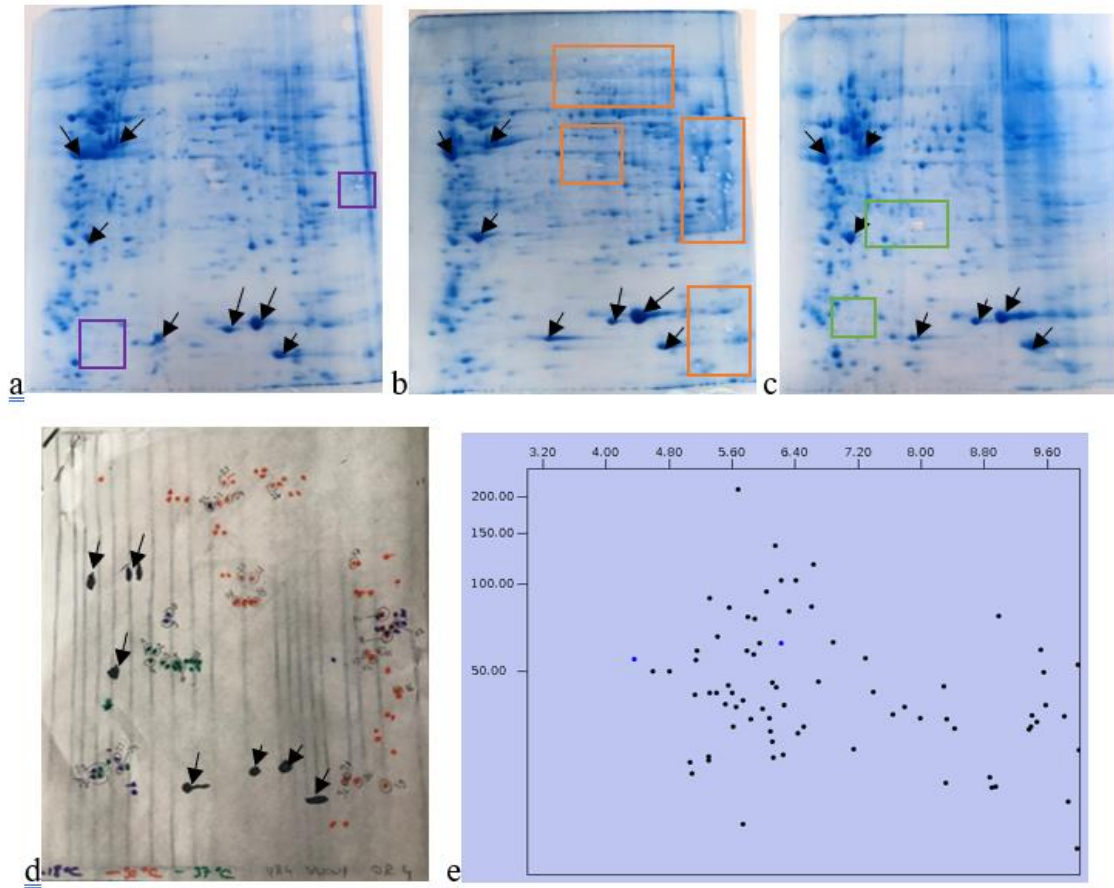
2D-PAGE ile ayrıştırılan proteinlerden ekspresyonu bol olanların, görece daha az ifade edilen proteinlerin izolasyonunu zorlaştırma veya jel üzerinde maskeleye ihtimali bulunur. Bu riski tamamen ortadan kaldırmak mümkün değilsede, çeşitli yöntemlerle protein çözünürlüğünü iyileştirmek mümkündür. Çalışmamızda larva proteinleri hemolenf ve vücut parçaları olarak basit şekilde fraksiyonlarına ayrıldı. Bu sayede kayıp veya maskeleye riskleri azaltılmaya çalışıldı. Hemolenf, böcek biyolojisinin protein düzeyinde anlaşılması için oldukça önemlidir. Özellikle hemolenf ile dokulara taşınan

düzenleyici proteinlerin tespiti açısından eşsiz bir kaynaktır. Çalışmamızda sıcaklık-süre etkisi ile hemolenf proteomunda meydana gelen değişimlerin tespiti amaçlandı ve hemolenf proteinleri ayrıca izole edildi. Protein karakterde bir böcek hormonu tanımlanan proteinler arasında yer almadı. Bu durum hemolenfte hormonların düşük titrelerde bulunması, genellikle düşük moleküler ağırlığa ve kısa ömre sahip olmaları sebebi ile izole edilemedikleri şeklinde yorumlandı.

3.2. Jel Görüntülerinin Karşılaştırılması ve Spot Kesiminin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde edilen jellerin değerlendirilmesi çıplak göz ile yapıldı. Çıplak göz ile yapılan jel değerlendirme işlemlerinde görüntü programlarının algoritma mantığı takip edildi. Yanlış/eksik değerlendirme riskini en aza indirmek için spot olduğundan emin olunan, sınırları belirgin ve ayırt edilebilen, intensitesi yüksek spotlar kullanıldı. Yalnızca ortaya çıkan ve/veya kaybolan spotlar için tespit, kesim ve tanımlama işlemleri yapıldı. Bir program olmaksızın spot intensitesine bağlı tespit ve değerlendirmede bulunmak risklidir. Bu sebeple spot intensitesinde değişim gösteren spotlar kesim ve tanımlanma işlemine dâhil edilmedi.

Değişimlerden etkilenen spotları belirlemek için 24 veya 48 saat süre ve 18°C, 30°C, 37°C sıcaklık uygulamalarına ait jeller (sırası ile Şekil 3.5a, Şekil 3.5b ve Şekil 3.5c) karşılaştırıldı. Uygulama sıcaklıklarının her biri için renk ataması yapıldı (18°C mor, 30°C turuncu ve 37°C yeşil ile gösterilmektedir). Kesilen tüm spotların jel yerleşimleri ve renk kodları birleştirilip temsili kesim jelleri oluşturuldu (Şekil 3.5.d). Karşılaştırma için oluşturulan diğer sanal jel JvirGel programı ile hazırlandı. Bu sanal jel için tanımlanan proteinlerin isim, M_a ve pI bilgileri kullanıldı (Şekil 3.5.e). Sanal jeller karşılaştırıldı ve bu sayede spotların kimliklendirilmesi mümkün oldu. Ayrıca renk kodlaması sayesinde hangi spotun hangi sıcaklık uygulamasına ait olduğu belirlendi. Mümkün olan en iyi ayırım sağlandı [59].

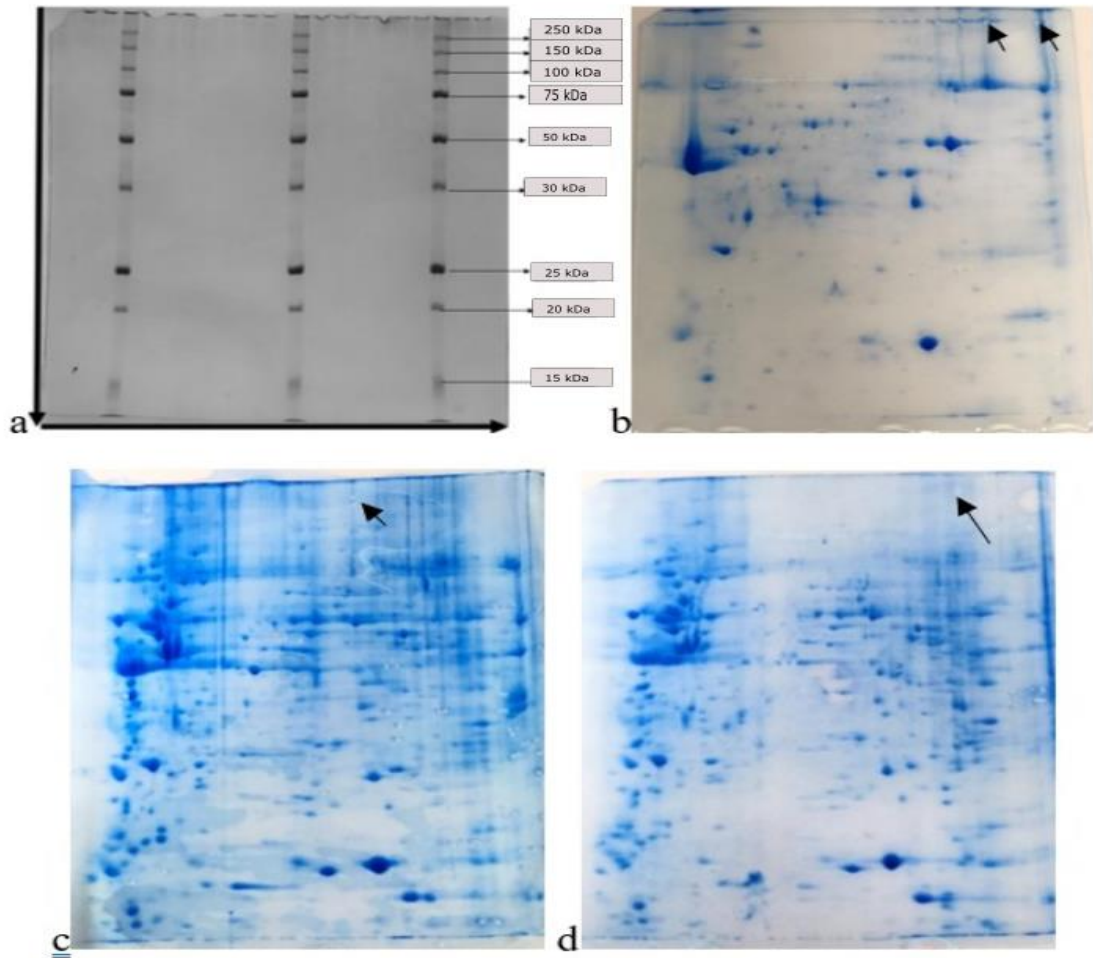


Şekil 3.5. *G. mellonella* 48 saat a) 18 °C, b) 30 °C ve c) 37 °C vücut örneklerine ait jeller. Oklar ortak, çerçeveler farklı proteinler, d) Kesilen tüm spotların kullanılması ile oluşturulan ikinci sanal jel, e) JvirGel ile oluşturulan ilk sanal jel.

3.3. MS Verilerinin İşlenmesine Ait Değerlendirme

2D-PAGE çalışmalarında bilindiği üzere proteinler iki basamakta ayrıştırılır ve ilk boyutta izoelektrik noktalarına göre ayırım yapılır. Çalışmamızda bu amaçla pH 3-10 aralığında ayırım gücüne sahip stripler kullanıldı. Bu aralık dışında kalan proteinler değerlendirme dışı tutuldu. İkinci boyutta ayırım proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre yapılır ve burada jel bileşiminde kullanılan akrilamit yüzdesi belirleyicidir. Çalışmamızda kullanılan %12,5'luk akrilamit jelin ayırabileceği moleküler ağırlık alt-üst limit değerleri standart protein (BioRad Kat no: 161-0363) kullanılarak belirlendi (Şekil 3.6a). Buna göre etkili bir ayırımın 250 kDa ve 10 kDa aralığında olduğu gözlemlendi. Tanımlanan proteinlerin işlenmesinde M_a 250 kD'dan büyük ve 10 kD'dan küçük olanlar değerlendirme dışı bırakıldı. Değerlendirmeye dâhil edilmeyen ve moleküler ağırlık açısından belirlenen üst limite yakın 7 protein tespit edildi (Şekil 3.6b,

c ve d). Bu proteinler ve UniProt ID şu şekildedir; A0A0L7LM90 arilforin-tip depo protein, A0A0N0PF16 düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ile ilgili 11 ligand-bağlayan tekrarlar, A0A0N0PAT0 maternal protein tudor, A0A194Q6Q7 3-okzoačil-[ačil-taşıyıcı protein] reduktaz, A0A194PKD7 yağ asiti sentaz, H9JUX9 VWFD domain-içeren protein, A0A0L7LPL6 miyozin ağır zincir, kas. Bu proteinlerin yağ asidi biyosentezinde ve endositoziste görev alan proteinler olduğu tespit edildi.



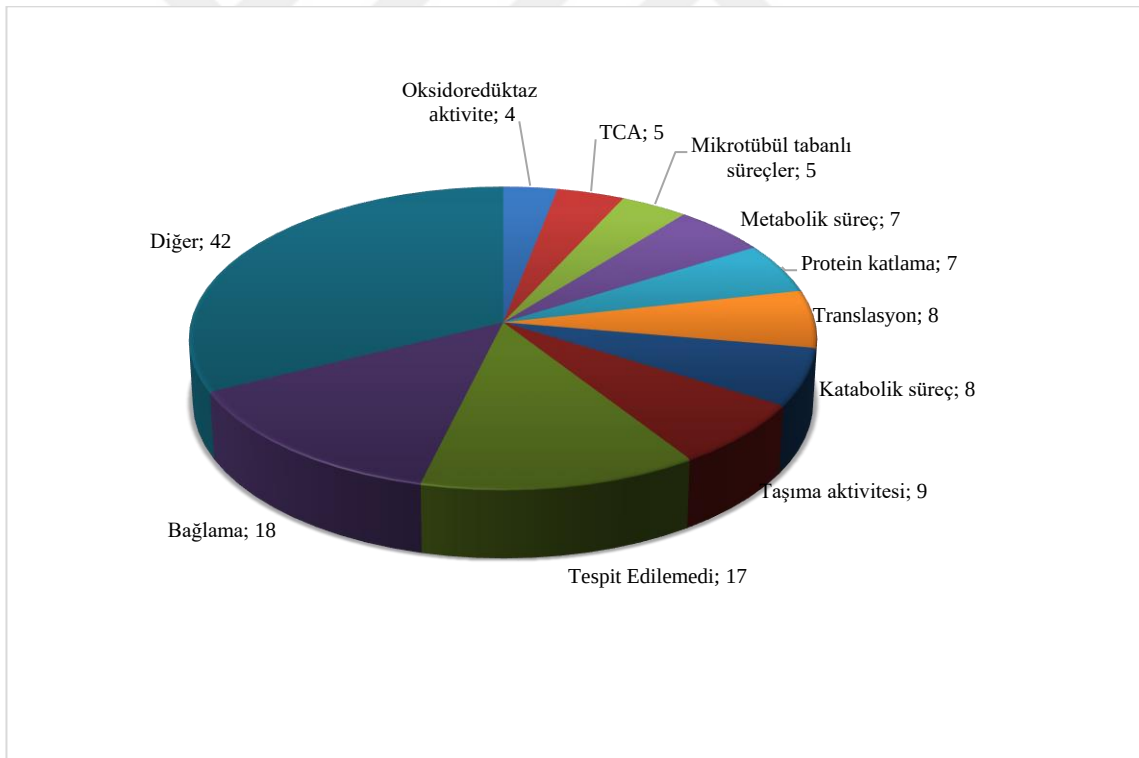
Şekil 3.6. %12,5 akrilamid jelde yürütülen a) standart protein marker ve *G. mellonella*'ya ait b) 24 saat 37 °C Hemolenf, c) 24 saat 37 °C Vücut dokuları, d) 48 saat 18 °C Vücut dokuları jellerinden kesilen proteinler.

3.4. Tanımlanan Proteinlerin Ontolojik Değerlendirilmesi ve Hücre İçi Yerleşimi

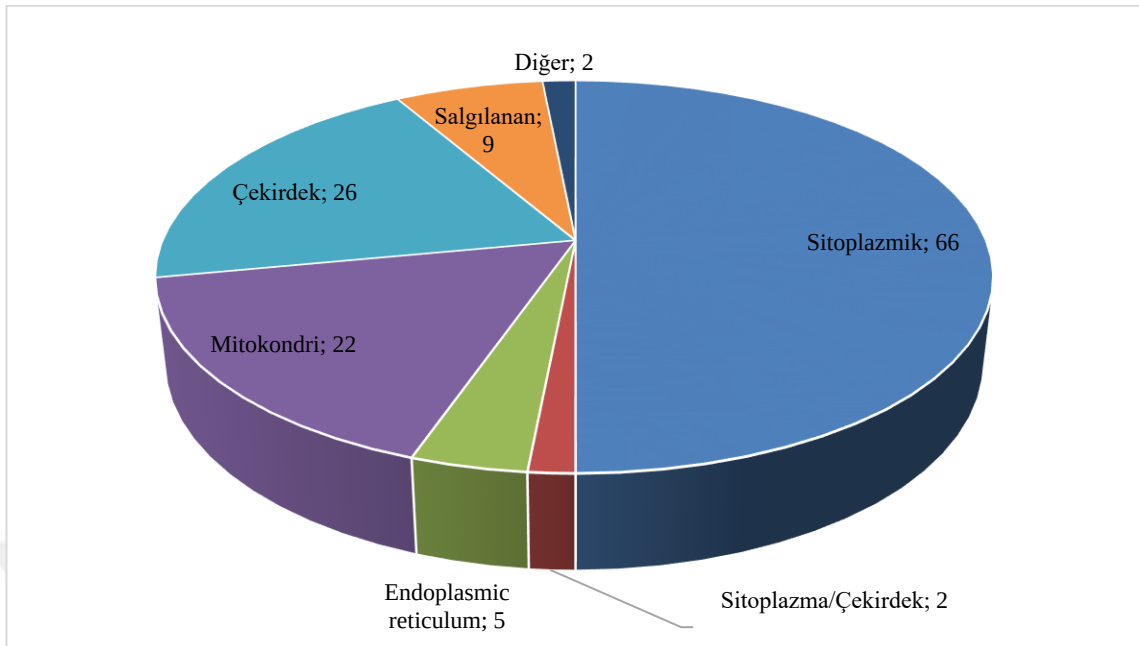
Yapılan karşılaştırmalar sonucunda LC-MS/MS ile tanımlanmak üzere toplamda 432 spot kesildi. Belirlenen parametrelere göre MS verileri işlendiğinde tanımlanan protein sayısı 254 oldu. Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruba ait tanımlanan protein sayısı 132 olarak belirlendi. Bu proteinler Ek 3.1'de listelenmiştir. Kırk sekiz saat grubu

için bu sayı 77 oldu (Ek 3.2). Kırk beş proteinin ise 24 ve 48 saat uygulamaları için ortak olduğu tespit edildi (Ek 3.3). Tanımlanan 254 proteinden 79'unun jeldeki yerleşimi belirlendi. Değişen sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruba ait 33 protein, 48 saat uygulandığı gruba ait 41 protein için uygulama sıcaklığı belirlendi. Beş proteinin 24 ve 48 saat sıcaklık uygulamaları için ortak olduğu gözlemlendi.

Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı örneklerle özgü 132 proteinin ontolojik değerlendirilmesi yapıldığında 18 proteinin “Bağlama”, 9 proteinin “Transfer” süreçleri ile ilişkili olduğu gözlemlendi. UniProt verilerine göre 17 protein için ontolojik kategorizasyon yapılamadı. Yirmi dört saat uygulamasına özgü tüm proteinler için ontolojik değerlendirme sonuçları Şekil 3.7’de gösterildi. Yüz otuz iki protein hücre içi yerleşimlerine göre kategorize edildiğinde; 66 proteinin sitoplazmada, 26 proteinin nüklear, 22 proteinin ise mitokondriyal olduğu görüldü (Şekil 3.8).

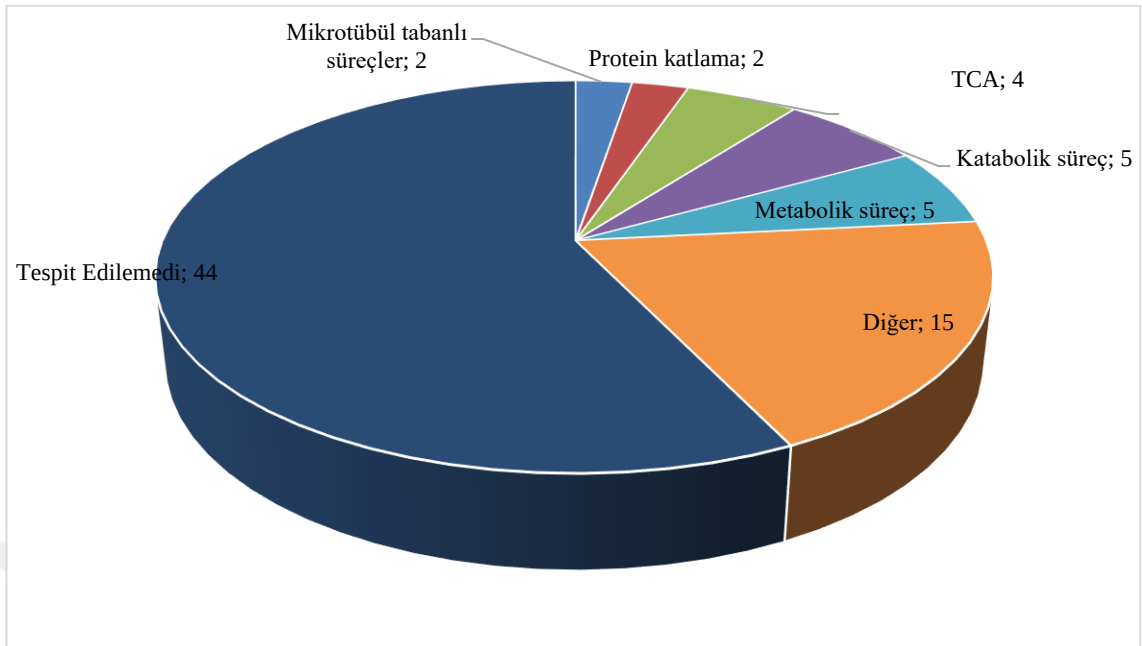


Şekil 3.7. Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruplara ait proteinlerin ontolojik kategorilere dağılımı.

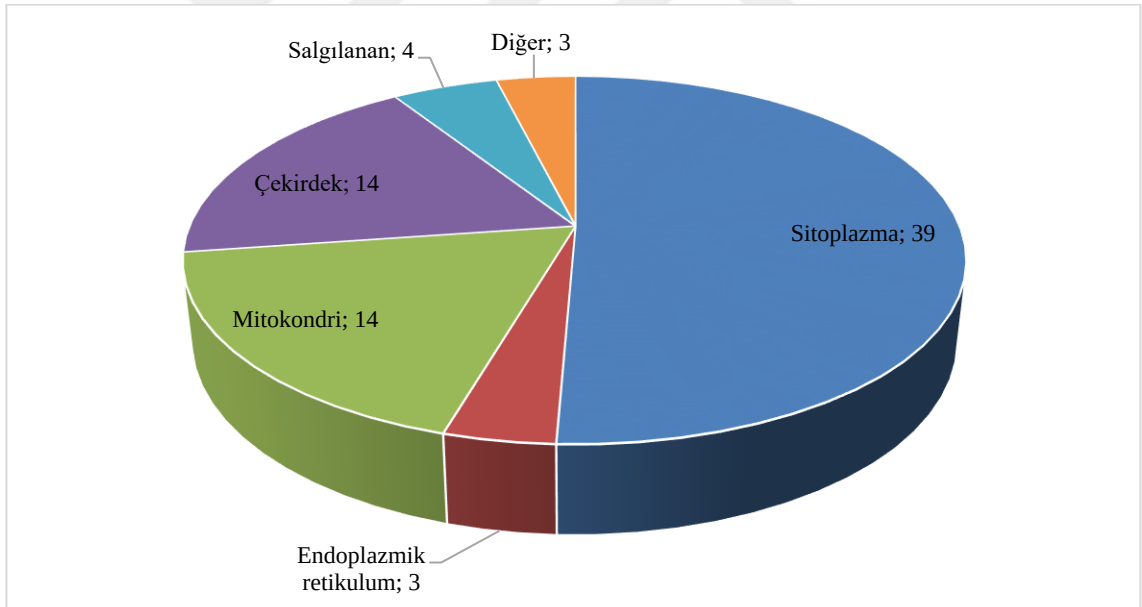


Şekil 3.8. Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruplara ait proteinlerin hücre içi lokasyonlara dağılımı.

Kırk sekiz saat uygulamalarına ait 77 protein için yapılan ontolojik değerlendirmede 44 protein herhangi bir kategoriye dâhil edilemezken, katabolik ve metabolik süreçlerde görevli 5'er protein belirlendi. Bu gruba ait tüm proteinlerin ontolojik değerlendirilmeleri Şekil 3.9'da hücre içi yerleşimleri ise Şekil 3.10'da gösterildi. Otuz dokuz proteinin sitoplazmik yerleşim gösterdiği 4 proteinin ise hücre dışına salındığı tespit edildi.

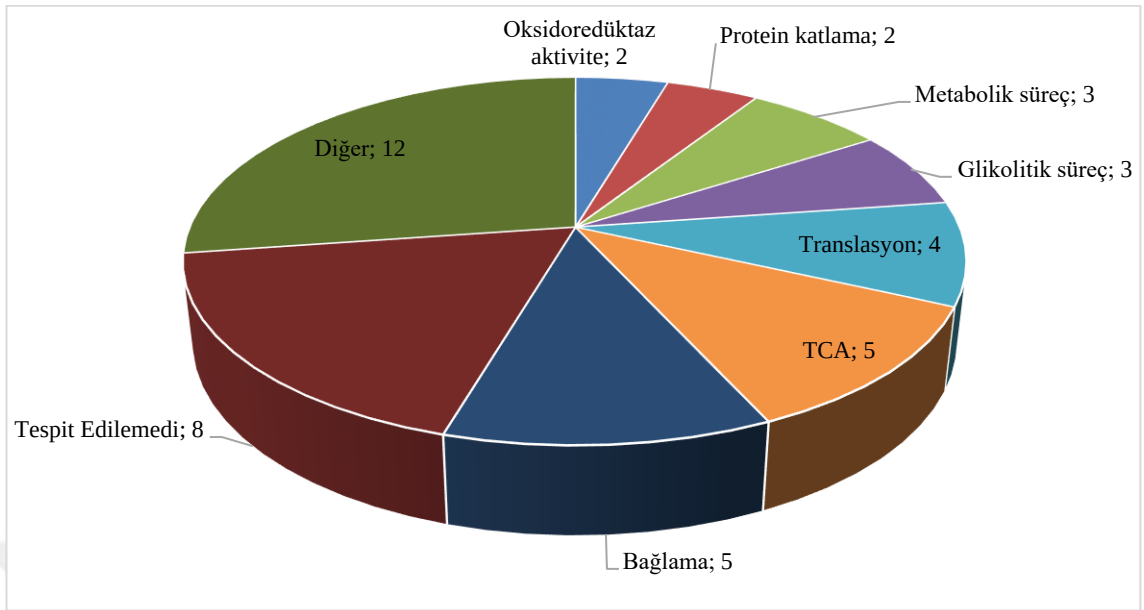


Şekil 3.9. Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı gruplara ait proteinlerin ontolojik kategorilere dağılımı.

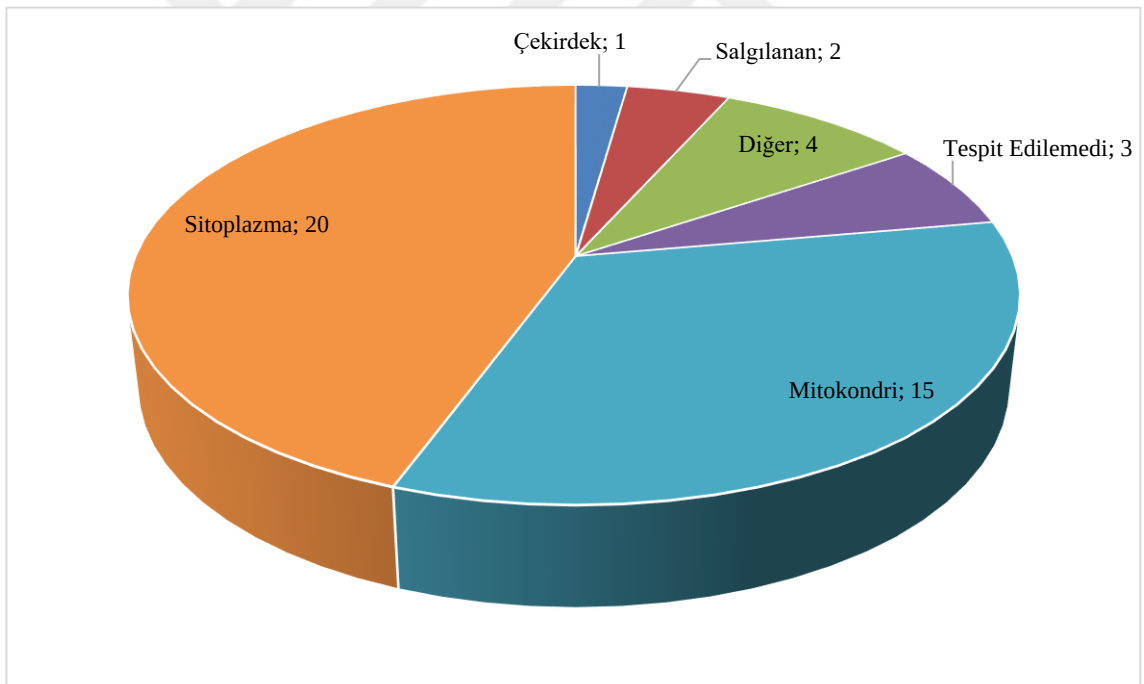


Şekil 3.10. Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı gruplara proteinlerin hücre içi lokasyonlara dağılımı.

Yirmi dört ve 48 saat uygulamalarında ortak proteinlerin değerlendirilmesinde bağlama ve TCA süreçlerinde görev alan 5'er protein bulunurken, yalnızca bir proteinin yer aldığı ontolojik kategoriler "Diğer" başlığı altında toplandı. Proteinlerin yer aldığı tüm kategoriler Şekil 3.11'de gösterildi. Yine bu grup proteinlerin hücre içi yerleşimleri değerlendirildiğinde 20 proteinin sitoplazma, 15 proteinin ise mitokondride yerleştiği tespit edildi (Şekil 3.12).



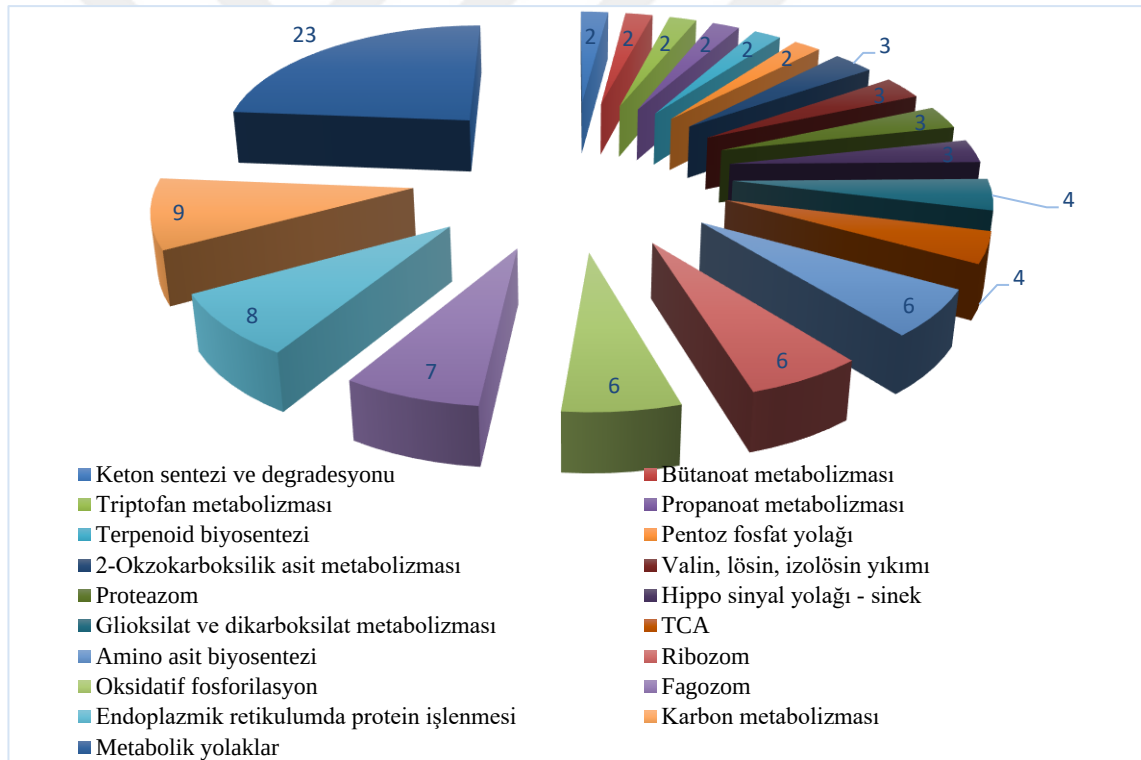
Şekil 3.11. Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları ortak proteinlerin ontolojik kategorilere dağılımı.



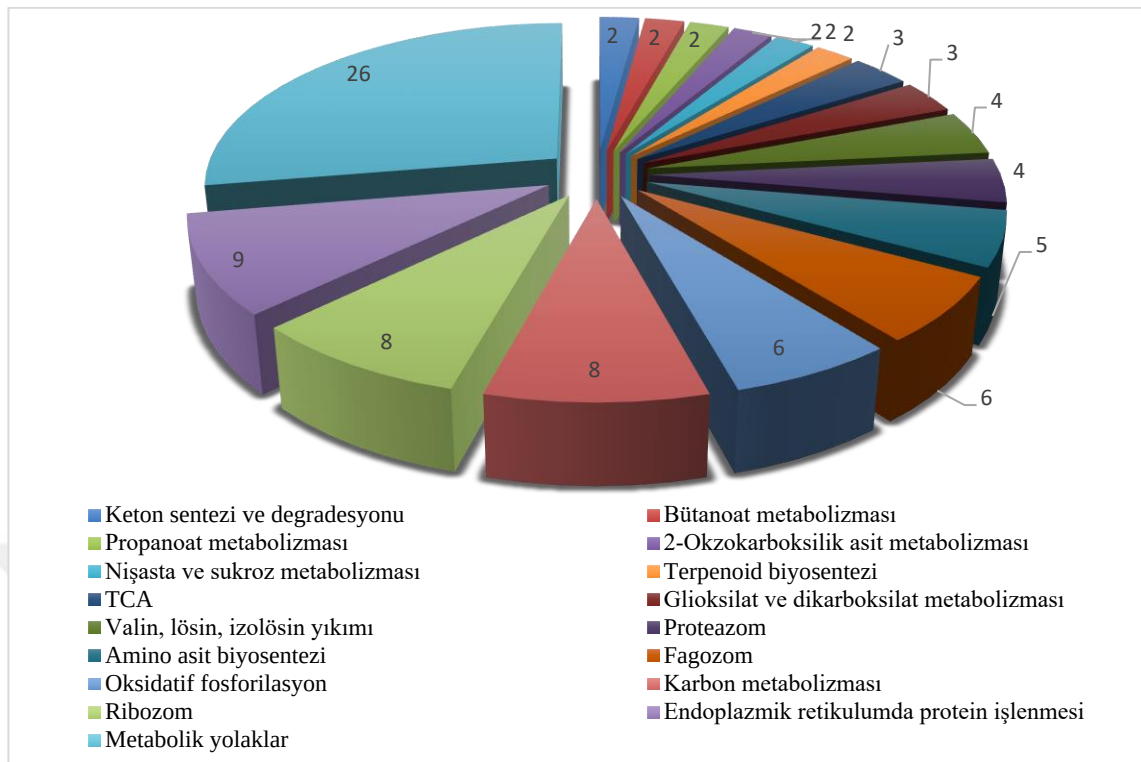
Şekil 3.12. Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları ortak proteinlerin hücre içi lokasyonlara dağılımı.

Çalışmada tanımlanan proteinler için yolak tespiti yapılamadı. Bu amaçla model organizmalar üzerinden tespit yapılmaya çalışıldı. Genom dizileme ve anotasyon çalışmalarının tamamlanması ve ayrıca geniş biyoinformatik ağa sahip oldukları düşünülen *D. melanogaster* ve *B. mori* tercih edildi. Tanımlanan proteinlerin UniProt ID'leri ile Blast yapıldı. Amino asit dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* ve *B. mori*

proteinleri tespit edildi [60]. Dizi benzerliği alt sınır değeri %50 olarak belirlendi. Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruba özgü proteinlere dizi benzerliği gösteren 104 *D. melanogaster* ve 114 *B. mori* proteini tespit edildi. *D. melanogaster* proteinlerine ait yolak dağılımı Ek 3.4'te, *B. mori*'ye ait proteinlerin yolak dağılımı ise Ek 3.5'te gösterildi. Şekil 3.13'te görüldüğü üzere *D. melanogaster* proteinleri 19 yolakta dağılım gösterdi. En çok sayıda protein fagozom (7), endoplazmik retikulumda gerçekleşen protein süreçleri (8) ve karbon metabolizması (9) kategorilerine yerleşti. *B. mori* proteinleri için değerlendirme yapıldığında; ribozom (8), karbon metabolizması (8) ve endoplazmik retikulumda gerçekleşen protein süreçlerine (9) dağılım gözlendi (Şekil 3.14). Karbon metabolizması ve endoplazmik retikulumda gerçekleşen protein süreçlerinin her iki organizmada ortak olduğu görüldü.

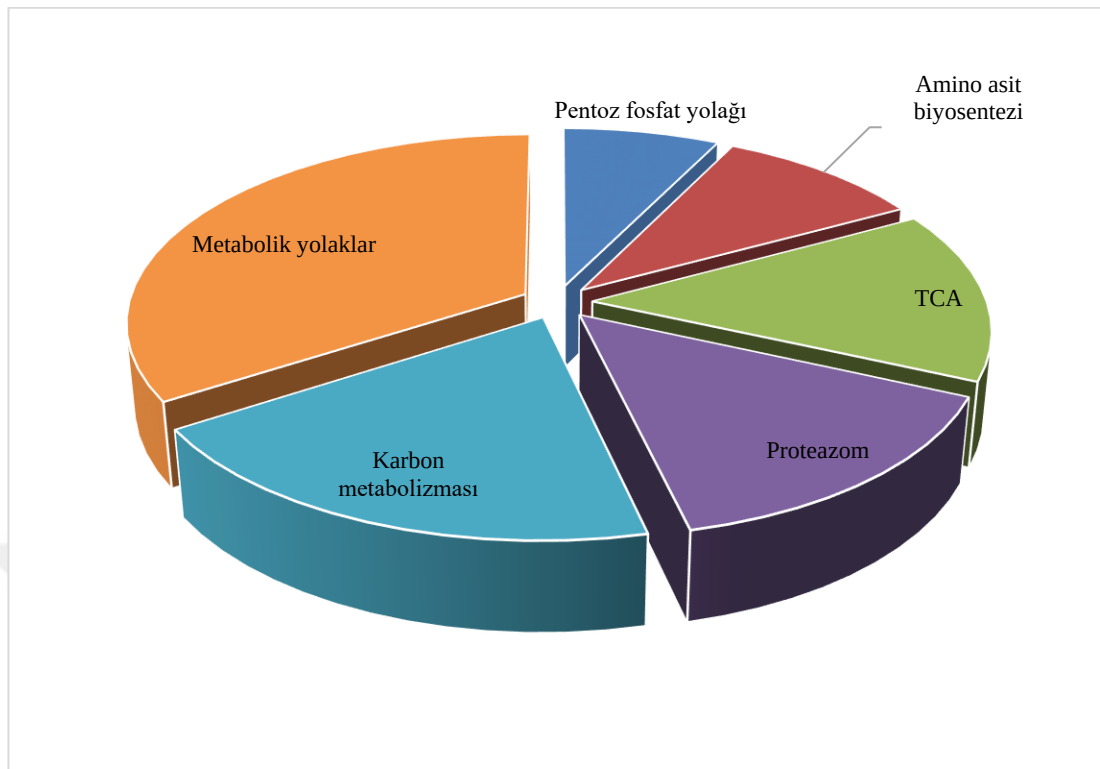


Şekil 3.13. Farklı sıcaklıklar-24 saat uygulama grubuna ait *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinlerinin yolak dağılımı.

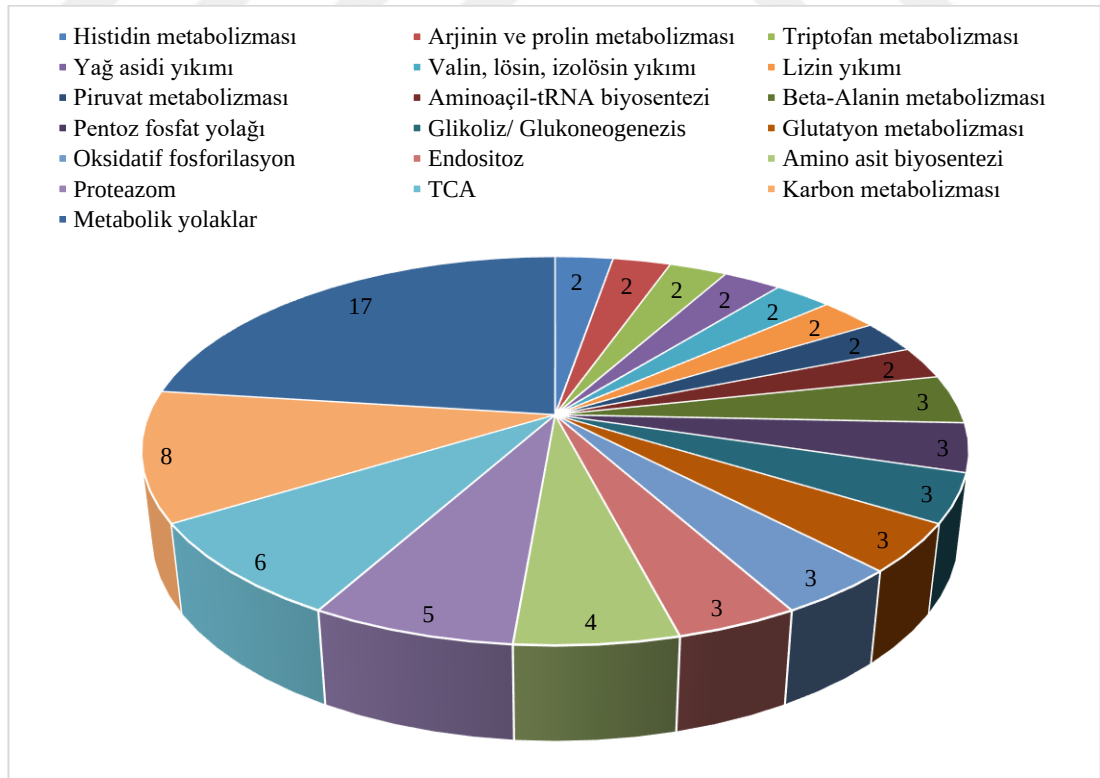


Şekil 3.14. Farklı sıcaklıklar-24 saat uygulama grubuna ait *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinlerinin yolak dağılımı.

Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı gruba őzgő proteinlere dizi benzerliği gösteren 62 *D. melanogaster*, 71 *B. mori* proteini tespit edildi. *D. melanogaster*'e ait proteinlerin yolak dağılımı Ek 3.6'da, *B. mori* proteinleri için ise Ek 3.7'de gösterildi. Şekil 3.15 görőldőđü üzere *D. melanogaster* proteinleri 6 yolakta dağılım gösterdi. En çok sayıda protein sitrat dőğüsü (6), proteasome (6) ve karbon metabolizması (8) kategorilerine yerleşti. *B. mori* proteinleri de benzer şekilde sitrat dőğüsü (6), proteasome (5) ve karbon metabolizmasına (8) yerleşim gösterdi (Şekil 3.16). Üç yolağında her iki organizma için ortak olduğu görőldü.

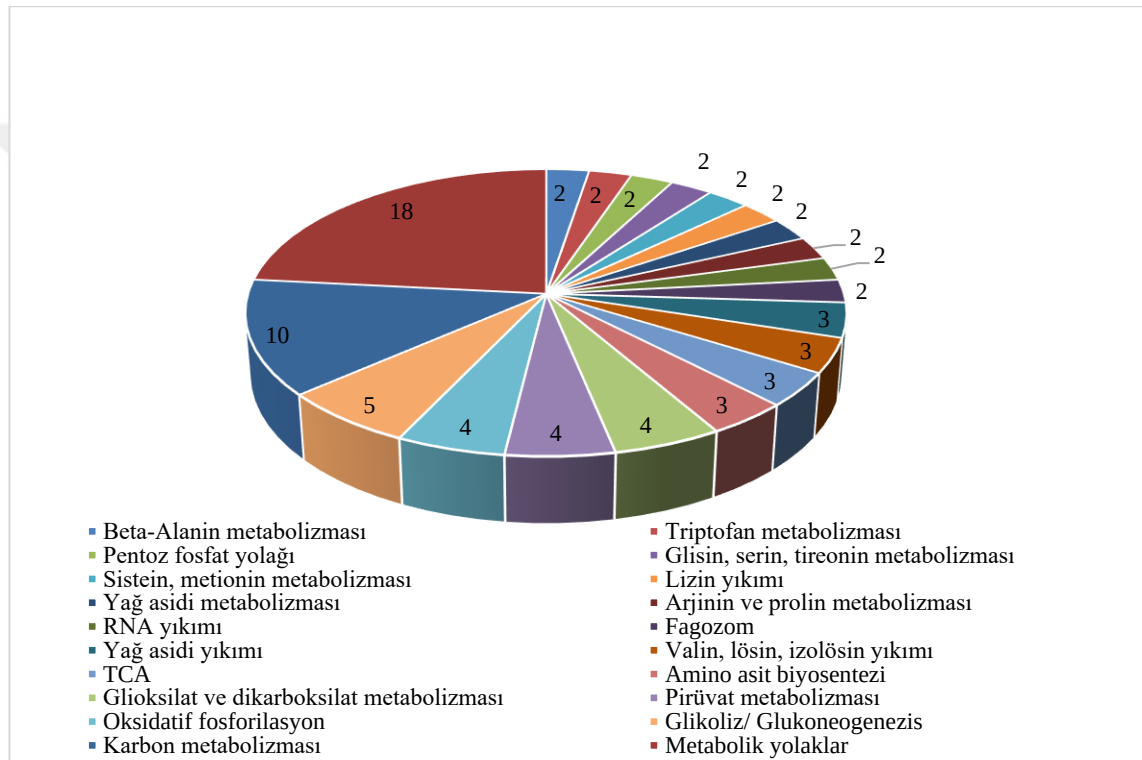


Şekil 3.15. Farklı sıcaklıklar-48 saat uygulama grubuna ait *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinlerinin yolak dağılımı.

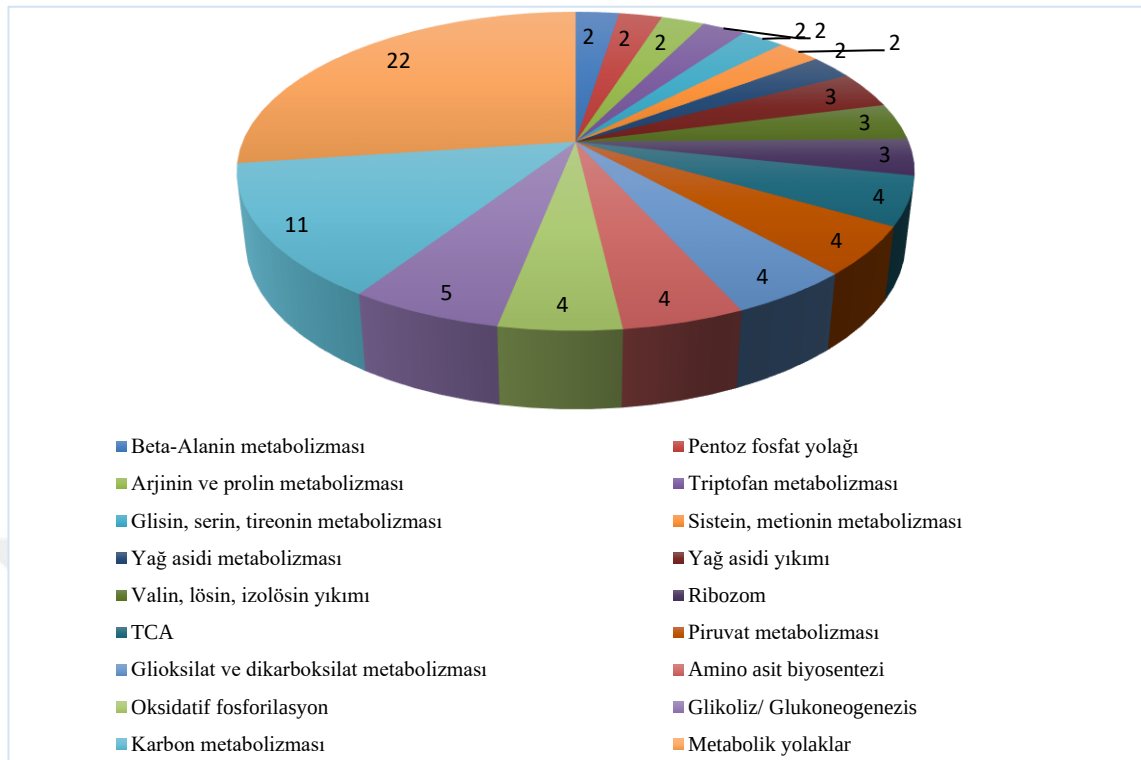


Şekil 3.16. Farklı sıcaklıklar-48 saat uygulama grubuna ait *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinlerinin yollara dağılımı.

Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları için ortak proteinleri için *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren 38 *D. melanogaster*, 41 *B. mori* proteini tespit edildi. 38 proteinden 18'nin birden fazla yolakta görev aldığı görüldü. Benzerlik gösteren *D. melanogaster* proteinleri için 20 farklı yolak tayin edildi (Ek 3.8). *B. mori* için 26 proteinin 18 yolakta dağılım gösterdiği belirlendi (Ek 3.9). Her iki organizma için ortak yolaklar arasında oksidatif fosforilasyon, glikoliz/glukoneogenezis ve karbon metabolizması yer aldı (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18).



Şekil 3.17. Yirmi dört ve 48 saat uygulama grubuna ait *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinlerinin yolak dağılımı.



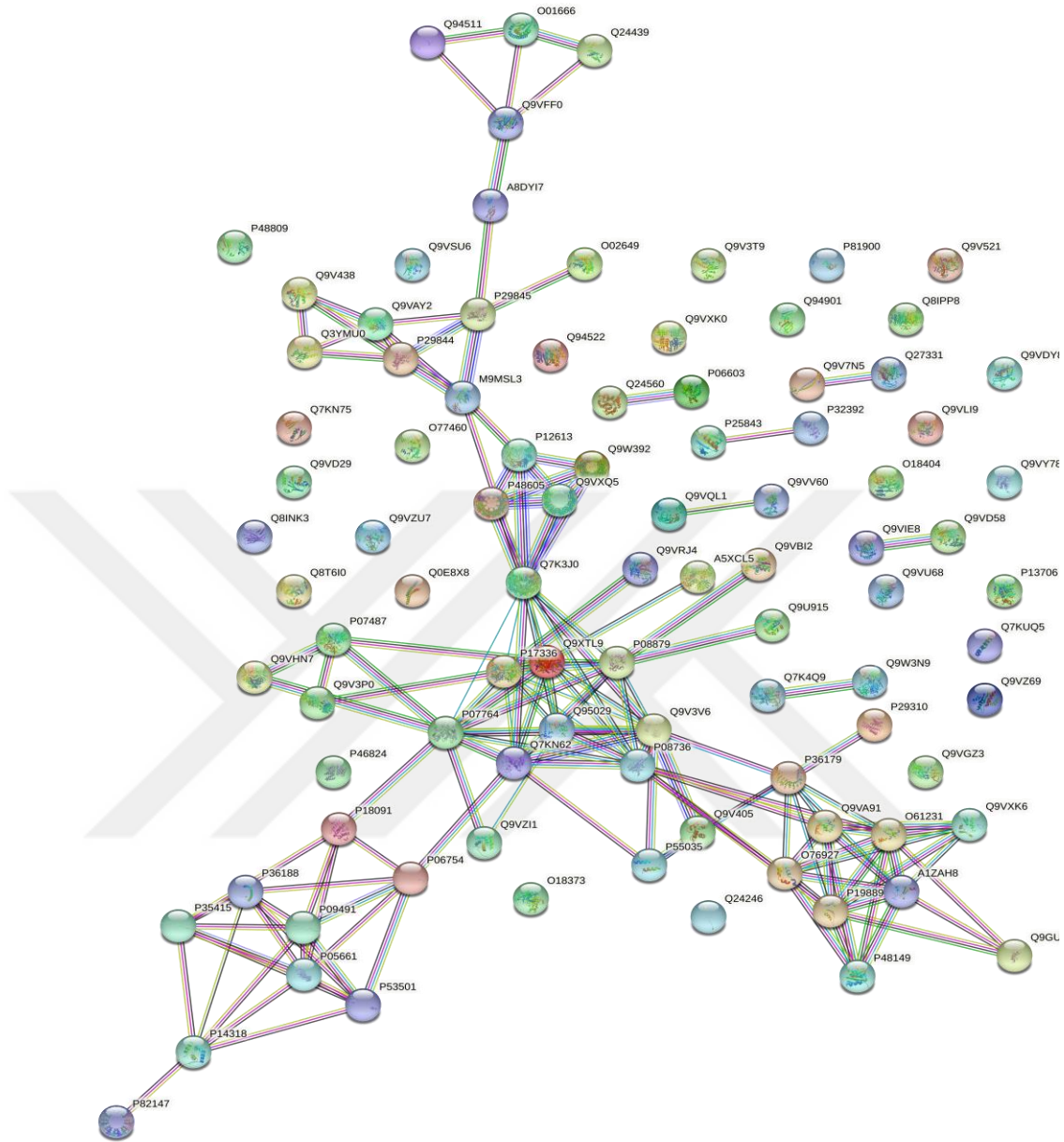
Şekil 3.18. Yirmi dört ve 48 saat uygulama grubuna ait *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinlerinin yolak dağılımı.

3.5. Proteinler Arası Etkileşimlerin İncelenmesi

Proteinler arası etkileşimlerin tespiti için STRING kullanıldı. İlgili veri tabanına ait organizma listesinde protein tanımlamada kullanılan organizmalardan yalnızca *B. mori* yer almaktadır. Diptera üyesi *D. melanogaster* ise protein etkileşimlerinin fiziksel ve fonksiyonel açıdan desteklenmesi amacı ile kullanılmıştır.

3.5.1. *G. mellonella* Proteinlerine Dizi Denzerliği Gösteren Proteinlerin Etkileşimi-24 Saat

G. mellonella proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* ve *B. mori* proteinlerine ait etkileşim ağları sırasıyla Şekil 3.19 ve Şekil 3.20’de gösterildi.



Şekil 3.19. Farklı sıcaklıkların 24 saat uygulandığı grup *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinleri etkileşim ağı.

Dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinleri için elde edilen etkileşim haritaları değerlendirildi ve birçok protein kümesi gözlemlendi (Şekil 3.19). Birinci kümede yer alan tüm proteinlerin mitokondride yerleşik olduğu belirlendi. İşlenmek üzere mitokondriye gelen proteinler için metalloendopeptidaz aktivitesi gösteren GH01077p (Q9VFF0) proteini kontrolünde; ATP sentaz alt ünite O (Q24439), ATP sentaz alt ünite gama (O01666) ve NADH-ubiquinon oksidoredüktaz 75 kDa alt ünite (Q94511) bu kümede yer aldı. İkinci kümede yer alan tüm proteinlerin protein katlanma süreçlerinde görevli olduğu görüldü. Bu proteinler sırası ile endoplazmik retikulum şaperon BiP

(P29844), protein disülfid-izomeraz (Q3YMU0), protein disülfid-izomeraz A6 homolog (Q9V438), HSP 82 (Q9VAY2) ve ısı şoku protein 60A (O02649) olarak belirlendi. P29844, Q3YMU0 ve Q9V438 nolu proteinlerin endoplazmik retikulumda, O02649 nolu proteinin mitokondride ve Q9VAY2 nolu proteinin ise sitoplazmada yer aldığı görüldü. Birinci ve ikinci protein kümelerinin prohibitin (A8DYI6) ve 70 kDa'luk ısı şoku protein benzeri 5 (P29845) üzerinden iletişim halinde olduğu değerlendirildi. P29845 mitokondri otofajisi ve morfogenezi ile katlanmayan proteinlerin düzenlenmesi gibi birçok süreçte etkin rol alan bir proteindir. A8DYI6 ise mitokondrinin organizasyonunda görevlidir. İki protein kümesi arasındaki etkileşime bakıldığında endoplazmik retikulum, sitoplazma ve mitokondri arasındaki katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerle ilgili protein trafiğini işaret edebileceği değerlendirildi. Üçüncü protein kümesinin şaperonin içeren TCP1 alt ünite 6 (Q9VXQ5), T-kompleks protein 1 gama alt ünitesi (P48605), CCT-beta (Q9W392) ve T-kompleks protein 1 alfa alt ünitesi (P12613) gibi proteinlerden oluştuğu görüldü. Üçüncü protein kümesinin tüm elemanları katlanmayan proteinlerin bağlanmasında rol alan sitoplazmik proteinler olduğu belirlendi. İkinci ve üçüncü küme proteinlerinin Hsc70Cb, izoform G (M9MSL3) ile bağlantı kurdukları görüldü. M9MSL3'ün ısı şokuna karşı cevap oluşturma yollarında görev alan hem sitoplazmada hem çekirdekte yerleşim gösteren bir protein olduğu belirlendi. Dördüncü protein kümesinde 26S proteozom düzenleyici kompleks p50 alt ünitesi (Q9V3V6), elongasyon faktörü alfa -1 (P08736), katepsin L (Q95029), transisyonel endoplazmik retikulum ATPase TER94 (Q7KN62), fruktoz-bisfosfat aldolaz (P07764), nükleozit difosfat kinaz (P08879) ve katalaz (P17336) proteinlerinin yer aldığı belirlendi. Q9V3V6 ve Q7KN62 proteinlerinin çekirdek ve sitoplazmada, Q95029'un lizozomda, P17336'nın peroksizomda yer aldığı belirlendi. P08879, P07764 ve P08736 proteinlerinin sitoplazmik proteinler olduğu anlaşıldı. Dördüncü küme elemanlarının birbirleri ve diğer kümelerle yoğun etkileşim halinde olduğu gözlemlendi. UniProt ile yapılan analiz sonrasında dördüncü küme elemanlarının görev aldıkları biyolojik süreçler doğrulandı. Dördüncü grupta bulunan diğer proteinler için ortak bir biyolojik kategori tespit edilemedi, ancak farklı proteinlerle iş birliği içinde düzenleyici rol oynayabilecekleri düşünüldü. Dördüncü grup proteinler arasından P17336 ile etkileşim halinde olan, peroksizomda yerleşik SD02021p (Q9VRJ4) peroksizoma protein taşımada görev alır. Dördüncü küme elemanlarından yalnızca glikojen fosforilaz (Q9XTL9) ile etkileşim halinde bulunan UTP-glukoz-1-fosfat

uridiltransferaz (A5XCL5) proteinin sitoplazmik protein olduğu tespit edildi. Glikojen fosforilazın rol aldığı reaksiyonun ürünü olan D-glukoz 1-fosfat, UTP-glukoz-1-fosfat uridil transferaz enzimi tarafından UDP-glukoza dönüştürülür. UDP- glukoz, glukojen üretiminde önemli öncü moleküllerden biridir. Bu durum protein katabolik süreçleri ile glikojen üretimi arasında muhtemel bir bağlantı olarak yorumlandı. Dördüncü kümede yer alan P08879 ile adenilat kinaz (Q9U915) ve UMP-CMP kinaz (Q9VBI2) proteinleri arasında etkileşim gözlemlendi. Katalitik aktivite gösteren bu üç proteinin DNA ve RNA sentezi için muhtemel iş birliği olarak değerlendirildi.

Beşinci kümede gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz 2 (P07487), LP07963p (Q9VHN7) ve peroksiredoksin 1 (Q9V3P0) proteinlerinin yer aldıkları gözlemlendi. Beşinci kümenin dördüncü kümedeki P07764 ile bağlantılı olduğu tespit edildi. Bu P07764'ün gelişim evresine ve dokuya özgü şeker-fosfat metabolizmalarında yer alması dikkate değer bulundu. Kromatin susturmada görev alan Q9VHN7'nin hem P07487 hem de P07764 ile etkileşimi muhtemel gen düzenlemeleri olarak yorumlandı.

Altıncı protein küme elemanlarından P82147 hariç tamamı kas proteinlerinden meydana geldi. Bu kümenin elemanlarının letal (2) yaşam için hayati protein (P82147), kasa özgü protein 20 (P14318), aktin-57B (P53501), ağır zincirli kas miyozini (P05661), uzun şekilli paramiyozin (P35415), tropomiyozin-2 (P09491), troponin I (P36188), tropomiyozin-1 izoform 9A/A/B (P06754), sarkomerik alfa aktinin (P18091) oldukları belirlendi. P82147'nin ise organizmanın gelişimsel ve strese tepki süreçlerinde rol aldığı gözlemlendi.

Son olarak yedinci kümede ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 5A (Q9GU68), 40S ribozomal protein S15Aa (P48149), 40S ribozomal protein S15 (Q7JZW2), ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 5 (Q9VXK6), 60S asidik ribozomal protein P0 (P19889), 60S ribozomal protein L10 (O61231), 40S ribozomal protein S21 (O76927) ve 40S ribozomal protein S7 (Q9VA91) olmak üzere toplam 8 protein tespit edildi. Grup üyesi proteinlerin; protein metabolizması, hücresel organizasyon, biyogenez ve gen ifadesinde görev aldığı belirlendi. Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 5'in ayrıca strese tepkide rol aldığı dikkate değer bulundu. Yedinci küme elemanları ile 4. küme elemanları arasında bağlantı sağlayan 3 protein gözlemlendi. Bu proteinler serin/treonin-protein fosfataz PP2A 65 kDa düzenleyici alt ünite (P36179), 26S proteazom düzenleyici

kompleks alt ünite p48A (Q9V405) ve 26S proteazom ATPase olmayan düzenleyici alt ünite 4 (P55035) proteinleridir. Bunların proteazom aracılı ubiquitin bağımlı protein katabolik süreçlerinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinler oldukları görüldü. Nükleoplazmada yer alan P36179 gelişimsel süreçte dokuya özgü ifade edilen bir proteindir.

Dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinleri için etkileşim haritası incelendiğinde 5 büyük protein kümesi görüldü (Şekil 3.20). Birinci küme elemanı proteinlerin sitoplazmik olduğu tespit edildi. Bu kümede yer alan proteinlerin protein katlanma süreçlerinde ile ilgili şaperonin alt ünite 6a zeta (Q2F6C3), CCT-beta (Q2F6C2), T-kompleks protein 1 alt ünite gama (H9IVX5) ve CCT-alfa (H9J9S0) proteinleri olduğu görüldü. İkinci grup üyeleri uncharacterized protein (H9IVD8), TPR_REGION domain-içeren protein (H9JM43), uncharacterized protein (H9JCV2), ısı şoku proteini 70-3 (F8UN44), uncharacterized protein (H9J250), uncharacterized protein (H9JT91) ve protein disülfid-izomeras (H9IZ84) olarak belirlendi. İki proteinin endoplazmik retikulumda yer alması (H9IZ84 ve F8UN44) diğerlerinin sitoplazmada bulunması, ayrıca uncharacterized proteinlerin ısı şoku proteinlerine sekans benzerliği göstermesi protein katlanması ile alakalı süreçleri akla getirdi. Üçüncü grup transgelin (Q1HPM4), miyozin kuyruk 1 domaini içeren protein (H9ITN2), tropomiyozin-1 (Q1HPU0), uncharacterized protein (H9IUV1), uncharacterized protein (H9IUV0) proteinlerinden meydana geldi. Grup üyesi tüm proteinlerin kasılma mekanizması ile ilgili olduğu belirlendi.

Dördüncü ve en yoğun etkileşim ağının bulunduğu grupta uzama faktörü 1-alfa (P29520), 40S ribozomal protein S21 (Q6PUF8), 40S ribozomal protein S7 (H9J4B7), ribozomal protein S3 (Q5UAP2), 40S ribozomal protein S15 (Q66SV9), ribozomal protein S15A (Q5UAM7), ribozomal protein S5 (Q5UAN9), 60S asidik ribozomal protein P0 (Q5UAU1), ribozomal protein L10 (Q5UAT0), ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 5A (Q4F863) proteinleri yer aldı. Grup proteinlerinin ribozom bileşenleri ve translasyon süreçlerinden sorumlu proteinler oldukları belirlendi.

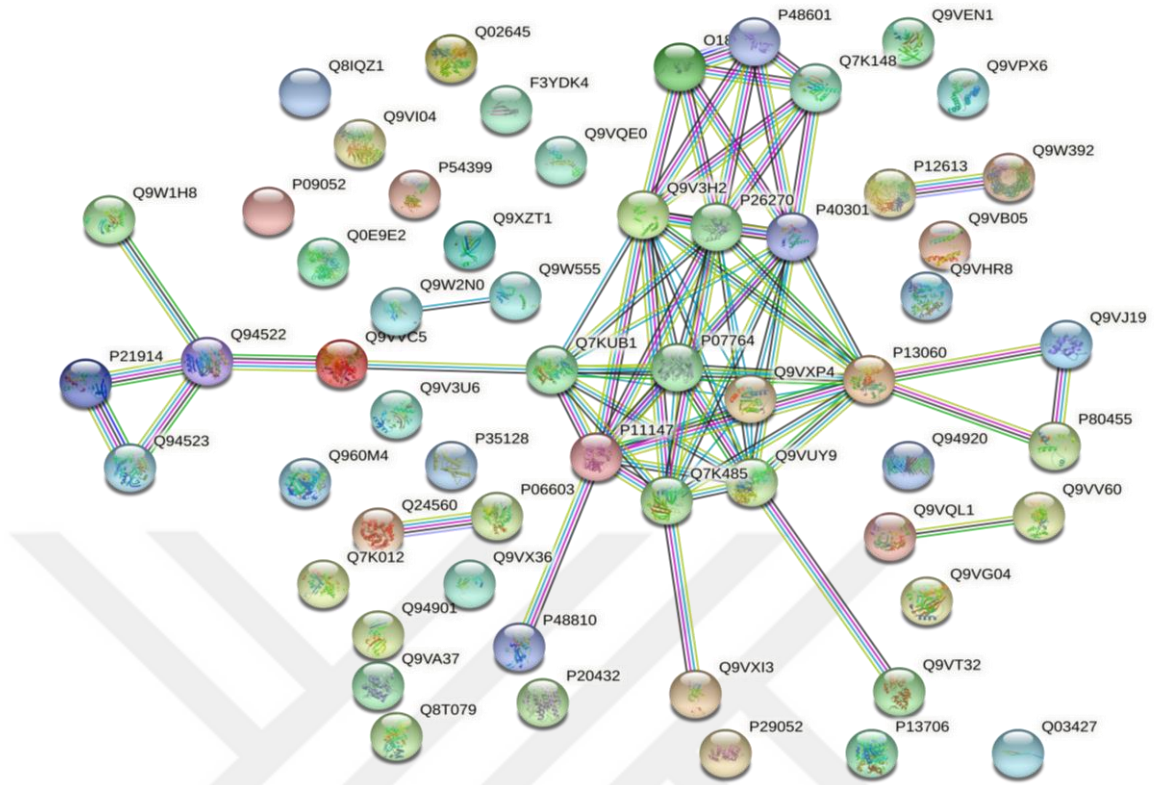
Beşinci grup üyeleri adenilat kinaz (D2Y062), nükleozit difosfat kinaz (H9JDV4) ve UMP-CMP kinaz (H9J3S9) oldu. Bu proteinlerin yeni DNA ve RNA sentezinde rol oynayan proteinler olduğu belirlendi.

Altıncı grup 26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 4 (Q2F5X3), AAA domaini içeren protein (H9J5J2), proteazom endopeptidaz kompleks (H9J1E8), 26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 2 (H9J723), vezikül birleştirici ATPaz (H9J398) proteinlerinden oluştu. AAA domain içeren protein (çekirdek ve sitoplazma) hariç diğer proteinlerin proteazom bileşenleri olduğu tespit edildi.

B. mori'ye ait son interaksiyon kümesinde gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (Q1EPM0), fruktoz-bifosfat aldolaz (Q1HPN7) ve uncharacterized protein (H9JXE5) yer aldı. Uncharacterized protein'in domain bakımından transketolase ailesine benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu grup üyelerinin glikoliz ve karbohidrat yıkımında görevli enzimler olduğu görüldü. *D. melanogaster* ve *B. mori* interaksiyon haritaları grupların nitelikleri açısından benzer bulundu.

(P07764), izositrat dehidrogenaz [NADP] (B7Z0E0) proteazom alt ünite alfa tip-2 (P40301), 26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 7 (P26270), 26S ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 14 (Q9V3H2), proteazom alt ünite beta (Q7K148), 26S proteazom düzenleyici alt ünite 4 (P48601), 26S proteazom düzenleyici alt ünite 8 (O18413). Grupta yer alan birçok proteinin proteozom bileşenleri olması, apoptoziste görevli protein katepsin D'nin varlığı protein degradasyon süreçlerine işaret etmektedir. Enerji metabolizmasında görevli fosfoglukomutaz, fruktoz-bifosfat aldolaz ve izositrat dehidrogenaz [NADP] ile lipolitik enzim ailesinin bir üyesi olan platelet-activating factor acetylhydrolase IB alt ünite beta homolog'un etkileşim halinde olduğu görüldü. Ayrıca oksidatif strese geliştirilen cevapta etkin protein olan izositrat dehidrogenaz [NADP]'ın varlığı dikkate değer bulundu. Birinci grup proteinlerinin izositrat dehidrogenaz [NADP] üzerinden ikinci grup ile etkileşim içinde olduğu görüldü.

İkinci grup protein üyeleri; süksinat dehidrogenaz [ubikuinon] flavoprotein alt ünite mitokondriyal (Q94523), süksinat dehidrogenaz [ubikuinon] demir-sülfür alt ünite mitokondriyal (P21914), GH13256p (Q9W1H8), süksinat--KoA ligaz [ADP/GDP-üreten] alt ünite alfa, mitokondriyal (Q94522) ve okzogluterat dehidrogenaz (süksinil-taşıyan) (A8JNU6) oldu. Mitokondride yerleşik bu proteinlerin TCA'da görev aldığı bilinmektedir. GH13256p ise yağların beta oksidasyonunda görevli bir proteindir. Enerji ile ilgili proteinlerin tespiti enerji ihtiyacının fazlalığı şeklinde yorumlandı. Birinci grup üyesi platelet-activating factor acetylhydrolase IB alt ünite beta homolog (Q9VXP4) ile GH13256p etkileşimi enerji ihtiyacının yağlar üzerinden de sağlandığı şeklinde yorumlandı. Ayrıca GH13256p'nin ergin dönem canlılık ve yaşam sürenin kontrolünde görev alması dikkate değer bulundu.



Şekil 3.21. Farklı sıcaklıkların 48 saat uygulandığı grup *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinleri etkileşim ağı.

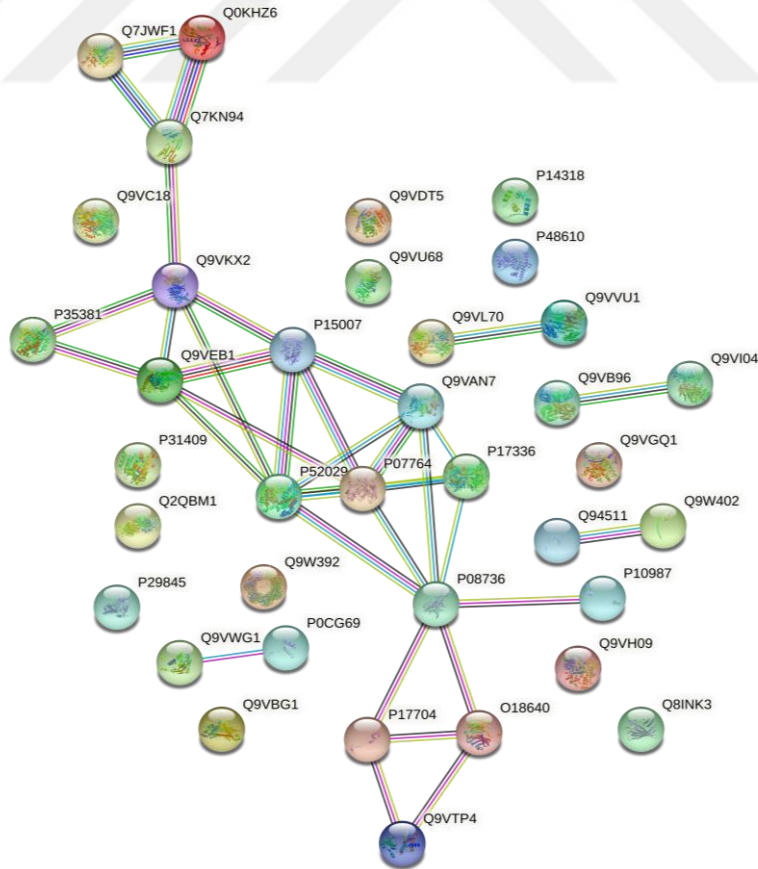
Dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinleri için oluşturulan etkileşim haritası Şekil 3.22’de gösterildiği gibidir. En yoğun etkileşimin olduğu grup AAA domain-containing protein (H9JXB2), proteazom alt ünite alfa (Q1HQB7), proteazom alt ünite beta (H9J4D7), proteazom 26S ATPaz olmayan alt ünite 7 (Q1HPL3) ve proteazom alt ünite alfa (H9JI85) proteinlerinden meydana geldi. *D. melanogaster*’de olduğu gibi *B. mori*’de de protein katabolik süreçlerine ait proteinler tespit edildi.

İkinci grubu oluşturan proteinler translasyon uzama faktör 2 (Q1HPK6), 40S ribozomal protein S12 (Q5UAN1), 60S ribozomal protein L30 (Q5UAQ8) oldu. Bu proteinlerin varlığı sıcaklık süre uygulamasından etkilenen proteinlerin kontrol/degrade süreçlerini akla getirdi.

D. melanogaster sonuçları ile uyumlu şekilde 3. grup süksinat dehidrogenaz [ubiquinon] flavoprotein alt ünite, mitokondriyal (H9JHK2), süksinat dehidrogenaz [ubiquinon] demir-sülfür alt ünite, mitokondriyal (H9JMN7), süksinat--KoA ligaz [ADP/GDP-forming] alt ünite alfa mitokondriyal (H9JTB8)’dan proteinlerinden meydana geldi. Haritada gözlenen diğer bağlantılar *D. melanogaster* sonuçları ile uyumlu bulundu.

mitokondriyal (P35381) oldu. P08736, P52029 ve P15007 sitoplazmada, Q9VAN7 ve P07764 sarkomerde, P17336 peroksizomda, Q9VEB1, Q9VKX2 ve P35381 mitokondride bulunan proteinleridir. P08736 translasyonda, P52029, P15007, Q9VAN7 ve P07764 glikolitik süreçlerde, P17336 çeşitli stres durumlarına oluşturulan cevapta, Q9VEB1 ve Q9VKX2 TCA'da, P35381 ise lipid depolamada görevli proteinlerdir. Q9VEB1 larval midgut hücrelerinin programlanmış ölümünde ve pupal gelişim süreçlerinde aktif bir enzimdir.

Üçüncü grup aktin-5C (P10987), guanine nükleotit-bağlayıcı protein alt ünite beta-benzeri protein (O18640), 60S ribozomal protein L10a-2 (Q9VTP4) ve 40S ribozomal protein S17 (P17704) proteinlerinden meydana geldi. Üçüncü grup üyelerinden O18640'ın çok çeşitli biyolojik süreçlerde görev alan bir protein olduğu tespit edildi. Bu süreçler arasında kutikül gelişimi, kas hücresi hücrel homeostazı, glikojen biyosentetik sürecinin pozitif düzenlenmesi, protein fosforilasyonunun ve ubiquitinasyonunun pozitif düzenlenmesi yer alır.



Şekil 3.23. Farklı sıcaklıkların değişen sürelerde uygulandığı grupların ortak proteinlerine *D. melanogaster* dizi benzerleri ile oluşturulan etkileşim ağı.

proteinine %68,90 benzerlik gösterirken, 48 saat uygulamasından kesilen A0A0N0PB49 proteini ise aynı *D. melanogaster* proteinine %68,70 oranında benzediği görüldü. A0A212EYV5 *Danaus plexippus plexippus*'a, A0A0N0PB49 ise *Papilio machaon*'a ait proteinlerdir.

3.5.4. Uygulama Sıcaklığı Belirlenen Proteinlerin Dizi Benzerleri ile Oluşturulan Etkileşim Haritası – 24 Saat

18 °C uygulamasına ait proteinlere sekans benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinleri adenilat kinaz, troponin I, süksinat--KoA ligaz [ADP/GDP-üreten] alt ünite alfa, ribozomal protein S15 izoform A, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, CG6439 isoform A ve tirozin--tRNA ligaz olarak tespit edildi. Bu proteinler arasında bir ilişki ağı tespit edilemedi ve *B. mori*'de de benzer sonuca ulaşıldı.

30 °C proteinleri için belirlenen *D. melanogaster* dizi benzerleri Nipsnap, NADH-ubikuinon oksidoredüktaz 75 kDa alt ünite, tubulin beta-1 zincir, kasa özgül protein 20, peroksiredoksin 1, protein disülfid izomeraz, T-kompleks protein 1 alt ünite gama, SD02216p, serin/tireonin-protein fosfataz PP2A 65 kDa düzenleyici alt ünite, 14-3-3 protein zeta, uzama faktörü 1-alfa, fruktoz-bifosfat aldolaz oldu. Proteinlerden Uzama faktörü 1-alfa ve Fruktoz-bifosfat aldolaz, Serin/tireonin-protein fosfataz PP2A 65 kDa düzenleyici alt ünite ve 14-3-3 protein zeta, T-complex protein 1 alt ünite gamma ve SD02216p proteinleri arasında etkileşimler gözlemlendi. *B. mori* proteinleri arasında etkileşim belirlenmedi.

37 °C proteinleri *D. melanogaster* dizi benzerleri ise ATP sentaz alt ünite gama mitokondriyal, fenoloksidaz 2, aktin ile ilişkili protein 1, uncharacterized protein izoform A, RNA-bağlayıcı protein lark, dodeca-satellit-bağlayıcı protein 1, troponin I, seril-tRNA sentetaz isoform A, sitoplazmik daynein 1 ara zincir, ısı şoku 70 kDa protein benzer 5 ve ısı şoku 70 kDa protein benzer 3 oldu. Isı şoku 70 kDa protein benzer 5 ve ısı şoku 70 kDa protein benzer 3 arasında etkileşim tespit edildi. *G. mellonella* proteinlerine dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinleri ile oluşturulan haritada etkileşim gözlenmedi.

3.5.5. Uygulama Sıcaklığı Belirlenen Proteinlerin Dizi Benzerleri ile Oluşturulan Etkileşim Haritası – 48 Saat

18 °C uygulaması için jel yerleşimi yapılan proteinlerin *D. melanogaster*'e ait dizi benzerleri pirüvat karboksilaz, hu li tai shao izoform P, aspartik-tip endopeptidaz, cheerio izoform M, gliserol-3-fosfat dehidrogenaz [NAD(+)] sitoplazmik oldu. Proteinler arasında etkileşim gözlenmedi. Benzer şekilde *B. mori* proteinleri arasında da interaksiyon görülmedi.

30 °C proteinleri *D. melanogaster* benzerleri olarak adenil siklaz-ilişkili protein, ALG-2 ilişkili protein X, putativ oksidoredüktaz GLYR1 homolog, beta-alanine sentaz, peroksiredoksin 5 izoform A, RNA polimeraz II transkripsiyon aracılı alt ünite 18 belirlendi. Ayrıca voltaj-bağımlı anyon-seçici kanal, glutatyon sentetaz, glutatyon s-transferaz D1, 40S ribozomal protein S12, Brahma ilişkili protein 55kD, ubikuitin-konjuge enzyme E2 N, protein dj-1beta, nöral korunmuş 73EF izoform I, sister kromatid kohezyon protein solo, T-kompleks protein 1 alt ünite alfa, koatomer alt ünite delta, tubulin alfa-1 zincir, dipeptidil peptidaz 3, seril-tRNA sentetaz, isoform A, tirozin--tRNA ligaz, süksinat dehidrogenaz [ubikuinon] flavoprotein alt ünite mitokondriyal, süksinat dehidrogenaz [ubikuinon] demir-sülfür alt ünite mitokondriyal proteinleri tespit edildi. Birbiri ile yoğun etkileşim gösterelerin 26S proteazom düzenleyici alt ünite 4 ve 8, proteazom alt ünite alfa tip-2, fosfoglukomutaz, platelet-activating factor acetylhydrolase IB alt ünite beta homolog, ısı şoku 70 kDa protein benzer 4 olduğu görüldü. Etkileşim gösteren *B. mori* proteinlerinin protezom bileşenleri olduğu tespit edildi.

37 °C uygulaması *D. melanogaster* benzer proteinleri dynamin ilişkili protein 1 izoform A, izositrat dehidrogenaz, uzama faktörü 2, heterojen nüklear ribonükleoprotein 87F, 26-29kD-proteinaz, RNA-bağlayıcı protein lark oldu. İzositrat dehidrogenaz ve uzama faktörü 2 arasında bir interaksiyon gözlemlendi. Çoğu karakterize edilmemiş *B. mori* proteinleri arasında bir etkileşim görülmedi.

3.6. Stres ile İlgili Proteinlerin Belirlenmesi

Tanımlanan proteinler arasından stres ile ilişkili olanlar tespit edildi ve uygulama sıcaklıklarına göre dağılımı gösterildi. Yapılan değerlendirmede 24 saat

uygulamalarından 34 proteinin (Tablo 3.1), 48 saat uygulamasında ise 21 proteinin (Tablo 3.2) strese karşı gelişen süreçlerde görev aldığı belirlendi. Yirmi dört saat uygulamasına ait 8 proteinin, 48 saat uygulamasına ait 2 proteinin doğrudan ısı stresi ile ilgili olduğu belirlendi.



Tablo 3.1. Değişen sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruba ait stres ile ilişkili proteinler.

Nu.	Tanımlanan Proteine ait UniProt ID	Protein Adı	Dizi Benzerliği Gösteren <i>D. melanogaster</i> Proteinine ait UniProt ID	STRING	FlyBase	Reactome	GO kategorizasyon	Uygulama
1	A0A212FGT6	Protein disülfid-izomeraz (EC 5.3.4.1)	Q3YMU0		✓		Endoplazmik retikulum stresine tepki	24 saat 37 °C
2	Q27451	Fenoloksidaz alt ünite 1 (EC 1.14.18.1) (PO 1) (Tyrosinase 1)	Q9V521		✓		Fungusa tepki	24 saat 37 °C
3	Q6T3A7	Tiol Peroksiredoksin	Q9V3P0	✓	✓		Strese hücrel tepki	24 saat 30 °C
4	A0A194PXA9	Ubikuitin-aktif edici enzim E1 (EC 6.2.1.45)	A0A0B4KF46		✓		DNA hasarına hücrel tepki	24 saat 30 °C
5	H9JT91	Uncharacterized protein	Q9VAY2		✓	✓	Sıcaklığa tepki	24 saat 30 °C
6	A0A0L7LTZ0	Uncharacterized protein	P06754	✓	✓		Hiperoksiye tepki	24 Saat 18 °C
7	F8UN44	Isı şoku protein 70-3	P29844	✓	✓	✓	Sıcaklık stresine hücrel tepki	24 Saat 18 °C
8	H9IYP1	WD_REPEATS_REGION domain içeren protein	Q24246	✓		✓	Sıcaklık stresine hücrel tepki	24 Saat 18 °C
9	A0A194RIZ0	H(+)-transporting two-sector ATPase (EC 7.1.2.2)	Q27331	✓		✓	Strese hücrel tepki	24 Saat 18 °C
10	A0A194RHU0	UTP--glukoz-1-fosfat uridiltransferaz (EC 2.7.7.9)	A5XCL5	✓	✓		Hiperoksiye tepki	Tespit edilemedi.
11	A0A0L7L6B3	Limpet protein	P08736	✓			Sıcaklık stresine hücrel tepki	Tespit edilemedi.
12	A0A0N1INQ1	Tubulin beta-1 zincir	Q24560	✓		✓	Strese hücrel tepki	Tespit edilemedi.
13	A0A0N1PI50	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz [NAD(+)]. (EC 1.1.1.8)	P13706	✓	✓		Hiperoksiye tepki	Tespit edilemedi.
14	A0A212FAS0	Vezikül-birleştirici ATPaz (EC 3.6.4.6)	Q7KN62	✓	✓		Sıcaklık stresine hücrel tepki	Tespit edilemedi.
15	A0A0L7L560	Kalretikulin	P29845	✓	✓	✓	Sıcaklık stresine hücrel tepki	Tespit edilemedi.
16	H9ITX1	Katalaz (EC 1.11.1.6)	P17336	✓	✓	✓	Strese hücrel tepki	Tespit edilemedi.
17	A0A0N1IEI0	Peptidilprolin izomeraz (EC 5.2.1.8)	Q9VL78	✓		✓	Strese hücrel tepki	Tespit edilemedi.
18	A0A194PJK2	Isı şoku 70 kDa protein 4L	M9MSL3	✓		✓	Sıcaklık stresine hücrel tepki	Tespit edilemedi.

Tablo 3.1. (Devamı). Değişen sıcaklıkların 24 saat uygulandığı gruba ait stres ile ilişkili proteinler.

Nu.	Tanımlanan Proteine ait UniProt ID	Protein Adı	Dizi Benzerliği Gösteren <i>D. melanogaster</i> Proteinine ait UniProt ID	STRING	FlyBase	Reactome	GO kategorizasyon	Uygulama
19	A0A194PLU9	26S proteaz düzenleyici alt ünite 6A	Q9V3V6	✓		✓	Strese hücresel tepki	Tespit edilemedi.
20	Q2F5X3	26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 4	P55035	✓		✓	Strese hücresel tepki	Tespit edilemedi.
21	A0A212ERW1	26S proteaz düzenleyici alt ünite 6B (26S proteazom düzenleyici alt ünite 6B)	Q9V405	✓		✓	Strese hücresel tepki	Tespit edilemedi.
22	A0A212EJZ3	Tubulin alfa zincir	P06603	✓		✓	Strese hücresel tepki	Tespit edilemedi.
23	H9JWQ0	V-tip proton ATPaz alt ünite C	Q9V7N5	✓		✓	Strese hücresel tepki	Tespit edilemedi.
24	H9JCV2	Uncharacterized protein	O02649		✓		Sıcaklığa tepki	Tespit edilemedi.
25	A0A212EIE9	cAMP-bağımlı protein kinaz R2 (cAMP-bağımlı protein kinaz tip II düzenleyici alt ünite)	P81900		✓		Kokaine davranışsal tepki	Tespit edilemedi.
26	A0A194Q8A1	Four and a half LIM domains protein 2	Q7KUQ5		✓		Fungusa tepki	Tespit edilemedi.
27	A0A0N1ICI4	Sitrat hidrolaz (EC 4.2.1.3) (Sitoplazmik akonitat hidrataz) (Demire cevap element-bağlayıcı protein 1)	Q9VGZ3		✓		Demir (II) iyonuna tepki	Tespit edilemedi.
28	H9ITD6	Uncharacterized protein	Q9VZ69		✓		Açlığa tepki	Tespit edilemedi.
29	Q5UAT0	Ribozomal protein L10	O61231			✓	Uyarıya hücresel tepki	Tespit edilemedi.
30	Q6PUF8	40S ribozomal protein S21	O76927			✓	Uyarıya hücresel tepki	Tespit edilemedi.
31	A0A212FEQ6	60S asidik ribozomal protein P0	P19889			✓	Uyarıya hücresel tepki	Tespit edilemedi.
32	Q5UAM7	Ribozomal protein S15A	P48149			✓	Uyarıya hücresel tepki	Tespit edilemedi.
33	A0A0N0PFU8	Protein disülfid izomeraz A6	Q9V438			✓	Uyarıya hücresel tepki	Tespit edilemedi.
34	A0A194Q785	40S ribozomal protein S7	Q9VA91			✓	Uyarıya hücresel tepki	Tespit edilemedi.

Tablo 3.2. Değişen sıcaklıkların 48 saat uygulandığı gruba ait stres ile ilişkili proteinler.

Nu	Tanımlanan Proteine ait UniProt ID	Protein Adı	Dizi Benzerliği Gösteren <i>D. melanogaster</i> Proteinine ait UniProt ID	STRING	FlyBase	Reactome	GO kategorizasyon	Uygulama
1	A0A194QWA6	İzositrat dehidrogenaz [NADP]. (EC 1.1.1.42)	Q7KUB1		✓		Strese hücrese tepki	48 Saat 37 °C
2	A0A212F4L1	Heterojen nüklear ribonükleoprotein A1	P48810		✓		Sıcaklığa hücrese tepki	48 Saat 37 °C
3	A0A194QWZ9	F-aktin-şapka protein alt ünite alfa	Q9W2N0	✓		✓	Strese hücrese tepki	48 saat 37 °C
4	A0A212EQ66	26S proteazom düzenleyici alt ünite RPN11	Q9V3H2	✓		✓	Hipoksiye hücrese tepki	48 saat 37 °C
5	A0A194QPV0	Peroksiredoksin-5 (EC 1.11.1.24)	Q960M4	✓	✓		Oksidatif strese hücrese tepki	48 saat 30 °C
6	Q8N0P2	Isı şoku benzer protein	P11147	✓	✓	✓	Sıcaklığa hücrese tepki	48 saat 30 °C
7	Q1HQ36	Ubikuitin konjuge enzim E2	P35128		✓		Strese hücrese tepki	48 Saat 30 °C
8	A0A212EVS5	DJ-1 beta (protein dj-1beta)	Q9VA37		✓		Strese hücrese tepki	48 Saat 30 °C
9	A0A194PG29	26S proteaz düzenleyici alt ünite 4	P48601	✓		✓	Hipoksiye hücrese tepki	48 saat 30 °C
10	A0A212F9V0	Proteazom alt ünite alfa tip	P40301	✓		✓	Hipoksiye hücrese tepki	48 saat 30 °C
11	A0A0N1IMX8	Filamin-A	Q9VEN1		✓		Strese hücrese tepki	48 Saat 18 °C
12	A0A212FHV4	Kathepsin D	Q7K485		✓		Strese hücrese tepki	48 Saat 18 °C
13	H9JSP9	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz [NAD(+)] (EC 1.1.1.8)	P13706		✓		Hiperoksiye hücrese tepki	48 Saat 18 °C
14	I4DIL6	40S ribozomal protein S12	P80455			✓	Açlığa hücrese tepki	Tespit edilemedi.
15	Q5UAQ8	60S ribozomal protein L30	Q9VJ19			✓	Strese hücrese tepki	Tespit edilemedi.
16	H9JQN8	Protein disulfit-izomeraz (EC 5.3.4.1)	P54399			✓	Strese hücrese tepki	Tespit edilemedi.
17	H9J4D7	Proteazom alt ünite beta	Q7K148	✓		✓	Hipoksiye hücrese tepki	Tespit edilemedi.
18	A0A194PMM8	26S proteazom ATPa olmayan düzenleyici alt ünite 7	P26270	✓		✓	Hipoksiye hücrese tepki	Tespit edilemedi.
19	A0A0N0PB72	26S proteaz düzenleyici alt ünite 8	O18413	✓		✓	Hipoksiye hücrese tepki	Tespit edilemedi.
20	A0A0N1IP51	Tubulin alfa zincir	P06603	✓		✓	Strese hücrese tepki	Tespit edilemedi.
21	A0A194QHV4	Tubulin beta zincir	Q24560	✓		✓	Strese hücrese tepki	Tespit edilemedi.

3.7. Reactome ile Belirlenen Metabolik Yolaklar

Tanımlanan proteinlerin metabolik yollara dağılımı Reactom aracılığı ile değerlendirildi. Ek 3.10'de 24 saat, Ek 3.11'de ise 48 saat dağılımı gösterildi. Veri tabanı *D. melanogaster* protein aksesyon numaralarını insan eşdeğerlerine çevirdi. Bu sayede tanımlanan proteinlerin insana ait metabolik yollara dağılımı gösterildi.

3.7.1. Proteinlerin Metabolik Yollara Dağılımı-24 ve 48 Saat Karşılaştırması

24 saat için dizi benzerliği gösteren 71 *D. melanogaster* proteini tespit edildi ve Reactome analizinde kullanıldı. Yetmiş bir protein için 508 yolak tanımlandı. Kırk sekiz saat için analizi yapılan protein sayısı 42 oldu. Bu proteinlerin 431 yoldan en az birine yerleştiği görüldü. Şekil 3.25 ve 3.26'da yer alan görseller karşılaştırıldığında metabolik yolların değişen süreye bağlı olarak değiştiği tespit edildi.

Görseller karşılaştırıldığında agrefajiye (24 ve 48 saat) ilaveten 48 saatte lipofaji tespit edildi. Yirmi dört ve 48 saat karşılaştırmasında bağışıklık sisteminde farklar tespit edildi. Kırk sekiz saat uygulamasında doğal ve adaptif bağışıklık sistem aktivasyonunda değişim yaşandığı görüldü. Hayvan gelişiminde anahtar transkripsiyonel düzenleyicilerden RUNX1'in uygulama süresine bağlı değişim göstermiş olabileceği düşünüldü.

Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları arasındaki bir diğer fark membran taşıma trafiğinde görüldü. Yirmi dört saat uygulamalarında GLUT4'ün plazma membranına taşındığı süreç belirlendi ve 48 saat uygulamasında membran trafiğinin golgi ve endoplazmik retikulum yönünde değiştiği tespit edildi. Bu değişimin, sıcaklık değişiminden kaynaklanabileceği düşünüldü. Yirmi dört uygulamasında translasyon ve metilasyon gibi protein metabolizması süreçleri ile ilgili proteinler tespit edildi. Kırk sekiz saat için ise deubikuitinasyon, asparagine-N-linked glikolizasyon, neddyasyon süreçlerinde farklılıklar tespit edildi. Tespit edilen tüm protein modifikasyonları değerlendirildiğinde 48 saat uygulamasında görülen deubikuitinasyon ve neddyasyonun strese ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Yirmi dört saat örneklerinde tespit edilen metilasyonun ise gelişim ve homeostasis ile ilgili olması muhtemel bulundu. Bahsedilen protein modifikasyonlarının stresle veya larva gelişimine bağlı uyarılması mümkündür.

Şekil 3.25. Yirmi dört saat uygulamalarında tanımlanan proteinlerin insandaki benzerlerinin metabolik yollara yerleşimi.

Şekil 3.26. Kırk sekiz saat uygulamalarında tanımlanan proteinlerin insandaki benzerlerinin metabolik yollara yerleşimi.

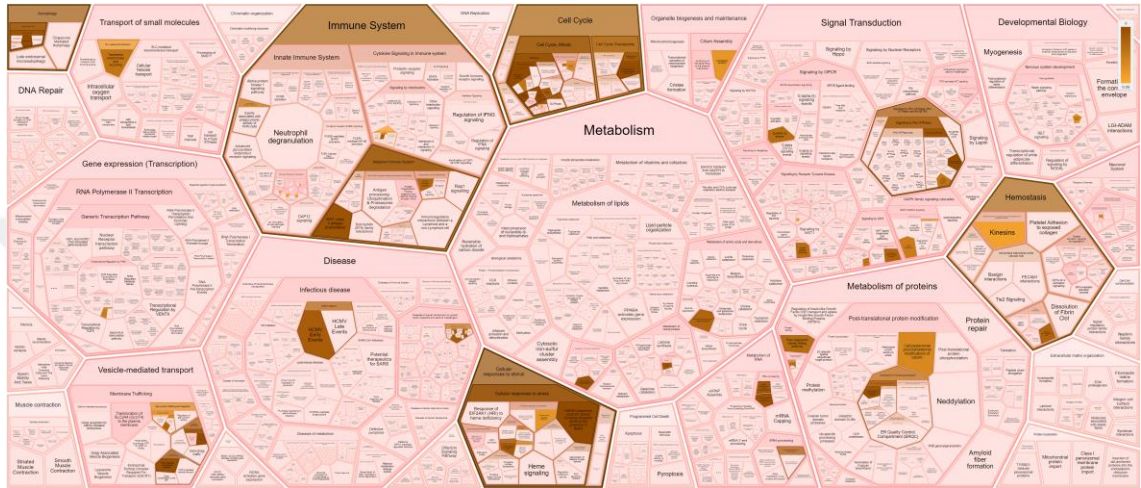
Yirmi dört ve 48 saat arasında göze çarpan bir diğer fark uyarana karşı geliştirilen hücresel cevap bileşenlerinde gözlemlendi. Açlığa, ısı şokuna ve katlanmamış proteinlere verilen hücresel tepki 24 saat uygulamalarında tespit edilirken, 48 saat uygulamalarında bu duruma rastlanmadı.

Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları arasında lipit metabolizması bakımından farklar gözlemlendi. Yirmi dört saat uygulamasında keton metabolizmasında yer alan proteinler tespit edildi. Kırk sekiz saat uygulaması incelendiğinde ise yağ asitlerinin mitokondrial beta oksidasyonu ve kardiyolipin açıl zincirinin yeniden modellenmesi süreçlerine ait proteinler belirlendi.

Hücresel döngü açısından yapılan değerlendirmede G2/M geçişi yalnızca 24 saat uygulamasında görüldü. RNA metabolizması bileşenlerinden tRNA'nın mitokondriyal süreci, rRNA'nın nukleus ve sitoplazmada işlenmesi ve nonsense-mediated bozunma süreçlerinde görev alan proteinler 24 saat uygulamalarında tespit edildi ve bu özelliği bakımından 48 saat uygulamalarından ayrıldı. Sinyal iletim yollarından GPCR sinyal iletimine ait DARP32 ve insülin reseptör geri dönüşüm süreçlerinin 24 saat uygulamalarına özgü varlığı dikkate değer bulundu. Gelişimsel olarak hücre adhezyon molekülleri L1 ailesi (L1CAM) üyelerine ait interaksiyonların ve ROBO reseptörleri aracılığı ile sinyal iletiminin yalnızca 48 saat uygulamalarına özgü olduğu görüldü. Küçük moleküllerin taşınması açısından 24 ve 48 saat uygulamalarında farklılıklar gözlemlendi. Yirmi dört saat uygulamalarında demir alımı ve taşınması için gerekli transferin endositozu ve geri kazanımının işleyişi tespit edildi. Kırk sekiz saat için ise plazma lipoproteinlerinin yeniden modellenmesi ve temizlenmesi ve ABC proteinleri ile taşıma yolları belirlendi. Hücre dışı matriks bileşenleri bakımından tespit edilen tek fark 24 saat uygulamalarında görülen syndecan etkileşimleri oldu. Organel biyogenezi açısından 24 saat uygulamalarına özgü mitokondriyal biyogenezin olması enerji eldesi ve kullanımı açısından dikkate değer bulundu. Hastalık olarak nitelendirilen biyolojik süreçler için 24 ve 48 saat uygulamaları kıyaslandığında 24 saatte oksidasyon enzimleri açısından hasarlar tespit edilirken, 48 saatte hem glikolizasyon hem de karboksilaz enzim hasarları belirlendi.

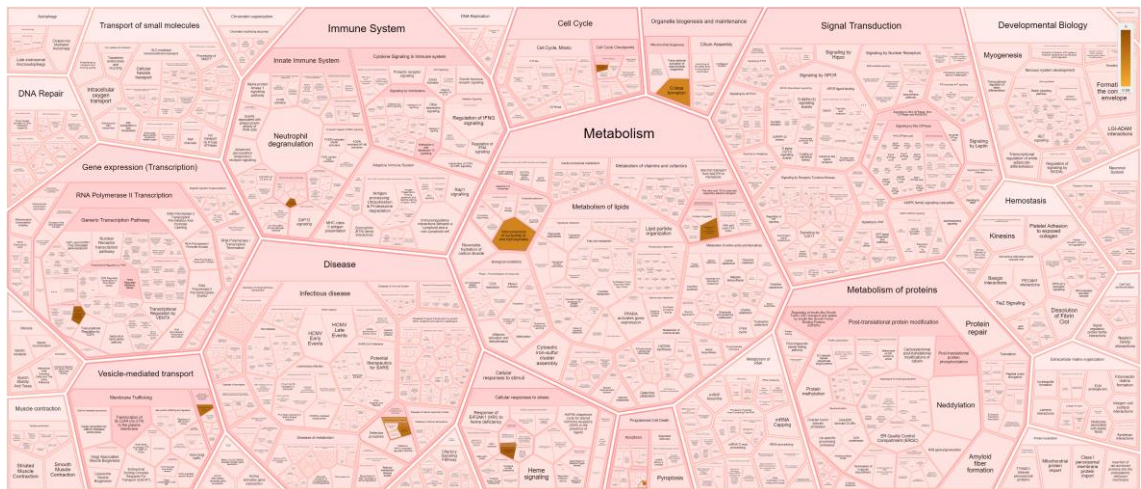
3.7.2. Aynı Süre Uygulanan Farklı Sıcaklıkların Karşılaştırılması-24 Saat

Yirmi dört saat 18 °C uygulamasına ait 8 proteinin yolaklara yerleşimi incelendiğinde aminoasit ve türevlerine ait metabolizma, G2/M geçişi, CCT/TriC ile tubulin katlama ara ürünlerinin oluşumu, strese karşı geliştirilen hücresel cevap olduğu tespit edildi. Sıcaklığa özgü düzenlemeye uğrayan yolaklar Şekil 3.27’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.27. Yirmi dört saat süre 18 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yolaklara dağılımı.

Yirmi dört saat 30 °C’ye ait 11 proteinin yerleştirildiği yollardan birkaçı organel biyogenezi ve bakımı, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu, TP53 metabolik genlerin düzenlenmesi, strese hücresel tepkiler, apoptoz ile ilgili yolaklar, metabolik genleri düzenleyen TP53, SLC2A4’ün (GLUT4) plazma zarında yer değiştirmesi, FOXO aracılı transkripsiyon oldu (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. Yirmi dört saat süre 30 °C sıcaklık uygulamasına ait proteinlerin yolaklara dağılımı.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Protein İzolasyon Metodunun Değerlendirilmesi

Başarılı bir proteomik analiz için kaliteli protein izolasyonu oldukça önemlidir. Her bir izolasyon tekniği aynı protein havuzunu farklı şekilde izole eder ve ortak havuzdan farklı proteinlerin ekstraksiyonuna imkan sağlar. Bu durum her ekstraksiyon yönteminin kendine has bir "ekstraktomu" olduğu şeklinde değerlendirilebilir [61]. Protein dışında dokularda bol miktarda bulunabilen lipid, karbohidrat, sekonder bileşikler ve pigmentler proteom analizlerinin sağlıklı şekilde yapılmasına engel olur. TCA-aseton; lipidlerin, ikincil bileşiklerin büyük oranda çözünmesini kolaylaştırır ve aynı anda proteinleri çökeltir. Ayrıca aseton lipidlerin de etkili şekilde uzaklaştırılmasını sağlar. Bu protokolün önemli dezavantajları ise; aseton yüzünden proteinlerin modifikasyona uğraması, uzun süren inkübasyon sebebi ile protein degradasyonu [62] ve proteinlerin TCA-aseton çökeltmesinden sonra tam olarak yeniden çözünemeyişidir [63]. Bu nedenle elde edilen protein peletini çözündürmek için daha güçlü tamponlar ve mekanik yaklaşımlar kullanmak gereklidir. Ancak tüm olumsuz yönlerine rağmen TCA-aseton prosedürü, temiz ve konsantre bir protein örneği hazırlamak için hala yaygın olarak kullanılmaktadır [64]. Sonikasyonla desteklenen ekstraksiyon metotlarında, protein izolasyon veriminin arttığı bilinmektedir. Bitkilerin yanı sıra böcek dokularından da verim artışı gözlenmiştir [65]. Çalışmamızda proteinlerin izolasyonu sonikasyon ve ultrasonik su banyosu gibi fiziksel uygulamalarla desteklendi. Örnek büyüklüğü, proteomik profillemeye çalışmalarının önemli konularından biridir. Larvalar ile yapılan çalışmalarda örnek büyüklüğü ve biyolojik tekrar sayısı çalışmanın amacına bağlı olarak değişmektedir. Organizmaya bağlı olarak çalışmalarda kullanılan larva sayısı 10'dan [66] 1000'e [67] kadar değişim göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan larva sayısı 6 oldu. Örnek sayısı için bir normalizasyon yapılmadığından, teorik protein havuzunun

yeterli temsiline dair kesin değerlendirme yapmak mümkün değildir. Besin kalıntılarının ve boşaltım ürünlerinin protein izolasyonu ve odaklamayı olumsuz etkilemesi söz konusu olabilir. Bu yüzden izolasyon basamakları öncesinde larvalar 1 saat kadar besinsiz bırakılmıştır. Bu durumun larvalar için açlık stresi meydana getirmesi mümkündür ve göz ardı edilmemelidir.

Çok hücreli organizmalarda özelleşmiş sistemlerin düzenli çalışması etkili bir iletişime bağlıdır. Vücut sıvıları kimyasal iletişimi sağlayan çok sayıda sinyal molekülü içerir. Hemolenfte, bu düzenleyici proteinler açısından eşsiz bir kaynaktır. Çalışmamızda sıcaklık-süre etkisi ile hemolenf proteomunda meydana gelen değişimlerin tespiti amaçlandı ve hemolenf proteinleri ayrıca izole edildi. Tanımlanan proteinler arasında bilinen sinyal proteinlere rastlanmadı. Bu durum hemolenfte sinyal moleküllerinin düşük titrelerde bulunması, genellikle düşük moleküler ağırlığa ve kısa ömre sahip olmaları sebebi ile izole edilemedikleri şeklinde yorumlandı.

4.2. Spot Seçim/Kesim Stratejisinin Değerlendirilmesi

2D-PAGE moleküler biyoloji için anahtar tekniktir ve bu yolla deneysel değişimler protein seviyesinde haritalanır. Jeller boyanarak binlerce proteinin konumları görünür hale getirilir. Bu aşamadan sonra jeller görüntülenerek dijitalleştirilir ve biyolojik bilgi program tarafından okunabilir nicel bir veri setine dönüştürülür. Görüntü değerlendirmede kullanılan birçok programın algoritması standarttır. Genel olarak protein spotların tek tek tespit edilmesi ve sınırlarının belirlenmesi, arka plan etkisinin azaltılması, referans bir jel oluşturma, uygulamaya bağlı değişimleri referans jel ile eşleştirme, verilerin istatistiksel ve biyoinformatik yöntemlerle değerlendirilmesi basamakları takip edilir. Bu programlar binlerce proteinden gelen veri setlerinin kısa sürede değerlendirilmesine imkân sağlamaktadır. Ancak programın her basamağı beraberinde birtakım sorunlar getirmektedir. Örneğin hatalı/eksik spot tespiti, yanlış spot eşleştirme sorunları nedeniyle değerli bilgiler kaybolabilmektedir. Jel görüntü analizinde ham verilerin kalitesi sonuç üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, deneysel olarak ortaya çıkan kusurlardan kaçınmak ve tarama cihazlarını mümkün olan en iyi şekilde yapılandırmak çok önemlidir. Gerçek olmayan spotlar ve gürültü oluşturacak diğer etkiler spot tespit ve kantitasyon sürecini olumsuz etkiler. Jelde meydana gelen kırılmalar protein spotlara zarar verebilir, boya kalıntıları spot tespitini

yanlış yönlendirebilir veya nicelendirmeyi bozabilir. Düşük yoğunluklu proteinler gürültü kabul edilerek göz ardı edilebilir veya yüksek arka plan düşük yoğunluklu gerçek spotların tespitini güçleştirebilir. Yeni geliştirilen programlarda bu eksiklikler giderilmektedir. Ancak bütünü ile kusursuz bir program henüz bulunmamaktadır [68]. Çalışmamızda elde edilen jellerin değerlendirilmesi çıplak göz ile yapıldı. Çıplak göz ile yapılan değerlendirme, programlar için sıralanan risklere ilave bazı sorunları da beraberinde getirir. Özellikle çok sayıda protein spot içeren birden fazla jel karşılaştırmasında bu risk katlanarak artar. İnsan faktörünün bu kadar etkili olması verilerin güvenilirliğini olumsuz etkiler.

Proteinlerin MS ile tanımlanması oldukça maliyetlidir. Maliyet sebebi ile spot seçiminde en çok bilgi, en az örnek esasına göre hareket edildi. Bu nedenle MS analizi için farklı sıcaklıkların (18°C, 30°C ve 37°C) 24 ve 48 saatlerine ait jellerden spotlar toplandı. Toplanan spotların jel pozisyonları korunarak sanal bir kesim jeli elde edildi. Tanımlanan protein bilgileri JVirGel ile işlenerek diğer sanal jel elde edildi ve sanal jeller karşılaştırıldı. Bu sayede değişen sıcaklıkların proteoma etkisi belirlendi. Sanal jellerin örtüşmesine dayalı bu yaklaşımda proteinlerin ait olduğu jel ve jeldeki konumu bütünü ile tespit edilemedi. Ayrıca çıplak gözle yapılan işlemlerden kaynaklanan hatalı protein kimliklendirmesi ihtimalleri arasındadır.

4.3. Tercih Edilen MS Yönteminin Değerlendirilmesi

Bir karışımdaki proteinlerin tanımlanması için standart yaklaşım, proteinlerin/peptitlerin 2D-PAGE veya LC gibi bir yöntemle başlangıçta ayrımıdır. Ayrımın ardından proteinler /peptitler bir proteaz enzimi ile kesilir ve kütle spektrometresi ile analiz edilir. Tanımlamada kullanılan iki ana yaklaşım peptit kütle parmak izi (PMF) ve MS/MS peptit fragmentasyonudur. PMF, MALDI-TOF ile yapılan tanımlama işlemlerinde kullanılır. PMF protein tanımlamada en çok kullanılan ve en hızlı yöntem olsada, bazı sınırlamaları vardır. Özellikle protein karışımları (>3) bu yöntemle güvenilir bir şekilde analiz edilemez. Bu durumlarda, tanımlama için MS/MS yaklaşımı kullanılır. Bu şekilde, çok karmaşık örnekler başarılı şekilde analiz edilebilir ve normal bir LC-MS/MS çalışmasında yüzlerce peptit tespit edilip tanımlanır [69]. 2D-PAGE ile ayrılan proteinlerin tanımlanmasında genellikle MALDI-TOF kütle analizi kullanılır. Jellerden kesilen proteinlerin bir havuzda toplanması sebebi ile MALDI-TOF'un analiz sınırı

aşıldı bu sebeple çalışmamızda protein tanımlama için LC-MS/MS tercih edildi. Ayrıca daha güçlü ayırma ve tespit gücü olan LC-MS/MS ile genom anotasyonu henüz tamamlanmamış olan *G. mellonella* için çok sayıda ve yüksek doğrulukla protein tanımlaması hedeflendi. Bazı örneklerle ait kromatogramlar Ek 4.1 ve Ek 4.2’de gösterildi.

4.4. MS Sonuçlarının İşlenmesinde Kullanılan Parametrelerin Değerlendirilmesi

MS ile tanımlanan proteinlere ait ham verilerin çeşitli parametreler üzerinden işlenmesinde gaye; doğruluğu ve güvenilirliği yüksek olan proteinleri tespit etmektir. Kullanılan tekniklerin getirdiği sınırlayıcı faktörler proteinlerin işlenmesinde ilk kullanılan parametreler oldu. 2D-PAGE çalışmalarında bilindiği üzere proteinler iki basamakta ayrılır ve ilk boyutta izoelektrik noktalarına göre ayırım sağlanır. Çalışmamızda bu amaçla pH 3-10 aralığında ayırım gücüne sahip stripler kullanıldı. Dolayısı ile tanımlanan proteinler arasında bu aralığın dışında kalanlar değerlendirmeye alınmadı. İkinci boyutta ayırım proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre yapılır ve burada jel bileşiminde kullanılan akrilamit yüzdesi de belirleyicidir. Çalışmamızda kullanılan %12,5’luk akrilamit jelin ayırabileceği moleküler ağırlık alt-üst limit değerleri standart kullanılarak belirlendi (Şekil 3.5a). Buna göre etkili bir ayırımın 250 kDa ve 10 kDa aralığında olduğu görüldü. Tanımlanan proteinlerin işlenmesinde M_a 250 kD’dan büyük ve 10 kD’dan küçük olanlar değerlendirme dışı bırakıldı. Değerlendirmeye dâhil edilmeyen ve moleküler ağırlık açısından belirlenen üst limite yakın 7 protein tespit edildi. Bu proteinlerin yağ asidi biyosentezinde ve endositoziste görev alan proteinler olduğu belirlendi.

Jellerden kesilen tüm spotların tanımlanması için Lepidoptera takımına ait Ditrysia kladı üyesi 5 türün UniProt referans proteomlarından oluşturulan toplamda 78.569 proteinlik veri tabanı kullanıldı. Bu kadar geniş bir veri tabanı protein tanımlama yüzdesini artırırken bir protein için birden fazla tanım alma ihtimalini de beraberinde getirdi.

2D-PAGE tabanlı çalışmalarda spotların jelde çok yakın konumlanması veya yakın/benzer pI ve M_a ’ya sahip birden fazla protein olması mümkündür. Bu durumlarda hedef spot dışında kesim riski ortaya çıkar. Sonuç olarak da tanımlanan protein sayısı artar. Bu koşulların protein tanımlamaya olan olumsuz etkilerini azaltabilmek için düzenlemeler yapıldı ve bu düzenlemeler veri işleme olarak isimlendirildi. Belirli bir

proteinin tanımlanması ve elbette konsantrasyonun tespiti, o proteine ait peptitlerin sayısına, peptit tanımlama puanlarının toplamına, protein coverage miktarına ve peptitlerin pik intensitesine bağlıdır. Proteinin doğru tanımlanması ve protein miktarının tayini için özellikle benzersiz (unique) peptitlerin sayısı oldukça önemlidir. Genellikle protein başına iki benzersiz (unique) peptit tespit edilmesi ile tanımlanan yanlış pozitif protein sayısı azaltılır [70]. Peptit tanımlamada en az iki peptit ile tanımlaması yapılan proteinler güvenilir olarak kabul edilir. Bu katı kural sayesinde proteomik veriler daha doğru ve güvenilir hale getirilir. Ancak 'iki peptit' kuralının, genellikle çok sayıda verinin (tüm eksprese edilen proteinlerin yaklaşık %20-%25'nin) kaybına neden olabileceği de belirtilmektedir [71]. Çalışmamızda MS verilerinin değerlendirilmesinde Unique Peptides, ve Coverage [%] parametreleri açısından sıralamada önde olan proteinler tanımlama için tercih edildi. Benzersiz (unique) peptit sayısı 3 olarak belirlendi. Bu sayede tanım alan protein sayısı azaldığı için; proteinlerin sanal haritaya yerleşiminde kolaylık sağlandı. Yukarıda belirtilen tercih(ler)e ilaveten UniProt tarafından manuel olarak incelenen, küratör tarafından hesaplamalı analizi yapılan ve “reviewed” etiketi olan proteinlere tanımlamada öncelik verildi.

4.5. Sıcaklık ve Süre Değişkenlerinin Değerlendirilmesi

Enfeksiyon modelleme çalışmalarında kullanılan 37 °C ve *G. mellonella* gelişiminin yavaşladığı 18 °C tez çalışmasında incelenecek sıcaklık değerleri olarak seçildi. *G. mellonella* gelişimi için en uygun sıcaklık aralığı ortalama 29-33 °C'dir [72]. Ancak larvaların 20- 42°C arasında değişen deneysel sıcaklıklarda yaşayabildiği bilinmektedir [73]. Enfeksiyon modelleme çalışmalarında larvaya uygun değer aralığının üstünde bir sıcaklık uygulanmaktadır. Çünkü insana ait patojenler, konakçı hücrelerine bağlanmalarını, konakçı bağışıklığından kaçmalarını ve besine ulaşmalarını sağlayan virülans faktörleri bu sıcaklıkta üretebilir. [74]. Ancak bu sıcaklığın uygulanması, olası etkileri açısından dikkatle incelenmelidir. Çünkü *G. mellonella*'nın ölümcül olmayan bazı stres tiplerine karşı bağışıklık tepkisi geliştirdiği bilinmektedir [75].

Çoğu organizma, sıcaklık ve diğer abiyotik değişkenlere karşı zamansal ve uzamsal olarak farklı tepkiler gösterir. Birçok ektoterm sıcaklık hassasiyetine göre farklı koşullara uyum sağlar. Ancak hassasiyeti kadar, değişikliğin uygulanma süresi de önemlidir. *G. mellonella*'nın konukçu olarak kullanıldığı enfeksiyon çalışmalarından

uygulama süreleri 12 saatten [76] 10 güne kadar [77] değişim göstermektedir. Çalışmamızda bu aralıkta kalan 24 ve 48 saat seçildi. Sonuçlar incelendiğinde sıcaklığın canlılık, metabolizma, büyüme, gelişme ve üreme etkinliğini olumlu veya olumsuz birçok etkisinden bahsetmek mümkündür [78]. Bu etkilere aşağıdaki başlıklarda yer verilmiştir.

4.6. Reactome'a Göre Sıcaklık Değişimlerinin Etkileri

4.6.1. Yirmi dört Saat 18 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler

Yağ asitlerinin mitokondriyal β -oksidasyonu, özellikle açlık ve diğer metabolik stres dönemlerinde enerji üretimi için hayati önem taşır. 3-hidroksiasil-KoA dehidrogenaz enzimini kodlayan gen açısından nakavt farelerle yapılan bir çalışmada, farelerin vücut sıcaklıklarını koruyamadığı gözlenmiştir. 3-hidroksiasil-KoA dehidrogenaz'ın termojenezde, vücut ağırlığının korunmasında ve besinle uyarılan insülin sekresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir [79]. 3-hidroksiasil-KoA dehidrogenaz enziminin 24 saat 18 °C uygulamasında yer alması soğukta artan enerji ihtiyacının yağ cisimcikleri üzerinden de karşılanması şeklinde yorumlanabilir.

Bir çeşit PTM olan fosforilasyon, sinyal iletiminde önemli role sahiptir. Bu modifikasyon, fosforilasyondan sorumlu kinazlar ile fosfatın uzaklaştırılmasından sorumlu olan fosfatazlar arasındaki denge ile sağlanır. Çoğu protein fosforilasyonu serin veya treonin dizileri üzerinde gerçekleştirilir ve serin/treonin fosfatazlar hücrede oldukça bol bulunur. Serin/treonin-protein fosfataz PP2A 65 kDa düzenleyici alt ünite alfa çalışmamızda tanımlanan proteinlerdendir. Bu protein dokulardaki toplam proteinin yaklaşık %1'ini oluşturur ve bu da onu hücrede en bol bulunan enzimlerden biri yapar. PP2A hücre dışı sinyal moleküllerine verilen yanıtları kontrol ederek, birçok sinyal yolunun anahtar proteinlerini fosforile eder. Bu yollardan biri Wnt/ β -katenin sinyal yolağıdır [80]. Bu sinyal yolunda β -katenin eğer fosforile olursa degrade edilir ve sonuç olarak WNT'nin kontrol ettiği gen ifadeleri baskılanır [81]. Hücreler, mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'lar) gibi spesifik hücre içi programlar sayesinde hücre dışı uyarıları tanır ve yanıt geliştirir. Tüm ökaryotik hücreler, hücrel aktiviteyi düzenleyen çeşitli çoklu MAPK yollarına sahiptir. Memelilerde beş farklı MAPK grubu karakterize edilmiştir ve bunlardan biri hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinazlar (ERK'ler)'dir. ERK'ler hücrelerde dağılmış halde bulunur, ancak uyarı meydana

geldiğinde çekirdekte önemli miktarda ERK birikir. ERK sinyali, hücre proliferasyonunun ana düzenleyicisidir [82]. ERK sinyalinde meydana gelen inaktivasyon proliferasyonun durması anlamına gelir. Bahsilen yolların ortak elemanı olan serin/treonin-protein fosfataz 2A 65 kDa düzenleyici alt ünite A alfa'nın bazı genlerin baskılanması veya kinazların inaktivasyonu aracılığı ile hücre döngüsünü etkilemesi, bu durumun da sıcaklıkla ilişkili olabileceği ihtimali düşünüldü.

Otofaji, hasarlı organellerin, biyosentez sırasında hatalı biçimlendirilmiş veya işlevsiz proteinlerin lizozom tarafından uzaklaştırılmasından sorumludur. Otofaji, hücre içi materyallerin lizozoma iletilme mekanizmasına bağlı olarak üç şekilde gerçekleşir. Bunlar mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji (CMA) ve makrootofajidir. Mikrootofajide sitoplazmik materyal, lizozomal membranın doğrudan içe çökmesi ile membran içine alınır. Oysa CMA'da işaretlenmiş proteinler doğrudan translokasyon yoluyla lizozoma taşınır. Makrootofajide ise sitoplazmik içerikleri parçalanmak üzere lizozomlara taşıyan çift zarlı otofagozomların oluşumu söz konusudur [83, 84]. Çok sayıda uyaran otofajiyi tetikleyebilir, ancak en iyi çalışılmış form olan makrootofaji, ya besin eksikliği (seçici olmayan makrootofaji) ya da belirli bozunma koşullarında (seçici makrootofaji) meydana gelir. Sitoplazmik agregatların parçalanmasına ise agregfaji denir. Agregatlar aktin ve mikrotübül aracılığı ile lizozomlara taşınır. Tübülün beta-1 zincir çalışmamızda tanımlanmış bir protein olup mikrotübüllerin yapısal birimlerindendir. Yine çalışmamızda tanımlanan WD_REPEATS_REGION domain-içeren protein, yapısal olarak daynein'e benzerlik göstermektedir. Daynein ise hücre içi kargo paketlerine bağlanıp mikrotübüller boyunca taşınmasını sağlayan bir proteindir [85]. Tübülün karboksi terminal PTM'leri ise mikrotübüllerin dayanıklılığı ve kararlılığı ile ilişkilidir [86]. Proteinlerin otofaji süreçlerinde yer alması ve tübülün PTM'leri birlikte değerlendirildiğinde, düşük sıcaklıkta hücre içi iskeletin yeniden düzenlenmesi ihtimali olası bulundu.

Isı şoku 70 kDa proteinleri, organizmaları çevresel streslere karşı korumada önemli rol oynar. Bu proteinler stresle indüklenebilir. Yapılan bir çalışmada ipekböceğinin tüm genomunda ısı şoku protein 70 ailesi tespit edilmiştir. Sıcak (37 °C ve 42 °C) ve soğuk (2 °C) stresleri altında, HSP70-1, HSP70-2 ve HSP70-3'ün ifadesinin arttığı görülmüştür [87]. Çalışmamızda tanımlanan ısı şoku proteini 70-3'ün düşük sıcaklık stresi ile ilgili olabileceği düşünüldü.

4.6.2. Yirmi dört Saat 30 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler

Yirmi dört saat boyunca 30 °C uygulanmasına ait proteinlerin genellikle gelişimsel süreçlerle ilgili olduğu düşünüldü. Bu proteinlerle ilgili muhtemel yollar aşağıda belirtildiği gibidir.

Forkhead box O (FOXO), insülin sinyal yolağında görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. Böcekler de dâhil olmak üzere birçok organizmada yaşam süresi ile ilgili çok sayıda fizyolojik süreci düzenler. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak *B. mori* FOXO mutantları üretilmiş ve ilgili transkripsiyon faktörünün fizyolojik fonksiyonları aydınlatılmıştır. Elde edilen bulgular FOXO'nun lepidopteran böceğin gelişimindeki önemini ortaya çıkarmıştır. FOXO' nun, *B. mori*' de büyüme ve gelişmeyi juvenil hormon homeostazı üzerinden düzenlediği gösterilmiştir [88]. Çalışmamızda tanımlanan 14-3-3 protein zeta (A0A194PP56)'nın FOXO benzeri fonksiyona sahip olması ihtimal dâhilindedir.

Scavenger reseptörler, membran bağımlı reseptörlerdir. Canlıda üretilen hatalı moleküllerin (örneğin, apoptotik hücreler, hasarlı proteinler gibi) veya kendinden olmayan moleküllerin (örneğin, mikroorganizmalar veya yabancı partiküller) tanınıp ortadan kaldırılmasında görevlidir. Bu reseptörlerin, hasarlı lipoproteinlerin tanınması, ortadan kaldırılması ve taşınması, patojenlerin uzaklaştırılması, hücre içi kargo taşıma gibi bir dizi işleve sahip oldukları bilinmektedir [89]. Dokuz heterojen sınıfa ayrılmış bu reseptörlerden A sınıfının opsonin aracılı olmayan fagositozda rol oynadığı bilinmektedir. A sınıfını scavenger reseptör proteinlerinin böceklerde bulunduğu dair bir bilgiye ulaşılamamıştır. Ancak böceklerde, *Drosophila*'da C sınıfı reseptör (DmSR-C) bulunmaktadır ve bu sınıf üyeleri memeli SR-A'sına benzer işleve sahiptir. Genel olarak, böceklerdeki bu sınıfa ait proteinlerin bakteri tanımda rol oynayan büyük fagosit reseptörleri olduğu düşünülmektedir. *Tenebrio molitor* hemositlerinde, *Drosophila* C sınıfı reseptör proteinlerine benzer proteinler tespit edilmiş ve bu reseptörlerin bakteri ve mantara özgü ligandların tanınmasında gerekliliği gösterilmiştir. *T. molitor* C sınıfı reseptör transkriptlerinin, böceğin tüm gelişim aşamalarında ve tüm dokularında yapısal olarak var olduğu gösterilmiştir [90]. Çalışmamızda tespit edilen ve insan Endoplasmin (94 kDa glucose-regulated protein) proteinine sekans benzerliği

gösteren uncharacterized protein (H9JT91)'in scavenger reseptör protein işlevine sahip olabileceği düşünüldü.

Memeli Toll-like receptor (TLR)'leri patojenle ilişkili moleküler paternlerin (PAMP) tanınmasında önemli rol oynar. TLR'lere ligantın bağlanması ile hücre içi sinyal yolları uyarılır. Bu uyarı sayesinde doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri çeşitli molekülleri sentezler ve salgılar. Aktivasyon ve işlev bakımından insan ve böcek TLR'leri arasında farklar olduğu bilinmektedir [91]. TLR'lerin hücre içinde özellikle endozomlarda bulunması, membranların ligand bağlama özelliklerinin sürekli kontrol edildiği şeklinde açıklanmaktadır [92]. Çalışmamızda tanımlanan uncharacterized protein (H9JT91)'nin insan Endoplasmin proteinine dizi benzerliği tespit edildi. Bu durum larva gelişimi ile hücre bölünmesinin hızlanmasına ve yeni sentezlenen membranların belirli moleküler desenler açısından endozomlar aracılığı ile sürekli kontrol edilmesine işaret edebilir.

Yeni sentezlenen, katlanmamış polipeptitlerin ER'ye girişi katlama ve/veya işleme kapasitesini aşarsa, ER'nin normal fizyolojik durumu bozulur. Bu koşullar altında, katlanmamış protein yanıt (UPR) olarak adlandırılan sinyal yolları aktive olur. Bu durum bazı moleküllerin işlev kazanması ile düzeltilir. Bu moleküllerden biri ATF6 proteinidir. Katlama kapasitesini artırarak ER'deki protein yükünün azaltılmasında ve yeniden ER homeostazının sağlanmasında görev alır [93]. Fizyolojik koşullar altında farklı moleküllerce inhibe edilen ATF6'nın 30 °C uygulamasında tespit edilmesi homeostasiste bir bozulmadan ziyade larva gelişimine bağlı ER ve/veya golgi yükünün artmış olabileceği ihtimalini akla getirdi.

Bir hücrenin kaderi, hücrenin hayatta kalmasını teşvik eden (Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w) ve hücre ölümünü teşvik eden (Bax, Bak ve Bad) molekülleri tarafından belirlenir. BAD'da hücre ölümünü teşvik eden moleküller arasında yer alır. Hücre ölümüne yönlendiren moleküllerin mitokondriye translokasyonu apoptotik süreçleri tetikler. Apoptozis ise doku döngüsü ve hayvan gelişimi sırasında önemli olan doğal bir hücre eliminasyon sürecidir [94]. Çalışmamızda insan BAD proteini benzeri 14-3-3 protein zeta (A0A194PP56) tespit edildi. Bu proteinin 30 °C uygulamasında tespit edilmesi gelişimsel süreçlerle olan ilişkine işaret edebilir.

4.6.3. Yirmi dört Saat 37 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler

Ökaryotik başlama faktör 5A (eIF5A), tüm ökaryotlarda bulunan küçük bir proteindir. EIF5A yüksek oranda korunmuş bir proteindir ve translasyon sonrası sentezlenen hipusin amino asiti içerir. eIF5A, hücresel proliferasyon ve apoptozda yer alır, hücre canlılığını, büyümesini ve döngüsünü kontrol eden proteinlerin sentezini teşvik eder. Ayrıca spesifik bazı mRNA'ların çekirdeğe taşınmasını sağlayarak protein sentezini kolaylaştırır. eIF5A'nın ısıya, oksidatif ve ozmotik strese tolerans sağladığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [95]. Çalışmamızda sıcaklıktan etkilenen proteinler arasında eIF5A'nın varlığı 37 °C'nin oksidatif hasara neden olabileceği şeklinde yorumlandı.

Çalışmamızda da tanımlanan süksinat-KoA ligaz, süksinil-KoA ve ADP'nin (veya GDP'nin) süksinil KoA, süksinat ve ATP'ye (veya GTP) dönüşümünü katalizler. Bu işlem substrat düzeyinde fosforilasyon olarak tanımlanır. Bu reaksiyonun ürünleri arasında bulunan süksinat hücre içinde çok sayıda fonksiyona sahip bir TCA döngüsü metabolitidir. Ayrıca süksinat, doğuştan gelen bağışıklığın düzenlenmesinde önemli bir işleve sahiptir. Hücre içi süksinat miktarındaki değişikliklerin histonlarda ve DNA metilasyonunda etkisi oldukça büyüktür. Dolayısı ile hücrelerin epigenetiğini ve gen ekspresyonunu da değiştirebilir [96]. Ek olarak süksinat, hipoksik yanıtın kritik bir aracıdır. Oksidatif stresin süksinat yollarındaki enzimlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Son olarak, süksinatın hücre dışına para- ve endokrin modunda etkileri söz konusudur [97]. Hücre içi işlevlerine ek olarak, süksinatın, soğuğa maruz kaldığında termojenezi düzenlemek için sistemik bir sinyal oluşturduğu da bilinmektedir [96]. Çalışmamızda süksinat-KoA ligaz 37 °C uygulamasında tespit edilmiştir. Bu durum proteinin ait olduğu sıcaklık uygulamasının hatalı tespitinden kaynaklanabileceği gibi, sığağa ve soğuğa gösterilen stres tepkisinin benzerliği olarak da düşünülebilir.

Protein disülfid izomeraz (PDI, EC 5.3.4.1) bir tiyol-disülfid oksidoredüktaz olup, protein katlanması ve açılmasında hedef proteinlerin oksidasyonunu, indirgenmesini ve izomerizasyonunu katalizler. Enzim aynı zamanda şaperon aktivitesi göstererek proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olur. Genel olarak, hayvan hücrelerinde bol bulunur ve bazı üyeleri insanda diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar ile yakından ilişkili süreçlerde yer alır. Hayvanlardakine benzer şekilde bitki protein disülfid

izomerazları da protein katlanmasında, programlanmış hücre ölümü ve biyotik/abiyotik strese yanıtta yer almaktadır [98]. Son çalışmalar, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıkların hem fizyolojisinde hem de patofizyolojisinde protein disülfid izomerazın rolüne işaret etmektedir. Ayrıca bu enzimin hipoksik koşullarda up regüle edildiği tespit edilmiştir. Bugüne kadar, protein disülfid izomeraz geni nakavt edilmiş bir kemirgenin yaşayabildiği tespit edilmemiştir. Bu da normal hücresel fizyolojide bu enzimin önemini vurgulamaktadır [99]. Protein disülfid izomerazın glikoz ile regüle edilen bir şaperon olarak hücre içi ifadesinde meydana gelen artış oksidatif strese işaret etmektedir [100]. Çalışmamızda protein disülfid izomerazın tespit edilmesi protein katlanma mekanizmalarındaki işlevine işaret edebilir.

LARK birçok dokuda eksprese edilen bir proteindir ve çok çeşitli RNA setleri ile etkileşime girebilir. Bu RNA setleri nörotransmitter biyosentezi, sinaptik iletim, zar uyarımı, nükleer/sitoplazmik taşıma, sinyal iletimi, hücre yapışması, çoğalması ve ölümü dahil olmak üzere birçok farklı süreçte yer alan proteinleri kodlar. Dolayısı ile LARK'ın birçok hücresel süreci düzenlemesinden bahsetmek mümkündür [101]. *Drosophila* nöronlarında LARK'ın aşırı ekspresyonunun aritmik yetişkin eklosyonuna ve lokomotor aktiviteye neden olduğunu gösterilmiştir [102]. *D. melanogaster*'de lokomotor aktivitenin düzenlenmesinde beslenme stresi ve ortam sıcaklığı gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir [103]. Yine sıcaklıktan kaynaklanan stresin arı üreme ve uyum ile ilişkili özellikleri olumsuz etkilediği belirtilmiştir [104]. Çalışmamızda 37 °C uygulamasında RNA-bağlayıcı protein lark'ın tanımlanması lokomotor aktivite ile sıcaklık arasında muhtemel bir etkileşimi akla getirdi.

Protein NipSnap hem mitokondri dış zarında hem de iç zar boşluğunda yerleşiktir ve çeşitli sitozol proteinleri ile etkileşime girer. Bu nedenle, Protein NipSnap hücre iskelet proteinleri arasında kabul edilir ve ayrıca doğuştan gelen bağışıklık tepkileri sırasında mitokondri ile ilgili sinyal iletiminde rol oynar [105]. NipSnap proteinleri mitofajide yer alır ve farklı dokularda eksprese edilir. İşlevsel bir Nipsnap1'den yoksun zebra balığında nöron kaybı, azaltılmış motor aktivitesi, artan oksidatif stres ve azalmış mitofaji görülmüştür [106]. *D. melanogaster*'da ısı, oksidatif stres ve yaşlanma gibi çeşitli süreçlerde NipSnap proteinleri dolaylı yollardan etkilidir [107]. Çalışmamızda 37 °C

uygulamasında NipSnap proteininin tespiti oksidatif stresin varlığını ait bir belirteç olarak düşünülebilir.

4.6.4. Kırk sekiz Saat 18 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler

Mitokondriyal zarlar, katlanmaları ve yüksek protein içeriği sebebi ile özel lipid yapılarına gereksinim duyarlar. Diğer organellerin aksine, mitokondri kardiyolipinler (CL'ler) içerir ve bu proteinler mitokondriyal iç membranda lokalizedir. Mitokondri fosfolipid içeriğinin %20'sini kardiyolipinler oluşturur [108]. Ökaryotlarda, kardiyolipin de novo sentezlenir ve bu durum mayadan memelilere kadar oldukça korunmuş bir süreçtir. CL'ler biyoenerjetik, apoptoz, mitokondriyal dinamikler ve mitokondriyal yapı dâhil olmak üzere çok sayıda mitokondriyal süreçte yer alır [109]. Sıcaklık stresinin etkisi ile mitokondri kardiyolipin içeriğinde bir artış meydana gelir ve bu artış sayesinde mitokondriyal zarların fiziksel durumu değiştirilir. Bu değişimler sayesinde mtDNA stabilitesi artırılarak hücreler sıcaklık stresine adapte olur [110]. Düşük sıcaklıklarda biyoenerjetik homeostazı sürdürmek için mitokondrial performansta değişiklikler meydana gelir. Bu değişimlerden biri de mitokondrial solunum kapasitesinde gözlenen artıştır. Düşük sıcaklıklarda ektotermelerde mitokondrial fonksiyon artar. Bu durum biyokimyasal reaksiyonların düşük sıcaklıklarda daha yavaş ilerlemesinden kaynaklanır. Sıcaklığa uyumda enerji dengesinin korunması için mitokondriyal hacim artışlarına ilaveten kapasitede de artışlar gerçekleşebilir [111]. Çalışmamızda 18 °C sıcaklığa ait proteinler arasında yer alan uncharacterized protein (H9JXB6)'in CL açıl grubunun yeniden modellenmesi, düşük sıcaklığın mitokondri enerji kapasitesinde ve hacminde bir artış meydana getirmesi ve enerji dengesinin bu değişimlerle korunması süreçlerini akla getirdi.

Hücre hareketliliği mekânsal ve zamansal olarak karmaşık bir dizi olayın birlikteliğini gerektirir. Hücresel hareket aktin, mikrotübüller (MT'ler) ve yapışma bölgelerinin koordineli olarak düzenlenmesi ile gerçekleşir. Meme kanser hücre hattı ile yapılan bir araştırmada bilinen herhangi bir sinyal molekül ailesine ait olmayan Memo proteini, yeni ErbB2 efektörü olarak tanımlanmıştır. Memo geni nakavt hücrelerde lamel/lamellipodia yapıları oluşurken, hücre hareketliliğinin azaldığı gösterilmiştir. Memo proteininin mikrotübül dinamiklerini ve aktin ağının organizasyonunu düzenlediği bilinmektedir [112, 113]. Düşük sıcaklıkların etkisi ile hücre iskeletinin

yeniden düzenlenmesine yol açan aktin depolimerizasyonu gerçekleşir [114]. Aktinlerin down regülasyonu, soğuk toleransının artmasına katkıda bulunur [115]. Çalışmamızda 48 saat boyunca 18 °C sıcaklığa maruz kalan larvalarda Memo proteini tespit edildi ve durum aktin yapının düşük sıcaklık etkisi ile yeniden düzenlendiği ihtimalini akla getirdi.

Memelilerde golgi, veziküllerin ve membran tübüllerinin üretimini ve taşınmasını düzenleyen çok sayıda protein tarafından kontrol edilir. Golgi zarları, vezikülleri ve tübülleri oluşturmak için dinamik olarak değiştirilir. Bu sayede hem kargo oluşturulur hem de organelin morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğü korunur. Golgi zarlarının vezikül ve tübül oluşturma yeteneği değiştirilirse golginin yapısal ve fonksiyonel özellikleri önemli ölçüde değiştirir. PLA enzimlerinin de golgi fonksiyonu ve membran tübülleri oluşturulması üzerinde doğrudan etkileri vardır. Bu enzimlerden biri de platelet activating factor acetylhydrolase Ib'dır. Bu enzim SGNH_hydro domaini taşır. Çalışmamızda 48 Saat 18 °C uygulamasında tanımlanan SGNH_hidro domain-içeren protein (H9J0E8) aynı domaini taşıyan bir proteindir. Ayrıca PLA enzimleri yağ asitlerini parçalayarak serbest yağ asidi ve lizofosfolipid üretirler. Lizofosfolipidler ve serbest yağ asitleri ise sinyal iletiminde, fosfolipid sentezinde ve zarın yeniden şekillenmesinde yer alır. Domain benzerliği üzerinden yapılan değerlendirmede 18 °C'nin golgi dinamiklerini değiştirebilecek etkileri olabileceği, salgı ve taşıma işlevlerinde farklılıklar meydana getirebileceği sonucuna ulaşıldı [116].

4.6.5. Kırk sekiz Saat 30 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler

Bu uygulamaya özgü proteinler 24 saat 30 °C uygulamasına ait proteinlerle karşılaştırıldı ve benzer yollara yerleşim gösterdikleri tespit edildi. Dikkat çeken husus ise yollara yerleşim gösteren protein türlerinin sayısal artışı oldu.

4.6.6. Kırk sekiz Saat 37 °C Proteinlerinin Yer Aldığı Metabolik Süreçler

Fruktoz-bifosfat aldolaz hem glikoliz hem de glukoneojenez için gerekli bir enzimdir. Ayrıca AMP ile aktive edilen protein kinazı düzenleyerek glikoz sensörü olarak çalışır ve değişen ortama uyum sağlamak için organizmaya ihtiyaç duyduğu metabolik esnekliği sağlar. Enzim sayesinde aynı anda birden fazla karbon kaynağının verimli

şekilde katabolize edilmesi mümkündür [117]. Çalışmamız özelinde de fruktoz-bifosfat aldolazun varlığı farklı enerji süreçlerinin eş zamanlı kullanılmasına işaret edebilir.

Sıcaklıkla birlikte artan metabolik aktiviteye paralel olarak hücre içi ROS miktarı artar. ROS, lipidlerin, proteinlerin ve glikozun oksidasyonunu teşvik ederek glikasyon son ürünlerinin oluşumunu hızlandırır. Artan glikasyon son ürünleri ise daha fazla ROS ve RNS oluşumunu tetikler. Lipit, protein gibi makromoleküllerin glikasyonu hücre için sakıncalıdır ve bu ürünlerin uzaklaştırılması gerekir. Ancak glikasyona uğrayan bu moleküllerin uzaklaştırılması da sıkıntılıdır. Örneğin glikasyona uğrayan proteinlerin hacimleri artar ve hasarlı proteinlerin proteazoma girişi mümkün olmaz. Degrede edilmeyen hasarlı ürünler ise hücre içinde birikir. Çalışmamızda 37°C'de 26S proteazom düzenleyici alt ünite RPN11 ve F-aktin-kep protein alt ünite alfa tanımlanmıştır. Bu proteinlerin varlığı hücre içi proteinlerin glikasyonuna ve hasarlı proteinlerin uzaklaştırılması süreçlerine yorumlanabilir [118].

SUMOlasyon önemli bir protein modifikasyon tipidir ve hedefi genellikle çekirdekte bulunan transkripsiyon faktörleridir. Transkripsiyon kofaktörleri DNA'ya bağlı diğer faktörlerle etkileşime girerek transkripsiyonu etkiler. Transkripsiyon kofaktörlerinin SUMOlasyonu ise genellikle transkripsiyonun azalması ile sonuçlanır [119]. Çalışmamızda da tanımlanan ve SUMOlasyon süreçlerinde yer alan DJ-1 beta (protein dj-1beta) hücre çekirdeğinde bulunan bir proteindir ve çok sayıda metabolik süreçte görev alır. Ayrıca bu protein mitokondri fonksiyonu ile yakından ilişkilidir ve proteinin miktarına bağlı olarak mitokondri morfolojisi ve aktivitesi de değişmektedir [120]. Çalışmamızda 37 °C'de DJ-1 beta proteinin tespiti muhtemel mitokondriyal fonksiyon artışına ve daha fazla enerji üretilmesine yorumlanabilir.

4.7. Süre Değişiminin Etkileri

26S proteazomlar önemli metabolik süreçlerin kontrolünde rol alırlar. Yapılan çalışmalar, hücresel proteinlerin %80-90'ının proteazomlar tarafından parçalandığını göstermiştir. 26S proteazomu sitozolde yanlış katlanmış veya hasar görmüş salgı proteinlerini Ub ve ATP'ye bağımlı şekilde parçalar. Bununla birlikte sitozolik yıkımdan kaçan peptitlerin bir kısmı ATP ve ABC proteinleri aracılı taşıma ile ER'a ve lizozomlara taşınır [121]. ABC taşıyıcı proteinleri ER'a ilaveten plazma zarı, mitokondri, peroksizom ve lamelli cisimlerde de bulunmaktadır [122]. Çalışmamızda 48

saat uygulamasında tespit edilen ve tamamı proteozom ile ilgili olan proteinlerin ABC ailesi protein aracılı taşıma yollarına yerleşim gösterdiği görüldü.

Demir hem böcekler hem de patojenler için fizyolojik süreçlerde oldukça önemli bir iyonudur. Patojen saldırısına uğrayan bir böcekte demir konsantrasyonu ferritin ve transferin tarafından ayarlanır. Yüksek veya düşük sıcaklığın *O. furnacalis* larvalarında ferritin ekspresyonu üzerinde güçlü etkileri gösterilmiştir. Larvalar sıcaklık stresi ile bu şekilde başa çıkmaktadır. Ayrıca oksidatif hasara karşı savunmada ferritinden demir salınımının önemli etkileri olduğu belirtilmiştir [123]. Çalışmamızda 24 saatte transferrin (H9JPG9), 48 saatte ise ferritin (A0A0N1PIQ5EC) tanımlandı. Sıcaklığın artan süreye bağlı etkisi ile demir regülasyonunu transferinden ferritine değiştirdiği görüldü.

Yirmi dört ve 48 saat karşılaştırmasında dikkat çekici bir diğer fark ilerleyen süreye bağlı olarak transkripsiyonel düzenlemede RUNX1'in devreye girmesidir. Runx genleri, Runt DNA bağlama domaini tarafından tanımlanan proteinleri kodlar [124]. *Drosophila* Runx paraloglarının, böcek türlerinde yüksek oranda korunduğu tespit edilmiştir [125]. Karşılaştırmalı sekans analizleri bu gen ailesinin metazoalarda bulunduğunu göstermektedir. *D. melanogaster*'de 4 adet Runx geni tespit edilmiştir. Model organizmalarla yapılan çalışmalar RUNX genlerinin ve proteinlerinin hayvan gelişiminde anahtar transkripsiyonel düzenleyiciler olduğunu göstermektedir [124]. Knock-out farelerde yapılan çalışmalarda RUNX1'in kesin hematopoez için gerekli olduğu tespit edilmiştir. RUNX transkripsiyon faktörleri posttranslasyonel seviyede düzenlenerek transkripsiyonel etkileri, stabilite ve lokalizasyonları ayarlanabilmektedir. Asetillenen RUNX genleri transkripsiyonel aktiflik kazanırken, metilasyona uğradıklarında DNA'ya bağlanmaları artabilmektedir. Fosforilasyona uğradığında hücresel süreçlerde baskılayıcı rol üstlenmektedir [126]. *G. melleonella*'ya ait A0A212F9V0, H9J4D7, A0A212EQ66, A0A194PMM8, A0A194PG29 ve A0A0N0PB72 proteinleri RUNX1 benzeri olup 26S proteaz proteinleridir. 48 saat uygulamasında tespit edilen bu proteinlerin çok sayıda ve karmaşık süreçlerle ilişkili olması muhtemeldir. Bu proteinlerin işlevinde etkili PTM bilinmesi halinde hücresel süreçler hakkında bir değerlendirme yapılması mümkün olabilir.

Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları arasındaki farklardan bir diğeri de membran taşıma trafiğinde tespit edilmiştir. Yirmi dört saate ait grup proteinlerinin GLUT4'ün plazma membranına taşındığı süreç, 48 saat uygulamasında membran trafiği golgi ve endoplazmik retikulum yönünde değişmiştir. GLUT4 insülin-bağımlı şeker taşıyıcı bir proteindir. İnsülinin hücre reseptörüne bağlanmasının ardından GLUT4 hücre içi depolardan plazma zarına taşınır ve dolaşımdan glikoz alımı başlatılır. Bazı farklılıklarına rağmen, hücre içi insülin sinyal yolları, memeliler ve böcekler arasında büyük ölçüde korunmuş gibi görünmektedir. *Drosophila* hücrelerinin şeker alımını düzenlemek için memelilere benzer taşıma mekanizmalarına sahip olduğu tespit edilmiştir [127]. GLUT4 benzeri *G. mellonella* proteinleri 14-3-3 protein zeta, tübülün beta-1 zinciri, tübülün alfa zinciridir. Taşıma süreçleri arasında GLUT4'ün tespiti 24 saat için enerji ihtiyacının artışı olarak yorumlanabilir.

Koatomer alt ünite delta, F-aktin-şapka protein ait ünite alfa proteinlerinin 48 saat golgi-ER yollarında yer aldığı tespit edildi. ER ağı, zarlı yapıların en büyüğü olarak sitoplazmanın büyük kısmını kaplar. Ökaryot hücrelerde, yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık üçte biri, glikozile edildikleri, katlandıkları ve/veya protein kompleksleri halinde birleştirildikleri ER'ye girer. ER yalnızca doğru katlanmış ve uygun şekilde birleştirilmiş proteinleri salgılar ve sıkı bir kalite kontrol mekanizması tarafından değerlendirilir. Bununla birlikte, ER'de protein katlanması, çeşitli abiyotik ve biyotik stresler tarafından kolayca bozulmakta ve ER'de yanlış/katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olmaktadır. Metazoon hücreleri bir dizi adaptif yolak sayesinde ER işlev bozukluğuna hızla tepki verir. Bu tepki ER stres yanıtı (ESR) olarak tanımlanır. ESR ayrıca lipid/glikolipid dengesizlikleri, redoks koşullarındaki değişiklikler gibi sebeplerle de tetiklenebilir [128]. Bu bilgiler ışığında 48 saat uygulaması için ER stres yanıtından bahsetmek mümkün olabilir.

N-bağılı glikozilasyon neredeyse tüm ökaryotlarda tespit edilmiş kimyasal olarak en karmaşık ve yaygın protein modifikasyonudur. Bu modifikasyonlar proteinin biyofiziksel özelliklerini düzenler. Glikozilasyonun proteinlerin termodinamik, kinetik ve yapısal özelliklerini değiştirebildiği ve amino asit dizi bilgisinin ötesinde ek bilgiler içerdiği ortaya konmuştur. Ubikuitinasyon gen transkripsiyonu, hücre döngüsü, DNA onarımı, apoptoz gibi temel hücresel süreçleri düzenler. Ökaryotlarda ubikuitinasyona uğrayan proteinler proteazoma, lizozoma veya otofagozoma taşınır. [129]. NEDD8

ubikuitin benzeri bir proteindir ve NEDD8'in substratı olan proteine spesifik bağlanması neddilasyon olarak adlandırılır. Neddilasyon dinamik ve geri dönüşümlü bir süreçtir. Ubikuitinasyondan farklı olarak, neddylation substrat degradasyonunda görev almaz. Ancak posttranslasyonel modifikasyon olarak, substratı olan proteinlerin aktivasyonunu düzenler, hücre döngüsü ve sinyal iletimi gibi hücresel süreçleri kontrol eder [130]. Deubikuitinasyon ise hücrede monoubikuitin seviyelerinin korunması, protein bozunumunun proteazomal seviyede düzenlenmesi, histon deubikuitinasyon yoluyla kromatinlerin yeniden düzenlenmesi, hücre döngüsü regülasyonu, DNA hasar onarımı, bazı enzimlerin aktivasyonu ve endositoz gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemlidir. Tespit edilen tüm protein modifikasyonlar değerlendirildiğinde 48 saat uygulamasında görülen deubikuitinasyon ve neddilasyon süreçlerinde yer alan tüm *G. melleonella* proteinleri 26S proteazom bileşenleridir. PTM'ların 48 saat proteinlerin için tanımlanmasının hücre döngüsü ve sinyal iletim süreçleri ile ilgili olabileceği değerlendirildi.

Yirmi dört saat grup proteinlerinde tespit edilen metilasyonun gelişim ve homeostasis ile ilgili olabileceği düşünüldü. Limpet protein ve vezikül-birleştirici ATPaz (EC 3.6.4.6) bu süreçlerde yer alan *G. melleonella* proteinleri olarak belirlendi. Limpet protein ve vezikül-birleştirici ATPaz proteinlerinin çok sayıda karmaşık süreçte görev alabileceği düşünüldü. Bu süreçlerin metilasyon üzerinden değerlendirilmesi şu şekildedir. Proteinlerin Lys ve Arg dizileri üzerinden metilasyonu MAPK, WNT, BMP, Hippo ve JAK-STAT gibi hücresel sinyal yollarının düzenlenmesinde etkili bir modifikasyondur. Ayrıca histon metilasyonu epigenetik kontrol sağlayarak, gen ekspresyonunu baskılar veya aktive eder. MAPK evrimsel olarak korunmuş, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve stres tepkileri dâhil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen anahtar sinyal yollardan biridir [131]. WNT, hücre kaderinin belirlenmesi, çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozunun düzenlenmesi gibi birçok hücresel fonksiyonda yer alır. WNT yetişkin organizmalara, bağırsak epitel hücrelerine, deri ve hematopoietik hücrelere kök hücre benzeri yetenekler kazandırır. Bu sayede ilgili dokular muazzam bir rejenerasyon, spesifikasyon, farklılaşma ve iyileşme yeteneğine sahip olur [132]. BMP sinyali, metazoa'da üreme ile ilişkili birden fazla süreci düzenler. Germ hattı spesifikasyonu, çoğalma, hücre göçü ve gametogenez genellikle BMP'ye bağlı yürür. Hippo ve JAK-STAT yolları histon/histon olmayan protein metilasyonu

ve modifikasyonlar sayesinde kromatin modelleme, gen transkripsiyonu, protein sentezi, sinyal iletimi ve DNA onarımı gibi hücresel fonksiyonları kontrol etmektedir [133].

Yirmi dört ve 48 saat karşılaştırmasında göze çarpan bir diğer fark uyarana karşı geliştirilen hücresel cevaptır. Hücresel stres yanıtı, fizyolojik/patofizyolojik öneme sahip evrensel bir mekanizmadır. Çevresel kuvvetlerin makromoleküllere verdiği zarara karşı hücrelerin savunma tepkisini temsil eder. Hücresel stres yanıtının birçok yönü strese özgü değildir. Çünkü hücreler, stresin türüne bakmaksızın makromoleküler seviyede hasarı algılar. DNA ve protein hasarı ile aktive olan hücresel mekanizmalar birbirine bağlıdır ve ortak öğeler içerir. Homeostazı yeniden kurmaya yönelik hücresel tepkiler ise stres etkenine özgüdür. Tüm organizmalar stres proteinlerine sahiptir ve evrensel olarak korunan stres proteinleri, minimum stres proteomu olarak kabul edilebilir. Hücresel stres yanıtı hücre döngüsü kontrolü, şaperonlar ile proteinlerin onarımı, DNA ve kromatin stabilizasyonu ve onarımı, hasarlı proteinlerin uzaklaştırılması gibi bir dizi hücresel işlevi içerir. Stres proteinleri redoks duyarlı proteinlerden, moleküler şaperonlardan ve DNA onarım enzimleri gibi makromoleküler hasarın algılanması, onarılması ve en aza indirilmesinde yer alan proteinlerden meydana gelir. Stres proteinleri mRNA düzeyinde, protein döngüsünün modülasyonu ile veya posttranslasyonel modifikasyon seviyelerinde düzenlenir. Kronik strese maruz kalan hücreler, Hsp60, Hsp70, peroksiredoksin ve süperoksit dismutaz dâhil olmak üzere çok yüksek seviyelerde çeşitli stres proteinleri eksprese eder. Aynı stres proteinleri ile özgün stres tepkisi, stres etkenine özgü moleküller arası etkileşimlerle, translasyon sonrası modifikasyonlarla ve stres proteinleri içinde bir grubun farklı düzeylerde uyarılması ile elde edilir [134]. Stresli olmayan koşullar altında protein katlanmasına yardımcı olan HSP70 ve HSP90'ın farklı streslerde farklı görevler üstlendiği bilinmektedir. Stres durumunda HSP70 yeni meydana gelen proteinlerin katlanmasına yardımcı olurken, HSP90'ın önceden var olan, özellikle hidrofobik substrat bağlama bölgelerine sahip proteinlerin korunmasına veya yeniden katlanmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu iki şaperon proteinlerin kaderini belirlemede farklı rollere sahiptir; HSP70 ubiquinasyonu ve proteazom-yönelimli protein degradasyonunu sağlarken, HSP90 ubiquinasyonu engelleyebilmektedir [135]. Çalışmamızda 24 saat 18 °C uygulamasında Hsp70, 48 saat 30 °C'de ise peroksiredoksin tespit edilmiştir. Sonuçlar

değerlendirildiğinde Hsp70 ile düşük sıcaklık arasında bir bağlantı olabileceği düşünüldü. Peroksiredoksinin ise stres koşullarında farklı düzeyde ifade edilen stres proteinlerinden olması muhtemeldir.

Böcekler, antikor aracılı adaptif bağışıklık tepkisine eşdeğer bir sisteme sahip değildir. Ancak bazı böcekler, bir patojen, patojen türevli materyal veya öldürücü olmayan strese maruz kaldığında “bağışıklığı hazırlama” adı verilen bir olgu sergiler. Bu süreçte, dolaşımdaki hemositlerde ve antimikrobiyal peptitlerin miktarında artış gözlenir. Bağışıklığı hazırlama, omurgalıların adaptif bağışıklık tepkisine eşdeğer olmasa da sonraki stres kaynaklarına karşı bir dereceye kadar koruma sağlar. Ancak bu fenomenin başlatılması ve sürdürülmesi metabolik olarak oldukça maliyetlidir [136]. İmmün sistemin biyotik ve abiyotik çevresel koşullara göre şekillendiği bilinmektedir. Yüksek sıcaklıklarda bağışıklık tepkisi hızlı bir şekilde en üst düzeye ulaşır. Ancak sıcaklık artışı ile immün yanıtın enerji maliyeti de artar. Bu durum immün yanıtın süresini kısaltır [137]. Böcek bağışıklık sistemi üzerinde etkili olan abiyotik faktörler arasında sıcaklık ve diğer fiziksel stresler yer alır. *G. mellonella* larvalarını hafifçe sallamanın, AMP'lerin ekspresyonunda ve dolaşımdaki hemositlerin yoğunluğunda bir artışa neden olduğu ve bağırsak epitel bütünlüğünü bozduğu bildirilmiştir. Ayrıca inkübasyon sıcaklığındaki değişikliklerin, immün cevabı uyardığı bilinmektedir. 37 °C'de 1 saat inkübe edilen *G. mellonella* larvalarının *Candida albicans* enfeksiyonuna karşı daha iyi korunduğu tespit edilmiştir. *G. mellonella* larvalarının 30 ve 37 °C'de 24 ve 72 saat inkübe edildiğinde uzun süreli sıcaklık uygulanan grupta hayatta kalma oranlarında düşüş gözlenmiştir. Süre ilerledikçe artan sıcaklığa ve enfeksiyona karşı mücadele enerji açısından maliyetli olmaya başlamıştır. Bir mikrobiyal patojene maruz kaldığında, larvada çok çeşitli AMP'lerin ekspresyonu gerekli olurken, fiziksel bir zorlanmaya (örn. sallama, sıcaklık değişimi, yaralanma) yanıt sadece bir grup antimikrobiyal peptit uyarılmasına neden olmaktadır. Böceklerin humoral bağışıklık tepkisi, yağ cisimciği hücreleri ve hemositler tarafından antimikrobiyal peptitlerin ve melanin üretimini kapsamaktadır. Değişen sürenin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri incelendiğinde 48 saatte nötrofil degranülasyonu gözlemlendi. Kathepsin D, CCT-beta (T-kompleks protein 1 alt ünite beta), ısı şoku protein 70 ve fosfoglukomutaz bu yolağa yerleşen *G. mellonella* proteinleri oldu. Böceklerin bağışıklık sistemi, memelilerin doğuştan gelen bağışıklık tepkisine pek çok benzerlik gösterir. Böcek hemositleri,

memeli fagositik hücrelerine (örn. nötrofiller, makrofajlar) yapısal ve işlevsel benzerlikler gösterir. Bu hücreler fagositoz yapabilir, süperoksit üretebilir ve degranülasyon yapabilir. Degranülasyon ile nötrofilin çevreye verdiği tepki de düzenleyebilir [136]. Hemositler fagositoz ile patojenleri etkisizleştirir, apoptotik hücreleri uzaklaştırır ve doku rejenerasyonu sağlar. Hem böcek hem de memeli humoral tepkilerinde melanizasyon, pıhtılaşma ve AMP salgılanması gibi süreçler yer alır. Yağ cisimcikleri tarafından üretilen AMP'ler, hemolenfteki humoral bağışıklık sistemini oluşturur. Toll/ Toll-like reseptör ve immun eksikliği (IMD) yolakları, çok çeşitli inflamasyon unsurları, doğuştan gelen bağışıklığın sinyal algılama süreçlerinde yer alan tüm unsurlar böceklerde de mevcuttur [138]. Bu bilgiler çerçevesinde 48 saat uygulamasında hemositlerin nötrofillere benzer şekilde sıcaklığa tepki geliştirmesi olasılığı mevcuttur. Süre-sıcaklık etkisi ile apoptozda artış ve bu duruma paralel olarak da hemositler de fagositoz artışı ihtimali de düşünülebilir.

Yirmi dört ve 48 saat uygulamaları arasında lipit metabolizmasının bakımından da farklılıklar gözlemlendi. Yirmi dört saat uygulamasına özel olarak keton metabolizması bileşenleri tespit edildi. 3-hidroksi-3-metilgutaril koenzim A sentaz (EC 2.3.3.10) ve mitokondriyal asetil-KoA asetiltransferaz keton metabolizmasında yer alan *G. mellonella* proteinleri oldu. Keton metabolizması incelendiğinde keton cisimlerinin, suda çözünebilen, küçük lipid türevli moleküller olduğu ve tüm yaşam domainleri için enerji açısından önemli bir kaynak oluşturduğu görülür. Karbonhidrat kaynağının yokluğunda ketonlar enerji kaynağı olarak kullanılır [139]. Keton cisimlerinin böceklerde oluşumu, kullanımı, olası işlevleri ve ketojenez yolağı tespit edilmiştir. Böcek yağ cisimciği ile elde edilen sonuçlar memelilerde ve böceklerde ketojenez arasında benzerlik olduğunu göstermiştir. Asetoasetat ve D-3-hidroksibutirat böcek dokularında tespit edilen keton cisimleridir [140]. 3-hidroksi-3-metilgutaril koenzim A sentaz (EC 2.3.3.10) ve asetil-KoA asetiltransferazın 24 saatte uygulamasında tespit edilmesi enerji ihtiyacında meydana gelen artışa yorumlandı. 48 saat uygulamasında ise kardiyolipin proteinlerinin açıl zincirlerinin yeniden şekillenmesinde görev alan 2 *G. mellonella* proteini, uncharacterized protein ve gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (EC 1.1.1.8), tespit edildi. Kardiyolipinin yeniden modellenmesinin çalışmamızdaki etkisi önceki başlıklarda tartışıldı.

Yirmi dört saat grup proteinlerinden kalretikulin, mitokondriyal ATP sentaz alt ünite O ve ATP sentaz alt ünite gama'nın mitokondriyal biyogenez ile ilgili olduğu tespit edildi. Mitokondri biyogenez yalnızca 24 saatte görüldü. Mitokondri ile ilgili süreçler incelendiğinde organelin hücre içi sinyal kaskadlarının çalışmasını düzenlediği, reaktif oksijen türleri (ROS) ürettiği, yağ asitlerinin β -oksidasyonunu gerçekleştirdiği görülür. Mitokondri aynı zamanda aminoasit metabolizmasına, piridin sentezine, fosfolipid modifikasyonlarına, kalsiyum düzenlemesine ve hücrelerin hayatta kalmasına, yaşlanmasına ve ölümüne ait süreçlere katılır. Mitokondri biyogenezi, yeni sentezlenen proteinlerin var olan mitokondrilere alınması ve ardından fisyon yoluyla parçalanması olarak özetlenebilir. Mitokondriyal biyogenezin gelişimsel sinyallerle ve çevresel stresörlerle uyarıldığı bilinmektedir. Mitokondriyal biyogenez sonrasında oksidatif fosforilasyon kapasitesinde artış, oksidatif strese azalma ve mitokondriyal işlev bozukluklarının onarımı gerçekleştirilir [141]. Bu bilgiler çerçevesinde 24 saatte mitokondri dinamiklerinin sıcaklık etkisi ile değişmesi veya hızlı büyüme ve gelişim gösteren son dönem larvada mitokondri biyogenezinin artması muhtemel sonuçlar arasında yer alır.

Sonuç ve Öneriler

Sıcaklık canlılar için oldukça önemli abiyotik faktörlerdendir ve diğer biyotik/abiyotik faktörlerle karmaşık etkileşim halindedir. Optimum aralığın altında veya üstünde yer alan sıcaklıklar canlıları çeşitli şekillerde etkiler. Düşük ve yüksek sıcaklığa geliştirilen tepki moleküler düzeyde farklılıklar içerebilir. Özellikle poikiloterm hayvanlar olan böceklerin sıcaklık değişimlerine tepkileri oldukça değişken ve karmaşıktır. Ayrıca böceğin sıcaklık değişimlerine gösterdiği tepki yaşam evresine bağlı olarak farklılaşır.

G. mellonella son evre larva ile yapılan bu çalışma sonucunda;

- 18 °C'nin ılımlı düşük sıcaklık olduğu,
- 37 °C'nin ise ılımlı yüksek sıcaklık olduğu,
- 37 °C ile kıyaslandığında 18 °C'nin belirgin şekilde stres tepkisini uyardığı,
- 37 °C'nin uyardığı stres cevabın daha minör olduğu,
- 37 °C'nin larva gelişimine potansiyel etkisinin protein düzeyinde anlamlı etkileri olabileceği,

- Bu sebeple 37 °C'nin protein düzeyde stresi tetikleyip tetiklemediğine ilişkin ilave çalışmalara ihtiyaç olduğu,
- 37 °C'nin larva gelişimini hızlandırması halinde gelişimsel süreçlerin stres tepki ile karıştırılabileceği, özellikle modelleme çalışamalarında bu duruma dikkat edilmesi gerektiği,
- Uygulama süresinin protein seviyesinde değişimlere neden olduğu,
- Sıcaklık ve süre değişimlerinden en fazla etkilenen proteinlerin hücre içi taşıma ve protein kontrol süreçlerinde yer aldıkları,
- Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi dışında *G. mellonella* ve insan arasında benzer metabolik süreçlerin olabileceği ve bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu sonuçlarına ulaşıldı.

KAYNAKÇA

1. Brown, J., H., Gillooly, J., F. Allen, A., P., Savage, G., B., 2004. West Toward a metabolic theory of ecology. **Ecology**, 85 pp. 1771-1789.
2. Damos, P., Savopoulou-Soultani, M., 2012. Temperature-Driven Models for Insect Development and Vital Thermal Requirements. *Psyche: A Journal of Entomology*, **13**.
3. Nedved, O., 2009. Temperature, effects on development and growth, 990-993. *In: Encyclopedia of Insects* (Eds: V. Resh, R. Cardé). Academic Press, USA.
4. Wei, D., Jia, F.X., Tian, C.B., Tian, Y., Smagghe, G., Dou, W., Wang, J.J., 2015. Comparative Proteomic Analysis of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Response to Thermal Stress. **Journal of Insect Physiology**, **74**:16-24.
5. Adamski, Z., Bufo, S. A., Chowański, S., Falabella, P., Lubawy, J., Marciniak, P., Pacholska-Bogalska, J., Salvia, R., Scrano, L., Słocińska, M., Spochacz, M., Szymczak, M., Urbański, A., Walkowiak-Nowicka, K., & Rosiński, G., 2019. Beetles as Model Organisms in Physiological, Biomedical and Environmental Studies- A Review. **Frontiers in Physiology**, **10**, 319.
6. Tsai, C. J., Loh, J. M., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* Infection Models for The Study of Bacterial Diseases and for Antimicrobial Drug Testing. **Virulence**, **7**:3, 214–229.
7. Kong, H.G., Kim, H.H., Chung, J.H., et al., 2019. The *Galleria mellonella* Hologenome Supports Microbiota-Independent Metabolism of Long-Chain Hydrocarbon Beeswax. **Cell Reports**, **269**:2451-2464.e5.
8. Gulcicek, E.E., Colangelo, C.M., McMurray, W., Stone, K., Williams, K., Wu, T., Zhao, H., Spratt, H., Kurosky, A., Wu, B., 2005. Proteomics and the Analysis of Proteomic Data: An Overview of Current Protein-Profilng Technologies. **Current Protocols in Bioinformatics** **10**, 13.1.1–13.1.31.
9. Sanborn, A., 2004. Thermoregulation in insects, 215-233. *In: Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht.

10. Terblanche, J.S., Deere, J.A., Clusella-Trullas, S., Janion, C., Chown, S.L., 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** **274**, 2935–2943.
11. Colinet, H., Sinclair, B.J., Vernon, P., Renault, D., 2015. Insects in Fluctuating Thermal Environments. **Annual Review of Entomology** **60**, 123–140.
12. Śmietanko, A., Wiśniewski, J.R., Cymborowski, B., 1989. Effect of Low Rearing Temperature on Development of *Galleria mellonella* Larvae and Their Sensitivity to Juvenilizing Treatment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, **92**:2, 163-169.
13. Kwadha, C.A., Ong'amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K., Fombong, A.T., 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. **Insects.**, **82**:61.
14. Yılmaz, E., 2013. Farklı Dozlardaki Alüminyum Klorür'ün *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Biyolojisine ve Hemosit Sayılarına Etkileri. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Y. Lisans Tezi, İstanbul, 77 s.
15. Ellis, J.D., Graham, R.J., Mortensen, A., 2013. Standard Methods for Wax Moth Research. **Journal of Apicultural Research**, **52**:1, 1-17.
16. Cymborowski, B., 2000. Temperature-Dependent Regulatory Mechanism of Larval Development of the Wax Moth (*Galleria mellonella*). **Acta Biochimica Polonica**, **471**:215-221.
17. Kingsolver, J.G., Moore, M.E., Augustine, K.E., Hill, C.A., 2021. Responses of *Manduca sexta* Larvae to Heat Waves. **Journal of Experimental Biology** **224**, jeb.236505.
18. Achiorno, C.L., Minardi, G., Ferrari, L., 2021. Effect of Environmental Variables and Their Interaction on Gordiid Hairworm Larvae (Nematomorpha). **Journal of Helminthology**, **95**:e47.
19. Massot, M., Bagni, T., Maria, A., et al., 2021. Combined Influences of Transgenerational Effects, Temperature and Insecticide on the Moth *Spodoptera littoralis*. **Environmental Pollution**, **289**:117889.

20. Evans, M.V., Drake, J.M., Jones, L., Murdock, C.C., 2021. Assessing Temperature-Dependent Competition Between Two Invasive Mosquito Species. **Ecological Applications**, **315**:e02334.
21. Santos, M.A., Carromeu-Santos, A., Quina, A.S., Santos, M., Matos, M., Simões, P., 2021. High Developmental Temperature Leads to Low Reproduction Despite Adult Temperature. **Journal of Thermal Biology**, **95**:102794.
22. Agyekum, T.P., Botwe, P.K., Arko-Mensah, J., Issah, I., Acquah, A.A., Hogarh, J.N., Dwomoh, D., Robins, T.G., Fobil, J.N., 2021. A Systematic Review of the Effects of Temperature on Anopheles Mosquito Development and Survival: Implications for Malaria Control in a Future Warmer Climate. **International Journal of Environmental Research and Public Health** **18**, 7255.
23. Zhang, L., Zhang, Z., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, M., Wang, X., Yuan, M., 2021. Genome-Wide Gene Expression Profiles of the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*) under cold temperatures provide insights into body color variation. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** **108**.
24. Padda, S.S., Glass, J.R., Stahlschmidt, Z.R., 2021. When It's Hot and Dry: Life-History Strategy Influences the Effects of Heat Waves and Water Limitation. **Journal of Experimental Biology** **224**, jeb.236398.
25. Brassard, F., Francoeur, A., Lessard, J., 2020. Temperature drives caste-specific morphological clines in ants. **Journal of Animal Ecology** **8**: 2517–2530.
26. León-Quinto, T., Fimia, A., Madrigal, R., Serna, A., 2020. Morphological Response of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, to a Transient Low Temperature Analyzed by Computer Tomography and Holographic Microscopy. **Journal of Thermal Biology**, **94**:102748.
27. Arbabtafti, R., Fathipour, Y., Aghdam, H., 2021. Temperature-Dependent Demography of Two Geographically Isolated Populations of *Sesamia cretica* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, **50**(4):909-918.
28. Košťál, V., Grgac, R., Korbelová, J., 2019. Delayed Mortality and Sublethal Effects of Cold Stress in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, **113**:24-32.

29. Giraldo-Jaramillo, M., Garcia, A.G., Parra, J.R., 2018. Biology, Thermal Requirements, and Estimation of the Number of Generations of *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Economic Entomology** **111**, 2192–2200.
30. Bubliy, O.A., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2013. Stress-induced Plastic Responses in *Drosophila Simulans* Following Exposure to Combinations of Temperature and Humidity Levels. **Journal of Experimental Biology**, **216**, 4601–4607.
31. Tamiru, A., Getu, E., Jembere, B., Bruce, T., 2012. Effect of temperature and relative humidity on the development and fecundity of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Crambidae). **Bulletin of Entomological Research**, **102**(1):9-15.
32. González-Tokman, D., Córdoba-Aguilar, A., Dáttilo, W., Lira-Noriega, A., Sánchez-Guillén, R.A., Villalobos, F., 2020. Insect Responses to Heat: Physiological Mechanisms, Evolution and Ecological Implications in a warming world. **Biological Reviews**, **95**, 802–821.
33. Cramer, M.N., Jay, O., 2016. Biophysical Aspects of Human Thermoregulation During Heat Stress. **Autonomic Neuroscience**, **196**:3-13.
34. Bowler, K., Terblanche, J.S., 2008. Insect Thermal Tolerance: What is the Role of Ontogeny, Ageing and Senescence? **Biological Reviews**, **83**, 339–355.
35. Ma, C.S., Ma, G., Pincebourde, S., 2021. Survive a Warming Climate: Insect Responses to Extreme High Temperatures. **Annual Review of Entomology**, **66**:163-184.
36. Bai, Y., Caussinus, E., Leo, S., Bosshardt, F., Myachina, F., Rot, G., Robinson, M.D., Lehner, C.F., 2021. A Cis-regulatory Element Promoting Increased Transcription at Low Temperature In Cultured Ectothermic *Drosophila* Cells. **BMC Genomics**, **22**.
37. Boardman, L., Sørensen, J.G., Johnson, S.A., Terblanche, J.S., 2011. Interactions between Controlled Atmospheres and Low Temperature Tolerance: A Review of Biochemical Mechanisms. **Frontiers in Physiology**, **2**:92.

38. Colinet, H., Nguyen, T.T., Cloutier, C., Michaud, D., Hance, T., 2007. Proteomic Profiling of a Parasitic Wasp Exposed to Constant and Fluctuating Cold Exposure. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37(11):1177-1188.
39. Teves, S.S., Henikoff, S., 2013. The Heat Shock Response: A Case Study of Chromatin Dynamics in Gene Regulation. **Biochemistry and Cell Biology**, 91(1):42-48.
40. Zhu, G., Xue, M., Luo, Y., Ji, G., Liu, F., Zhao, H., Sun, X., 2017. Effects of Short-Term Heat Shock and Physiological Responses to Heat Stress in two *Bradysia* Adults, *Bradysia odoriphaga* and *Bradysia difformis*. **Scientific Reports**, 7(1), 13381.
41. Neven, L.G., 2000. Physiological Responses of Insects to Heat. **Postharvest Biology and Technology**, 21, 103–111.
42. Wojda, I., 2017. Temperature Stress and Insect Immunity. **Journal of Thermal Biology**, 68, 96–103.
43. Mowlds, P., Kavanagh, K., 2008. Effect of Pre-incubation Temperature on Susceptibility of *Galleria mellonella* Larvae to Infection by *Candida albicans*. **Mycopathologia**, 165, 5–12.
44. Wojda, I., Jakubowicz, T., 2007. Humoral Immune Response upon Mild Heat-shock Conditions in *Galleria mellonella* Larvae. **Journal of Insect Physiology**, 53(11):1134-1144.
45. Güner, E., 2009. Neem'in 5. Evre *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:Pyralidae) Larvaları Üzerindeki Etkileri. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Y. Lisans Tezi, Konya, 65 s.
46. Binder, U., Maurer, E., Lass-Flörl, C., 2016. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. **Fungal Biology**, 120, 288–295.
47. Tsai, C.J.-Y., Loh, J.M.S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* Infection Models for the Study of Bacterial Diseases and for Antimicrobial Drug Testing. **Virulence**, 7, 214–229.

48. Dinh, H., Semenec, L., Kumar, S.S., Short, F.L., Cain, A.K., 2021. Microbiology's Next Top Model: *Galleria* in the Molecular Age. **Pathogens and Disease**, **79**:2.
49. Yarmush, M.L., Jayaraman, A., 2002. Advances in Proteomic Technologies. **Annual Review of Biomedical Engineering**, **4**, 349–373.
50. Wilkins, M.R., Appel, R.D., 2007. Ten years of the proteome, 1-2. In: Proteome Research. Principles and Practice (Eds. Wilkins, M.R., Appel, R.D., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F.). Springer, Berlin, Heidelberg.
51. Yıldırım, V., 2006. First Reference Map for *Phanerochaete chrysosporium* Proteome. ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Y. Lisans Tezi, Ankara, 110 s.
52. Ignasiak, K., Maxwell, A., 2017. *Galleria mellonella* (greater wax moth) Larvae as a Model for Antibiotic Susceptibility Testing and Acute Toxicity Trials. **BMC Research Notes**, **10**: 428.
53. Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., Cresti, M., 2014. Universal Sample Preparation Method Integrating Trichloroacetic Acid/Acetone Precipitation With Phenol Extraction for Crop Proteomic Analysis. **Nature Protocol**, **9** (2), 362-74.
54. Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., Cresti, M., 2014. Universal Sample Preparation Method Integrating Trichloroacetic Acid/Acetone Precipitation With Phenol Extraction for Crop Proteomic Analysis. **Nature Protocol**, **9** (2), 362-74.
55. Pasella, S., Baralla, A., Canu, E., Pinna, S., Vaupel, J., Deiana, M., Franceschi, C., Baggio, G., Zinellu, A., Sotgia, S., Castaldo, G., Carru, C., Deiana, L., 2013. Pre-Analytical Stability of the Plasma Proteomes Based on the Storage Temperature. **Proteome Science**, **11**, 10.
56. Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., ve ark., 2004. Blue Silver: A Very Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteome Analysis. **Electrophoresis**, **25** (9), 1327-33.
57. Özcan, S., Alessio, N., Acar, M.B., Toprak, G., Gönen, Z.B., Peluso, G., Galderisi, U., 2015. Myeloma Cells Can Corrupt Senescent Mesenchymal

- Stromal Cells and Impair Their Anti-Tumor Activity. **Oncotarget**, **6** (37), 39482-92.
58. Felipe, A.P.L. Costa, A. G.F., 2002. Using Body Length Measurements to Study Larval Growth: A Lepidopteran Example. **Neotropical Entomology**, **31**(2):177-180.
 59. Hiller, K., Schobert, M., Hundertmark, C., Jahn, D., Münch, R., 2003. JVirGel: Calculation of Virtual Two-Dimensional Protein Gels. **Nucleic acids research**, **31**(13), 3862–3865.
 60. Dokholyan NV, Shakhnovich EI. Scale-Free Evolution: From Proteins to Organisms. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): **Landes Bioscience**; 2000-2013. Bağlantı: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6227/>
 61. Cilia, M., Fish, T., Yang, X., McLaughlin, M., Thannhauser, T. W., Gray, S., 2009. A comparison of Protein Extraction Methods Suitable for Gel-Based Proteomic Studies of Aphid Proteins. **Journal of Biomolecular Techniques**, **20**(4), 201–215.
 62. Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., Wang, W., 2018. Modified TCA/Acetone Precipitation of Plant Proteins for Proteomic Analysis. **PloS One**, **13**(12), e0202238.
 63. Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., Cresti, M., 2014. Universal Sample Preparation Method Integrating Trichloroacetic Acid/Acetone Precipitation With Phenol Extraction for Crop Proteomic Analysis. **Nature Protocol**, **9** (2), 362-74.
 64. Santa, C., Anjo, S. I., Manadas, B., 2016. Protein Precipitation of Diluted Samples in SDS-containing Buffer with Acetone Leads to Higher Protein Recovery and Reproducibility in Comparison with TCA/Acetone Approach. **Proteomics**, **16**(13), 1847–1851.
 65. Choi, B. D., Wong, N., Auh, J. H., 2017. Defatting and Sonication Enhances Protein Extraction from Edible Insects. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, **37**(6), 955–961.

66. Fan, J., Han, P., Chen, X., Hu, Q., Ye, M., 2014. Comparative Proteomic Analysis of *Bombyx mori* Hemocytes Treated with Destruxin. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, **86**(1), 33–45.
67. Di, G., Xiao, X., Tong, M. H., Chen, X., Li, L., Huang, M., Zhou, L., Ke, C., 2020. Proteome of Larval Metamorphosis Induced by Epinephrine in the Fujian Oyster *Crassostrea angulata*. **BMC Genomics**, **21**(1), 675.
68. Berth, M., Moser, F. M., Kolbe, M., Bernhardt, J., 2007. The State of the Art in the Analysis of Two-dimensional Gel Electrophoresis Images. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **76**(6), 1223–1243.
69. Arrigoni, G., Fernandez, C., Holm, C., Scigelova, M., James, P., 2006. Comparison of MS/MS Methods for Protein Identification from 2D-PAGE. **Journal of Proteome Research**, **5**(9), 2294–2300.
70. Kolker, E., Higdon, R., Hogan, J. M., 2006. Protein Identification and Expression Analysis Using Mass Spectrometry. **Trends in Microbiology**, **14**(5), 229–235.
71. Gupta, N., Pevzner, P. A., 2009. False Discovery Rates of Protein Identifications: a Strike Against the Two-Peptide Rule. **Journal of proteome research**, **8**(9), 4173–4181.
72. Cutuli, M.A., Petronio G., Vergalito, F., et al., 2019. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* Model Hosts: New Developments in Antibacterial Strategies and Novel Drug Testing. **Virulence**, **10**(1):527-541.
73. Firacative, C., Khan, A., Duan, S., Ferreira-Paim, K., Leemon, D., Meyer, W., 2020. Rearing and Maintenance of *Galleria mellonella* and Its Application to Study Fungal Virulence. **Journal of Fungi**, **6**, 130.
74. Lam, O., Wheeler, J., Tang, C.M., 2014. Thermal Control of Virulence Factors in Bacteria: A Hot Topic. **Virulence** **5**, 852–862.
75. Mowlds, P., Barron, A., Kavanagh, K., 2008. Physical Stress Primes the Immune Response of *Galleria mellonella* Larvae to Infection by *Candida albicans*. **Microbes and Infection**, **10**, 628–634.

76. Tsai, C.J.-Y., Loh, J.M.S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* Infection Models for the Study of Bacterial Diseases and for Antimicrobial Drug Testing. **Virulence**, 7, 214–229.
77. Aperis, G., Burgwynfuchs, B., Anderson, C., Warner, J., Calderwood, S., Mylonakis, E., 2007. *Galleria mellonella* as a Model Host to Study Infection by the *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain. **Microbes and Infection**, 9, 729–734.
78. Kingsolver, J.G., Woods, H.A., 2016. Beyond Thermal Performance Curves: Modeling Time-Dependent Effects of Thermal Stress on Ectotherm Growth Rates. **The American Naturalist**, 187(3):283-294.
79. Schulz, N., Himmelbauer, H., Rath, M., Van Weeghel, M., Houten, S., Kulik, W., Suhre, K., Scherneck, S., Vogel, H., Kluge, R., Wiedmer, P., Joost, H.-G., Schürmann, A., 2011. Role of Medium- and Short-Chain L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase in the Regulation of Body Weight and Thermogenesis. **Endocrinology** 152, 4641–4651.
80. Amin, P., Awal, S., Vigneron, S., Roque, S., Mechali, F., Labbé, J.C., Lorca, T., Castro, A., 2022. PP2A-B55: substrates and regulators in the control of cellular functions. **Oncogene** 41, 1–14.
81. Verheyen, E.M., Gottardi, C.J., 2009. Regulation of Wnt/ β -catenin Signaling by Protein Kinases. **Developmental Dynamics** NA–NA.
82. Roux, P.P., Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 68, 320–344.
83. Badadani, M., 2012. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. **ISRN Cell Biology**, 1–11.
84. Lamark, T., Johansen, T., 2012. Aggrephagy: Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy. **International Journal of Cell Biology** 1–21.
85. Kast, D.J., Dominguez, R., 2017. The Cytoskeleton-Autophagy Connection. **Current Biology**, 27(8):R318-R326.

86. Janke, C., Chloë Bulinski, J., 2011. Post-translational Regulation of the Microtubule Cytoskeleton: Mechanisms and Functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** **12**, 773–786.
87. Fang, S.-M., Zhang, Q., Zhang, Y.-L., Zhang, G.-Z., Zhang, Z., Yu, Q.-Y., 2021. Heat Shock Protein 70 Family in Response to Multiple Abiotic Stresses in the Silkworm. **Insects** **12**, 928.
88. Zeng, B., Huang, Y., Xu, J., Shiotsuki, T., Bai, H., Palli, S.R., Huang, Y., Tan, A., 2017. The FOXO Transcription Factor Controls Insect Growth and Development by Regulating Juvenile Hormone Degradation in the Silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Biological Chemistry**, **292**, 11659–11669.
89. Canton, J., Neculai, D., Grinstein, S., 2013. Scavenger Receptors in Homeostasis and Immunity. **Nature Reviews Immunology**, **13**, 621–634.
90. Kim, S.G., Jo, Y.H., Seong, J.H., Park, K.B., Noh, M.Y., Cho, J.H., Ko, H.J., Kim, C.E., Tindwa, H., Patnaik, B.B., Bang, I.S., Lee, Y.S., Han, Y.S., 2017. Tm SR-C, Scavenger Receptor Class C, plays a Pivotal Role in Antifungal and Antibacterial Immunity in the Coleopteran Insect *Tenebrio molitor*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **89**, 31–42.
91. Zhang, Y., He, X., Yu, F., et al., 2013. Characteristic and Functional Analysis of Toll-Like Receptors (TLRs) in the Lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, Reveals Ancient Origin of TLR-Mediated Innate Immunity. **PLoS One**, **8**(10):e76464.
92. Chaturvedi, A., Pierce, S.K., 2009. How Location Governs Toll-Like Receptor Signaling. **Traffic**, **10**, 621–628.
93. Schröder, M., Kaufman, R.J., 2005. The Mammalian Unfolded Protein Response. **Annual Review of Biochemistry**, **74**:739-789.
94. Smaili, S.S., Hsu, Y.-T., Sanders, K.M., Russell, J.T., Youle, R.J., 2001. Bax Translocation to Mitochondria Subsequent to a Rapid Loss of Mitochondrial Membrane Potential. **Cell Death & Differentiation** **8**, 909–920.

95. Wang, L., Xu, C., Wang, C., Wang, Y., 2012. Characterization of a Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Homolog from *Tamarix androssowii* Involved in Plant Abiotic Stress Tolerance. **BMC Plant Biology** **12**, 118.
96. Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nature Communications**, **11**.
97. Tretter, L., Patocs, A., Chinopoulos, C., 2016. Succinate, an Intermediate in Metabolism, Signal Transduction, ROS, Hypoxia, and Tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1857**(8):1086-1101.
98. Zhang, Z., Liu, X., Li, R., Yuan, L., Dai, Y., Wang, X., 2018. Identification and Functional Analysis of a Protein Disulfide Isomerase (AtPDI1) in *Arabidopsis thaliana*. **Front Plant Sci.**, **9**:913.
99. Parakh, S., Atkin, J.D., 2015. Novel Roles for Protein Disulphide Isomerase in Disease States: a Double Edged Sword? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, **3**:30.
100. Grune, T., Reinheckel, T., Li, R., North, J.A., Davies, K.J.A., 2002. Proteasome-Dependent Turnover of Protein Disulphide Isomerase in Oxidatively Stressed Cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **397**, 407–413.
101. Bou Sleiman, M., Frochaux, M.V., Andreani, T., Osman, D., Guigo, R., Deplancke, B., 2020. Enteric Infection Induces Lark-mediated Intron Retention at the 5' end of Drosophila genes. **Genome Biology** **21**.
102. Sundram, V., Ng, F.S., Roberts, M.A., Millán, C., Ewer, J., Jackson, F.R., 2012. Cellular Requirements for LARK in the Drosophila Circadian System. **Journal of Biological Rhythms** **27**, 183–195.
103. Klepsatel, P., Gáliková, M., 2022. Developmental temperature Affects Thermal Dependence of Locomotor Activity in Drosophila. **Journal of Thermal Biology**, **103**, 103153.
104. Hayesa, T., López-Martínez, G., 2021. Resistance and Survival to Extreme Heat Shows Circadian and Sex-Specific Patterns in a Cavity Nesting Bee. **Current Research in Insect Science**, **1**, 100020.

105. Yamamoto S, Ogasawara N, Yamamoto K, et al., 2017. Mitochondrial Proteins NIP-SNAP-1 and -2 are a Target for the immunomodulatory Activity of Clarithromycin, which Involves NF- κ B-mediated Cytokine Production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **483**(3):911-916.
106. Princely Abudu, Y., Pankiv, S., Mathai, B.J., Håkon Lystad, A., Bindesbøll, C., Brenne, H.B., Yoke Wui Ng, M., Thiede, B., Yamamoto, A., Mutugi Nthiga, T., Lamark, T., Esguerra, C.V., Johansen, T., Simonsen, A., 2019. NIPSNAP1 and NIPSNAP2 Act as “Eat Me” Signals for Mitophagy. **Developmental Cell** **49**, 509–525.e12.
107. Dabbaghizadeh, A., Morrow, G., Amer, Y.O., Chatelain, E.H., Pichaud, N., Tanguay, R.M., 2018. Identification of Proteins Interacting with the Mitochondrial Small Heat Shock Protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster*: Implication in Mitochondrial Homeostasis. **PLOS ONE** **13**, e0193771.
108. Oemer, G., Koch, J., Wohlfarter, Y., Alam, M.T., Lackner, K., Sailer, S., Neumann, L., Lindner, H.H., Watschinger, K., Haltmeier, M., Werner, E.R., Zschocke, J., Keller, M.A., 2020. Phospholipid Acyl Chain Diversity Controls the Tissue-Specific Assembly of Mitochondrial Cardiolipins. **Cell Reports** **30**, 4281–4291.e4.
109. Ye, C., Shen, Z., Greenberg, M.L., 2016. Cardiolipin remodeling: a Regulatory Hub for Modulating Cardiolipin Metabolism and Function. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, **48**(2):113-123.
110. Luévano-Martínez, L.A., Forni, M.F., dos Santos, V.T., Souza-Pinto, N.C., Kowaltowski, A.J., 2015. Cardiolipin is a Key Determinant for mtDNA Stability and Segregation During Mitochondrial Stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1847**(6-7):587-598.
111. Chung, D.J., Sparagna, G.C., Chicco, A.J., Schulte, P.M., 2018. Patterns of Mitochondrial Membrane Remodeling Parallel Functional Adaptations to Thermal Stress. **Journal of Experimental Biology** **221**, jeb174458.
112. Zaoui, K., Honor, S., Isnardon, D., Braguer, D., Badache, A., 2008. Memo–RhoA–mDia1 Signaling Controls Microtubules, the Actin Network, and

- adhesion Site Formation in Migrating Cells. **Journal of Cell Biology** **183**, 401–408.
113. Zaoui, K., Honor, S., Isnardon, D., Braguer, D., Badache, A., 2008. Memo–RhoA–mDia1 Signaling Controls Microtubules, the Actin Network, and adhesion Site Formation in Migrating Cells. **Journal of Cell Biology** **183**, 401–408.
 114. Teets, N.M., Denlinger, D.L., 2016. Physiological Mechanisms of Seasonal and Rapid Cold-Hardening in Insects. **Physiological Entomology**, **38**(2):105-116.
 115. Zhang, C., Wei, D., Shi, G., et al., 2019. Understanding the Regulation of Overwintering Diapause Molecular Mechanisms in *Culex pipiens pallens* through Comparative Proteomics. **Scientific Reports**, **9**(1):6485.
 116. Bechler, M.E., De Figueiredo, P., Brown, W.J., 2012. A PLA1-2 Punch Regulates the Golgi Complex. **Trends in Cell Biology** **22**, 116–124.
 117. Puckett, S., Trujillo, C., Eoh, H., Marrero, J., Spencer, J., Jackson, M., Schnappinger, D., Rhee, K., Ehrt, S., 2014. Inactivation of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Prevents Optimal Co-catabolism of Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Substrates in Mycobacterium tuberculosis. **PLOS Pathogens** **10**, e1004144.
 118. Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete, S.A., Grune, T., Simm, A., 2014. Role of Advanced Glycation End Products in Cellular Signaling. **Redox Biology**, **2**:411-429.
 119. Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J., Sri Theivakadadcham, V.S., 2017. Regulation of transcription factors by sumoylation. **Transcription** **8**, 220–231.
 120. Hao, L.-Y., Giasson, B.I., Bonini, N.M., 2010. DJ-1 is Critical for Mitochondrial Function and Rescues PINK1 Loss of Function. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **107**, 9747–9752.
 121. Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S proteasome: a Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. **Annual Review of Biochemistry**, **68**:1015-1068.

122. Tarling, E.J., Edwards, P.A., 2011. ATP Binding Cassette Transporter G1 (ABCG1) is an Intracellular Sterol Transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **108**, 19719–19724.
123. Chen, K., Tang, T., Song, Q., et al., 2019. Transcription Analysis of the Stress and Immune Response Genes to Temperature Stress in *Ostrinia furnacalis*. **Frontiers in Physiology**, **10**:1289.
124. Rennert, J., Coffman, J.A., Mushegian, A.R., Robertson, A.J., 2003. The Evolution of Runx Genes I. A Comparative Study of Sequences from Phylogenetically Diverse Model Organisms. **BMC Evolutionary Biology**, **3**:4.
125. Bao, R., Friedrich, M., 2008. Conserved cluster organization of insect Runx genes. **Development Genes and Evolution** **218**, 567–574.
126. Mevel, R., Draper, J.E., Lie-A-Ling, M., Kouskoff, V., Lacaud, G., 2019. RUNX Transcription Factors: Orchestrators of Development. **Development.**, **146**(17):dev148296.
127. Crivat, G., Lizunov, V.A., Li, C.R., et al., 2013. Insulin Stimulates Translocation of Human GLUT4 to the Membrane in Fat Bodies of Transgenic *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, **8**(11):e77953.
128. Boyce, M., Yuan, J., 2006. Cellular Response to Endoplasmic Reticulum Stress: A Matter of Life or Death. **Cell Death and Differentiation** **13**(3):363-373.
129. Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., Wilkinson, K.D., 2009. Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, **78**:363-397.
130. Bailly, A.P., Perrin, A., Serrano-Macia, M., Maghames, C., Leidecker, O., Trauchessec, H., Martinez-Chantar, M.L., Gartner, A., Xirodimas, D.P., 2019. The Balance between Mono- and NEDD8-Chains Controlled by NEDP1 upon DNA Damage Is a Regulatory Module of the HSP70 ATPase Activity. **Cell Reports** **29**, 212–224.e8.

131. Guo, Y.J., Pan, W.W., Liu, S.B., Shen, Z.F., Xu, Y., Hu, L.L., 2020. ERK/MAPK Signalling Pathway and Tumorigenesis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, **19**(3):1997-2007.
132. Nayak, L., Bhattacharyya, N.P., De, R.K., 2016. Wnt Signal Transduction Pathways: Modules, Development and Evolution. **BMC Systems Biology**, **10** Suppl 2(Suppl 2):44.
133. Biggar, K.K., Li, S.S., 2015. Non-histone Protein Methylation as a Regulator of Cellular Signalling and Function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **16**(1):5-17.
134. Kültz, D., 2005. Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response. **Annual Review of Physiology**, **67**:225-257.
135. Farahani, S., Bandani, A.R., Alizadeh, H., Goldansaz, S.H., Whyard, S., 2020. Differential Expression of Heat Shock Proteins and Antioxidant Enzymes in Response to Temperature, Starvation, and Parasitism in The Carob Moth Larvae, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). **PLoS One**, **15**(1):e0228104.
136. Sheehan, G., Farrell, G., Kavanagh, K., 2020. Immune Priming: The Secret Weapon of The Insect World. **Virulence**, **11**(1):238-246.
137. Catalán, T.P., Wozniak, A., Niemeyer, H.M., Kalergis, A.M., Bozinovic, F., 2012. Interplay Between Thermal and Immune Ecology: Effect of Environmental Temperature on Insect Immune Response and Energetic Costs After an Immune Challenge. **Journal of Insect Physiology**, **58**(3):310-317.
138. Mohammadie, A., Kojour, M., Han, Y.S., Jo, Y.H., 2020. An Overview of Insect Innate Immunity. **Entomological Research**, **50**, 282-291.
139. Newman, J.C., Verdin, E., 2014. Ketone Bodies as Signaling Metabolites. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, **25**(1):42-52.
140. J. Shah, E. Bailey, 1976. Enzymes of Ketogenesis in the Fat Body and the Thoracic Muscle of the Adult Cockroach. **Insect Biochemistry**, **6**(3):251-254.

141. Popov, L.D., 2020. Mitochondrial Biogenesis: An Update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 24(9):4892-4899.



EKLER

EK 3.1. Farklı Sıcaklıkların 24 Saat Uygulandığı Gruplara ait Proteinler

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. <i>melanogaster</i> Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. <i>mori</i> Protein ID	Benzerlik (%)
24S-1	A0A194PLH7	3-hidroksiasil-KoA dehidrogenaz tip-2	Oksidoredüktaz aktivite	Mitokondriyal	Wolf PSORT	24 Saat 18 °C	O18404	63.9	Q1HPX9	82.4
24S-2	A0A0L7LTZ0	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Çekirdek	Wolf PSORT	24 Saat 18 °C	P06754	63.8	H9IWF4	76.9
24S-3	F8UN44	Isı şoku proteini 70-3	Endoplazmik retikulum lumen; ATP bağlayıcı; ATPaz aktivitesi	Endoplazmik retikulum lumen	UniProt	24 Saat 18 °C	P29844	89.7	F8UN44	100.0
24S-4	A0A194QF74	Serin/treonin-protein fosfataz 2A 65 kDa düzenleyici alt ünite A alfa izoform	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 Saat 18 °C	P36179	76.9	H9IYA4	93.9
24S-5	H9IYP1	WD_REPEATS_REGION domain-içeren protein	Mikrotübül bazlı hareket	Çekirdek	Wolf PSORT	24 Saat 18 °C	Q24246	60.2	H9IYP1	100.0
24S-6	A0A0N1INQ1	Tubulin beta-1 zincir	Mikrotübül bazlı hareket	Sitoplazmik	UniProt	24 Saat 18 °C	Q24560	98.4	Q8T8B2	99.1
24S-7	A0A194RIZ0	H(+)-taşıyan iki-parçalı ATPaz (EC 7.1.2.2)	Proton-taşıyan ATPaz aktivite, dönme mekanizması	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 Saat 18 °C	Q27331	86.6	Tespit edilemedi	
24S-8	A0A194RM69	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 Saat 18 °C	Q9VY78	79.0	H9JHP7	93.5
24S-9	A0A194PXA9	Ubikuitin- aktive edici enzim E1 (EC 6.2.1.45)	ATP bağlayıcı; ubikuitin aktive edici enzim aktivitesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	A0A0B4KF46	65.8	H9JK60	85.7
24S-10	A0A212F964	Uncharacterized protein (Fragment)	Tespit edilemedi	Çekirdek	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	C0HK92	37.5	H9J5V4	77.9
24S-11	A0A0N1IDX2	Glukoz 1-dehidrogenaz	Oksidoredüktaz aktivite	Salgılanan	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9JUE8	57.9
24S-12	A0A194QB90	Uzama faktörü 1-alfa	Sitoplazma; GTP bağlayıcı; GTPaz aktivite	Sitoplazmik	UniProt	24 saat 30 °C	M9PD08	82.8	H9JCI5	89.7
24S-13	Q1HPX4	ATP sentaz alt ünite gama	Proton-taşıyan ATPaz aktivite, dönme mekanizması	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	O01666	73.0	Q1HPX4	100.0
24S-14	H9JXG1	Uncharacterized protein	Miyozin kompleks	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	24 saat 30 °C	P05661	83.3	H9JXG1	100.0
24S-15	A0A194PP56	14-3-3 protein zeta	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	P29310	66.0	H9IZF9	94.9

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)
24S-16	A0A194R0M3	Adenilat kinaz (EC 2.7.4.3)	ATP metabolik süreç	Sitoplazmik	UniProt	24 saat 30 °C	Q9U915	75.1	D2Y062	89.7
24S-17	Q6T3A7	Thiol Peroksiredoksin	Peroksidaz aktivite; Peroksiredoksin aktivite	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	Q9V3P0	81.4	Q6T3A7	100.0
24S-18	H9JT91	Uncharacterized protein	Protein katlanması	Secreted	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	Q9VAY2	60.2	H9JT91	100.0
24S-19	I4DJA4	Poli(U)-spesifik endoribonükleaz (EC 3.1.-.-)	Endoribonükleaz aktivite; metal bağlayan; RNA bağlayıcı	Secreted	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	Q9VZ49	38.5	H9J2F1	85.7
24S-20	A0A0L7KPU4	Aldo-keto reductase	D-threo-aldoz 1-dehidrogenaz aktivite	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	Q9VZK8	34.4	H9IVT6	45.9
24S-21	A0A212EYV5	26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 2	Protein katabolik süreçlerin düzenlenmesi	Integral membrane protein	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9J723	87.4
24S-22	A0A194PJC7	3-hidroksiizobutirat dehidrogenaz (HIBADH) (EC 1.1.1.31)	Valin katabolik süreçleri	Mitokondriyal	Wolf PSORT	24 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9JC99	87.6
24S-23	A0A0N1INR1	40S ribozomal protein S15 (EC 2.5.1.25)	Translayon; tRNA işleme	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 37 °C	A1ZAH8	88.2	Q66SV9	98.6
24S-24	A0A212F9L5	Putativ laminin A zincir (laminin alt ünite gamma-1)	Ekstraselüler bölge	Salgılanan	Wolf PSORT	24 saat 37 °C	P15215	49.4	H9IXY1	84.7
24S-25	A0A212EUI1	Troponin I	Troponin kompleks	Mitokondriyal	Wolf PSORT	24 saat 37 °C	P36188	75.8	H9IUUV0	91.8
24S-26	H9IZM8	Uncharacterized protein	Negative regulation of ATPaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi	Mitokondriyal	UniProt	24 saat 37 °C	Q0E8X8	66.7	H9IZM8	100.0
24S-27	A0A212FGT6	Protein disülfid-izomeras (EC 5.3.4.1)	Endoplazmik retikulum lümen; Protein disülfid izomeras aktivitesi	Endoplazmik retikulum lumen	UniProt	24 saat 37 °C	Q3YMU0	60.9	H9J250	79.8
24S-28	H9JTB8	Süksinat--KoA ligaz [ADP/GDP-forming] alt ünite alfa, mitokondriyal (EC 6.2.1.4) (EC 6.2.1.5) (Succinyl-KoA sentetaz alt ünite alfa) (SCS-alfa)	TCA	Mitokondriyal	UniProt	24 saat 37 °C	Q94522	77.3	H9JTB8	100.0
24S-29	A0A212F8Q4	RNA-bağlayıcı protein lark	RNA bağlayıcı; çinko iyon bağlayıcı	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 37 °C	Q94901	65.4	H9JD13	93.3
24S-30	A0A194R5L3	Ökaryotik translayon başlatıcı faktör 5A (eIF-5A)	Translayon uzamasının pozitif düzenlenmesi; translayon sonlandırmasının pozitif düzenlenmesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 37 °C	Q9GU68	82.6	Q4F863	99.4

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)
24S-31	Q27451	Fenoloksidaz alt ünite 1 (EC 1.14.18.1) (PO 1) (Tirozinaz 1)	Savunma tepkisi; Tirozin'den melanin biyosentezi	Salgılanan	UniProt	24 saat 37 °C	Q9V521	59.0	Q27451	100.0
24S-32	H9JPG9	Transferrin	Demir iyonu homeostazı	Sitoplazmik	Wolf PSORT	24 saat 37 °C	Q9VWV6	34.0	H9JPG9	100.0
24S-33	A0A194Q1Q4	Protein NipSnap	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	Wolf PSORT	24 saat 37 °C	Q9VXK0	67.9	H9JTJ7	88.8
24S-34	A0A212FJV5	Fosftidaz fosfataz (EC 3.1.3.4)	Fosfatidat fosfataz aktivitesi	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	A0A0B4JD00	40.9	H9IZF8	61.5
24S-35	A0A194Q0Y5	Protein hu-li tai shao	Tespit edilemedi	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	A0A0B4K7A5	57.5	H9JRJ9	39.0
24S-36	A0A194R7F0	Heterojen nüklear ribonucleoprotein R	RNA bağlayıcı	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	A0A0B4KHI4	81.6	Tespit edilemedi	
24S-37	A0A194RHU0	UTP--glukoz-1-fosfat uridiltransferaz (EC 2.7.7.9)	Glikojen biyosentez süreci	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	A5XCL5	73.3	H9JGS8	93.6
24S-38	Q2F5N1	Prohibitin	Mitokondriyal iç membranı	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	A8DYI7	80.1	Q2F5N1	100.0
24S-39	A0A194PJK2	Heat shock 70 kDa protein 4L	ATP bağlayıcı; ATPaz aktivitesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	M9MSL3	53.5	H9IVD8	84.5
24S-40	H9JCV2	Uncharacterized protein	Protein yeniden katlanması	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	O02649	82.2	H9JCV2	100.0
24S-41	A0A212FNP3	Selenofosfat sentetaz 1	ATP bağlayıcı; kinaz aktivitesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	O18373	88.7	H9J385	98.5
24S-42	Q5UAT0	Ribozomal protein L10	Translasyon	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	O61231	89.4	Q5UAT0	100.0
24S-43	Q6PUF8	40S ribozomal protein S21	Translasyon	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	O76927	78.3	Q6PUF8	100.0
24S-44	E5EVW5	Inorganik difosfataz (EC 3.6.1.1)	Fosfat içeren bileşiklerin metabolik süreci	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	O77460	60.1	E5EVW5	100.0
24S-45	A0A212EJZ3	Tubulin alfa zincir	Mikrotübül bazlı hareket	Sitoplazmik ve Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P06603	98.7	H9IXX0	96.7
24S-46	H9J0L9	Maltaz	Karbonhidrat metabolik süreci	Salgılanan	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P07190	48.3	H9J0L9	100.0
24S-47	Q1EPM0	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (EC 1.2.1.12)	Glikolitik süreç	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P07487	84.0	Q1EPM0	100.0
24S-48	A0A194R6Y9	Fruktoz-bifosfat aldolaz (EC 4.1.2.13)	Glikolitik süreç	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P07764	82.1	Q1HPN7	89.0
24S-49	A0A0L7L6B3	Limpet protein	Tespit edilemedi	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P08736	95.0	P29520	98.1

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)
24S-50	H9JDV4	Nucleozit difosfat kinaz(EC 2.7.4.6)	CTP biyosentetik süreç	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P08879	81.0	H9JDV4	100.0
24S-51	Q1HPU0	Tropomyosin-1	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P09491	81.0	Q1HPU0	100.0
24S-52	A0A194QLM0	CCT-alfa (T-kompleks protein 1 alt ünite alfa)	Protein katlanması	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P12613	79.7	H9J9S0	91.9
24S-53	A0A0N1PI50	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz [NAD(+)]. (EC 1.1.1.8)	Karbonhidrat metabolik süreci	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P13706	79.0	H9JSP9	95.2
24S-54	A0A0L7LMS4	GTP-bağlayıcı nuklear protein	Nukleositoplazmik transport; protein transport	Çekirdek	UniProt	Tespit edilemedi	P14318	76.1	Q1HPM4	93.5
24S-55	H9ITX1	Katalaz (EC 1.11.1.6)	Hidrojen peroksit katabolik süreç; oksidatif strese tepki	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P17336	72.1	H9ITX1	100.0
24S-56	A0A212EUA9	Alfa-aktinin sarkomerik	Aktin bağlayıcı; kalsiyum iyon bağlayıcı	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P18091	91.1	Tespit edilemedi	
24S-57	A0A212FEQ6	60S asidik ribozomal protein P0	Ribozom biyogenezi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P19889	81.7	Q5UAU1	92.1
24S-58	Q68HB4	Profilin	Sitoplazma; hücre iskeleti, aktin bağlayıcı	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	P25843	72.2	Q68HB4	100.0
24S-59	A0A0L7L560	Calretikulin	Protein katlanması	Endoplazmik retikulum lumen	UniProt	Tespit edilemedi	P29845	82.2	Tespit edilemedi	
24S-60	A0A212EPX7	Aktin (aktin ile ilgili protein 3)	Arp2/3 kompleks aracılı aktin çekirdeklenmesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P32392	84.7	H9IXD8	96.9
24S-61	H9ITN2	Miyozin_tail_1 domain içeren protein	Miyozin kompleks	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P35415	71.7	H9ITN2	100.0
24S-62	H9ITN3	Miyozin_tail_1 domain içeren protein	Miyozin kompleks	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P35415	56.1	H9ITN3	100.0
24S-63	A0A194RDC8	Troponin I	Troponin kompleks	Salgılanan	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P36188	91.8	H9IUUV1	98.7
24S-64	A0A0N1IAJ4	Kinezin hafif zincir	Kinezin kompleks; mikrotubul	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	P46824	76.1	H9JFW1	89.0
24S-65	Q5UAM7	Ribozomal protein S15A	Translasyon	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P48149	93.1	Q5UAM7	100.0
24S-66	H9IVX5	T-kompleks protein 1 alt ünite gama	Protein katlanması	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	P48605	81.0	H9IVX5	100.0
24S-67	A0A212FJB4	Putativ hrp48.1	RNA bağlayıcı	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P48809	58.6	H9JSB8	87.1
24S-68	A0A212EZ57	Aktin (aktin, kas)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P53501	98.9	P07837	98.1

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)
24S-69	Q2F5X3	26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 4	Proteazom kompleks	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P55035	59.7	Q2F5X3	100.0
24S-70	A0A212EIE9	cAMP-bağımlı protein kinaz R2	cAMP bağımlı protein kinaz kompleksi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P81900	63.2	A8WFD8	96.3
24S-71	Q9GSB6	Isı şoku proteini hsp20.4	Metal iyon bağlayıcı	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	P82147	50.6	Q9GSB6	100.0
24S-72	H9JPP9	ATP sentaz alt ünite O, mitokondriyal (Oligomisin duyarlılık aktaran protein)	Proton-taşıyan ATP sentaz aktivitesi, dönme mekanizması	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q24439	60.7	H9JPP9	100.0
24S-73	H9IWQ1	Tubulin beta zincir	Mikrotübül tabanlı süreç	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q24560	85.1	H9IWQ1	100.0
24S-74	A0A0N1PK05	Tubulin beta zincir	Mikrotübül tabanlı süreç	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q24560	79.4	Q8T8B2	72.8
24S-75	A0A194PME6	Clavesin-2	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q2MGL8	45.9	H9J8W2	60.7
24S-76	A0A0N1IQ26	Polen-spesifik protein SF3	Metal iyon bağlayıcı	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q59DP4	36.6	H9J4Z1	83.3
24S-77	A0A212EJU8	Canopy-1 like protein	Tespit edilemedi	Salgılanan	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q7JXF7	37.1	H9J180	87.9
24S-78	A0A212FJL1	CCT-teta (T-kompleks protein 1 alt ünite teta)	Protein katlanması	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q7K3J0	73.3	Tespit edilemedi	
24S-79	A5A798	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sentaz (HMG-KoA sentaz) (EC 2.3.3.10)	Sterol biyosentez süreci	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q7K4Q9	64.9	A5A798	100.0
24S-80	A0A212FAS0	Vezikül birleştiren ATPaz (EC 3.6.4.6)	ATP bağlayıcı; ATPaz aktivitesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q7KN62	88.1	H9J398	98.0
24S-81	A0A194PDR4	Vigilin	RNA bağlayıcı	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q7KN75	52.6	Tespit edilemedi	
24S-82	A0A194Q8A1	Four and a half LIM domains protein 2	Metal iyon bağlayıcı	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q7KUQ5	85.5	Tespit edilemedi	
24S-83	A0A0L7LJF6	Anneksin	Kalsiyum bağımlı fosfolipit bağlayıcı	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q8INK3	55.3	H9JU99	76.2
24S-84	A0A212F8M7	Kısa zincir dehidrojenaz/redüktaz	Oksidoredüktaz aktivite	Endoplazmik retikulum ve mitokondri membran-bağlı protein.	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q8IPP8	70.2	H9IVP2	88.9

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)
24S-85	A0A194QE2	EH domain-içeren protein 1	Endositik geri dönüşüm	Sitoplazmik/Çekirdek	UniProt	Tespit edilemedi	Q8T6I0	82.0	H9JKE1	95.8
24S-86	A0A0N0PBV0	İzositrat dehidrogenaz [NAD] alt ünite, mitokondriyal	TCA	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q94511	63.4	H9JHG0	100.0
24S-87	A0A212FHR9	Kathepsin L proteinaz (Kathepsin L izoform X1)	Sistein tip peptidaz aktivite	Salgılanan	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q95029	68.4	Q6T9Z7	78.0
24S-88	A0A212FKT7	Ribozomal protein S5	Translasyon	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9V3T9	53.6	Q5UAN9	95.0
24S-89	A0A194PLU9	26S proteaz düzenleyici alt ünite 6A	Protein katabolik süreci	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q9V3V6	93.7	H9J5J2	98.4
24S-90	A0A212ERW1	26S proteaz düzenleyici alt ünite 6B (26S proteazom düzenleyici alt ünite 6B)	Mayoz hücre döngüsü; protein katabolik süreç	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q9V405	89.5	Tespit edilemedi	
24S-91	A0A0N0PFU8	Protein disülfid-izomeraz A6	İzomeraz aktivite	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9V438	73.4	H9IZ84	94.9
24S-92	H9JWQ0	V-tip proton ATPaz alt ünite C	Proton transmembran taşıyıcı aktivitesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9V7N5	76.4	H9JWQ0	100.0
24S-93	A0A194Q785	40S ribozomal protein S7	Translasyon	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VA91	76.6	H9J4B7	95.7
24S-94	A0A194QZM2	UMP-CMP kinaz(EC 2.7.4.14)	'de novo' pirimidin nukleobaz biyosentez süreci	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q9VBI2	65.3	H9J3S9	86.2
24S-95	A0A212F1F4	GTP-bağlayıcı protein SAR1b (GTP-bağlayıcı protein sar1)	Hücre içi protein taşınması; vezikül aracılı taşıma	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VD29	89.6	H9IZ19	96.4
24S-96	A0A0N0PE34	İzositrat dehidrogenaz [NAD] alt ünite beta, mitokondriyal	TCA	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VD58	63.4	H9JMD4	84.0
24S-97	A0A194R1H9	Fosfatidilinozitol transfer protein alfa izoform	Fosfolipid taşıyıcı aktivite	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VDY8	64.8	Tespit edilemedi	
24S-98	A0A194QVC2	Mitokondri düzenleyen peptidaz alt ünite beta	Proteoliz	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VFF0	76.8	H9IZ97	81.8
24S-99	A0A0N1IC14	Sitrat hidrolaz (EC 4.2.1.3)	Hücre sel demir iyonu homeostazı; demir(II) iyonuna tepki	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q9VGZ3	73.8	Tespit edilemedi	
24S-100	H9JXE5	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VHN7	70.1	H9JXE5	100.0
24S-101	A0A212EUY6	Akonitat hidratat (EC 4.2.1.3) (Fragment)	TCA	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VIE8	82.7	Tespit edilemedi	
24S-102	A0A212F576	Akonitat hidratat (EC 4.2.1.3) (Fragment)	TCA	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q9VIE8	80.3	H9JC76	
24S-103	A0A0N1IE10	Peptidilprolil izomeraz (EC 5.2.1.8)	Peptidil-prolil cis-trans izomeraz aktivitesi	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VL78	48.3	H9JVS2	73.6

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)
24S-104	H9J8M2	Trafik protein parçacık kompleksi alt ünite proteini	Endoplazmik retikulumdan Golgiye vezikül aracılı taşımaya	Endoplazmik retikulum	UniProt	Tespit edilemedi	Q9VLI9	67.3	H9J8M2	100.0
24S-105	A0A0N1IIW8	Epidermal büyüme faktörü reseptör kinaz substratı 8	Kinaz aktivite	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VPU7	44.4	H9J4W0	69.0
24S-106	A0A0L7KT39	NADH dehidrogenaz [ubikuinon] 1 alfa alt kompleks alt ünite 12	Mitokondriyal solunum zincir kompleks I asemblesi	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q9VQD7	49.6	H9J151	66.0
24S-107	A0A194QE52	Seril-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.11)	Seril-tRNA aminoasılasyon	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VQL1	75.2	H9J390	87.2
24S-108	A0A194PW14	Dehidrogenaz/redüktaz SDR ailesi üyesi 4	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VRJ4	53.9	H9JQH9	76.9
24S-109	H9JQL3	Uncharacterized protein	Glutatyon metabolik süreç	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VSL2	42.0	H9JQL3	100.0
24S-110	A0A194QYW2	Dihidropteridin redüktaz	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VSU6	68.5	H9J3A0	87.2
24S-111	A0A0L7LQD1	Staphylococcal nükleaz domain- içeren protein 1	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VU68	66.6	H9JGQ9	100.0
24S-112	A0A212F2C1	Tirozin-tRNA ligaz (EC 6.1.1.1)	Tirozil-tRNA aminoasılasyon	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VV60	68.9	Tespit edilemedi	
24S-113	A0A194QME0	Ökaryotik translayon başlatıcı faktör 5	GTP bağlayıcı; translayon başlatma aktivitesi	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VXK6	52.5	Tespit edilemedi	
24S-114	Q2F6C3	Şaperonin alt ünite 6a zeta	Protein katlama	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q9VXQ5	78.8	Q2F6C3	100.0
24S-115	H9ITD6	Uncharacterized protein	RNA bağlayıcı	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VZ69	70.1	H9ITD6	100.0
24S-116	A0A212FDZ4	Transgelin	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VZI1	84.0	H9JC47	87.7
24S-117	H9JK90	Ubikuitin karboksil-terminal hidrolaz (EC 3.4.19.12)	Ubikuitin-bağımlı protein katabolik süreç	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9VZU7	56.8	H9JK90	100.0
24S-118	A0A0L7LHN5	Pirolin-5-karboksilat dehidrogenaz	Oksidoredüktaz donörlerin aldehit veya okso grubu üzerinde hareket eden aktivite, alıcı olarak NAD veya NADP	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9W392	75.7	Q2F6C2	92.9
24S-119	A0A194PSL1	Asetil-KoA asetiltransferaz, mitokondriyal	transferaz aktivitesi, amino-açıl grupları dışındaki açıl gruplarının transfer edilmesi	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9W3N9	70.6	H9JNC6	91.1
24S-120	A0A194PIF2	Alfa-1,4 glukan fosforilaz (EC 2.4.1.1)	Glikojen metabolik süreç	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Q9XTL9	79.7	H9JLG0	92.5

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. <i>melanogaster</i> Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. <i>mori</i> Protein ID	Benzerlik (%)
24S-121	H9J5Q7	GATOR kompleks protein SEC13 (Protein SEC13 homolog)	TORC1 sinyalinin pozitif düzenlenmesi; protein taşıma	Çekirdek	UniProt	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9J5Q7	100.0
24S-122	A0A194RAE8	Hidroksiaçil-KoA dehidrogenaz, mitokondriyal	Yağ asiti metabolik süreç	Mitokondriyal	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JCW5	57.8
24S-123	A0A212F8L0	Fumarilasetoasetaz (EC 3.7.1.2) (Fumarilasetoasetat hidrolaz)	L-fenilalanin katabolik süreç; Tirozin katabolik süreç	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JD41	79.2
24S-124	A0A212FHM0	Nukleazom assemble protein izoform 2	Nukleazom assemble	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JI99	85.1
24S-125	A0A194QFA5	Hemosit protein-glutamin gama-glutamiltransferaz	Peptit çapraz bağlama	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9IXJ3	77.1
24S-126	A0A194PIG3	Hsc70-etkileşen protein	Protein dimerizasyon aktivitesi	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JM43	63.6
24S-127	A0A194RNNK0	Peptidil-prolil cis-trans izomeraz (PPIase) (EC 5.2.1.8)	Protein katlama	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9IYU4	84.8
24S-128	A0A212EXS6	Proteazom endopeptidaz kompleks (EC 3.4.25.1)	Hücrel protein katabolik sürecinde yer alan proteoliz	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9J1E8	92.8
24S-129	A0A194QVZ4	GMP redüktaz (GMPR) (EC 1.7.1.7)	Pürin nükleotit metabolik süreç	Sitoplazmik	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		Tespit edilemedi	
24S-130	A0A212EP80	Putativ letal (Fragment)	Ekzositoz	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		Tespit edilemedi	
24S-131	A0A212ETU6	Putativ carnitin o-asetiltransferaz	Transferaz aktivite, açıl grup transferi	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9J8T9	59.8
24S-132	A0A0N0PCB0	60S ribozomal protein L22 2	Translasyon	Çekirdek	Wolf PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		Q5UAP2	96.3

EK 3.2. Farklı Sıcaklıkların 48 Saat Uygulandığı Gruplara ait Proteinler

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer <i>B. mori</i> Protein ID	Benzerlik (%)2
48S-1	Q1HPK6	Translasyon Uzama faktörü 2 (EF-2)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	UniProt	48 Saat 18 °C	P13060	90.8	Q1HPK6	100
48S-2	A0A194Q570	Protein MEMO1	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 Saat 18 °C	Q9VG04	74.7	H9IX14	85.8
48S-3	H9J0E8	SGNH_hydro domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 Saat 18 °C	Q9VXP4	60.9	H9J0E8	100
48S-4	H9JXB6	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	WoLF PSORT	48 Saat 18 °C	Q9W1H8	76.7	H9JXB6	100
48S-5	A0A212F0X8	RNA polimeraz II transkripsiyon aracısı alt ünite 18	RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun düzenlenmesi	Çekirdek	UniProt	48 Saat 18 °C	Q9XZT1	64	H9JED0	80.9
48S-6	A0A212EMJ3	RNA helikaz (EC 3.6.4.13)	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	P09052	55.3	H9J3E9	72.8
48S-7	Q8N0P2	Isı şoku ile aynı kökenli protein (Isı şoku proteini 70)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	P11147	89.7	Q8N0P2	100
48S-8	A0A212EI48	Glutasyon S-transferaz teta (Glutasyon S-transferaz 1-1-like)	Glutasyon metabolik süreç	Mitokondriyal	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	P20432	59	Q60GK5	87.5
48S-9	Q1HQ36	Ubiquitin conjugating enzyme E2	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	P35128	88.7	Q1HQ36	100
48S-10	A0A212F9V0	Proteazom alt ünite alfa tip	Ubikuitin-bağımlı protein katabolik süreç	Çekirdek	UniProt	48 saat 30 °C	P40301	83.3	Q1HQB7	97.9
48S-11	A0A194PG29	26S proteaz düzenleyici alt ünite 4	Protein katabolik süreç	Çekirdek	UniProt	48 saat 30 °C	P48601	96.1	Tespit edilemedi	
48S-12	A0A212F4L1	Heterojen nüklear ribonükleoprotein A1 (heterojen nükleer ribonükleoprotein 87F benzeri izoform X2)	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	P48810	54.5	H9JA60	85.2
48S-13	A0A212F7J4	Pirüvat karboksilaz (EC 6.4.1.1)	Glukoneogenez	Mitokondriyal	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q0E9E2	77.8	H9JFZ5	86.8
48S-14	H9JJV4	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q7K012	58.5	H9JJV4	100
48S-15	A0A0N1IDA5	GLYR1-benzeri putativ oksidoredüktaz	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q8T079	55.3	Tespit edilemedi	
48S-16	A0A194RKT2	Süksinat--KoA ligaz [ADP/GDP-açığa çıkaran] alt ünite alfa, mitokondriyal (EC 6.2.1.4) (EC 6.2.1.5) (Süksinil-KoA sentetaz alt ünite alfa) (SCS-alfa)	TCA	Mitokondriyal	UniProt	48 saat 30 °C	Q94522	75.4	H9JTB8	86.6
48S-17	A0A212FEF5	Süksinat dehidrogenaz [ubikuinon] flavoprotein alt ünite, mitokondriyal (EC 1.3.5.1)	TCA	Mitokondriyal	UniProt	48 saat 30 °C	Q94523	73	H9JHK2	92.1
48S-18	A0A194QGB2	RNA-bağlayıcı protein lark	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q94901	65.5	H9JD13	95.5

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)2
48S-19	A0A194QPV0	Peroksiredoksin-5 (EC 1.11.1.24)	Tespit edilemedi	Peroksizom	UniProt	48 saat 30 °C	Q960M4	65.3	H9JX22	91.8
48S-20	A0A194QC71	Counting faktörü ile ilişkili protein D	Tespit edilemedi	Salgılanan	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9V3U6	63.8	H9JHZ1	83.6
48S-21	A0A0N1PIQ5	Ferritin (EC 1.16.3.1)	Hücrel demir iyonu homeostazi	Salgılanan	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VA83	43.8	H9JGY3	59.5
48S-22	A0A0N1IMX8	Filamin-A	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VEN1	76.4	Tespit edilemedi	
48S-23	H9J598	Dipeptidil peptidaz 3 (EC 3.4.14.4) (Dipeptidil peptidaz III)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VHR8	58	H9J598	100
48S-24	A0A194RE01	Beta-üredopropionaz	Azot bileşikleri metabolik süreç	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VI04	58.7	H9IWG3	76.6
48S-25	A0A194Q8Q3	Daynamin-1-benzeri protein	Ritmik süreç	Mitokondriyal	UniProt	48 saat 30 °C	Q9VQE0	71.7	Tespit edilemedi	
48S-26	A0A194QYC5	Seril-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.11)	Seril-tRNA aminoasilasyon	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VQL1	74.8	H9J390	87.2
48S-27	A0A0N1I3K6	Fosfolukomutaz	Glikoz metabolik süreç	Mitokondriyal	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VUY9	67.5	H9JD28	75.9
48S-28	A0A0N0PB49	Tirozin--tRNA ligaz (EC 6.1.1.1) (Tirozil-tRNA sentetaz)	Tirosil-tRNA aminoasilasyon	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VV60	68.7	Tespit edilemedi	
48S-29	H9JKC3	Transket_pyr domain-içeren protein	TCA	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Q9VVC5	71.7	H9JKC3	100
48S-30	H9IS78	KoAtomer alt ünite delta	Protein taşıma	Periferel membran protein/sitoplazmik taraf	UniProt	48 saat 30 °C	Q9W555	55.2	H9IS78	100
48S-31	A0A0L7LSI0	CIA30 domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9J8U6	75.1
48S-32	A0A212F9B8	Proteasome alt ünite alfa tip	Ubikuitin-bağımlı protein katabolik süreç	Sitoplazmik	UniProt	48 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9JI85	78.5
48S-33	A0A212EVI7	Ras-ile ilgili protein Rab-2B (ras- ile ilgili protein Rab-2A)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9IXE5	95.8
48S-34	H9JUB8	Lipocln_sitozolik_FA-bd_dom domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Salgılanan	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9JUB8	100
48S-35	H9JAR1	Aldehit dehidrojenaz	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 30 °C	Tespit edilemedi		H9JAR1	100
48S-36	A0A212ENA4	Fruktoz-bifosfat aldolaz (EC 4.1.2.13)	Glikolitik süreç	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 37 °C	P07764	65.3	H9JTG5	73.8
48S-37	H9IWS5	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	48 saat 37 °C	Q7KS11	46.2	H9IWS5	100
48S-38	A0A212EQ66	26S proteazom düzenleyici alt ünite RPN11	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 37 °C	Q9V3H2	92.3	Tespit edilemedi	

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)2
48S-39	A0A212EVS5	DJ-1 beta (protein dj-1beta)	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	WoLF PSORT	48 saat 37 °C	Q9VA37	55.9	H9JPA3	81.1
48S-40	A0A212EUQ6	Tioredoxin domain-içeren protein 4	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	48 saat 37 °C	Q9VXI3	69.3	H9JBP6	85.7
48S-41	A0A194QWZ9	F-aktin-şapka protein alt ünite alfa	Aktin filament kapatma	Çekirdek	WoLF PSORT	48 saat 37 °C	Q9W2N0	69.5	H9JT03	92.7
48S-42	H9JDY1	M20_dimer domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	A0A0B4LEQ0	62.3	H9JDY1	100
48S-43	A0A0N0PDP9	Transkripsiyonel aktivatör protein Pur-alfa	Tespit edilemedi	Çekirdek	UniProt	Tespit edilemedi	F3YDK4	82.1	H9J4W7	90.7
48S-44	A0A0L7LJW2	Diadenozin tetrafosfat sentetaz (EC 6.1.1.14) (Glisin--tRNA ligaz)	Glisil-tRNA aminoaçilasyon	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VUK8	68,8	Q04451	87.8
48S-45	H9JEV3	Calponin-homolog (CH) domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	M9PE30	73.4	H9JEV3	100
48S-46	A0A0N0PB72	26S proteaz düzenleyici alt ünite 8	Protein katabolik süreç	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	O18413	97	H9JXB2	99.7
48S-47	A0A0N1IP51	Tubulin alfa zincir	Mikrotübül tabanlı süreç	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P06603	98.9	H9JV50	100
48S-48	A0A0L7LEP4	Heterojen nüklear ribonükleoprotein A1 (Fragment)	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P07909	48.5	H9JA60	53.5
48S-49	H9J9S0	CCT-alfa (T-kompleks protein 1 alt ünite alfa)	Protein katlanma	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P12613	80.6	H9J9S0	100
48S-50	H9JSP9	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz [NAD(+)]. (EC 1.1.1.8)	Karbohidrat metabolik süreç	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P13706	78.8	H9JSP9	100
48S-51	A0A0N1I5N0	90 kDa ısı şoku proteini ATPaz benzeri 1 aktivatörü	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P21914	70.7	H9JMN7	93.6
48S-52	A0A0N1I5J0	Süksinat dehidrogenaz [ubiquinon] demir-sülfür alt ünite, mitokondriyal (EC 1.3.5.1)	TCA	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	P21914	70.7	H9JMN7	93.6
48S-53	A0A194PMM8	26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 7	Tespit edilemedi	Endoplazmik retikulum membran	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P26270	80.2	Q1HPL3	93.4
48S-54	A0A194PZU9	Genel transkripsiyon faktörü TFIIB (Transkripsiyon başlatma faktörü IIB)	Transkripsiyon kompleks asemble	Çekirdek	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P29052	87.9	H9J922	97.5
48S-55	H9JQN8	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	Tespit edilemedi	Endoplazmik retikulum	UniProt	Tespit edilemedi	P54399	57.2	H9JQN8	100
48S-56	I4DIL6	40S ribozomal protein S12	Translasyon	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P80455	72.7	Q5UAN1	96.4
48S-57	A0A0N0PDR2	Protein hu-li tai shao	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q02645	55.8	H9JRJ9	69.3

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)2
48S-58	A0A212ELM3	Lamin Dm0 izoform 1	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q03427	53.6	H9J2B5	89.9
48S-59	A0A194QHV4	Tubulin beta zincir	Mikrotübül tabanlı süreç	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q24560	98	Q8T8B2	98.7
48S-60	H9J4D7	Proteazom alt ünite beta	Proteazom aracılı ubiquitin bağımlı protein katabolik süreç	Çekirdek	UniProt	Tespit edilemedi	Q7K148	69	H9J4D7	100
48S-61	A0A212FHV4	Catepsin D	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q7K485	65.8	H9JP90	77.8
48S-62	A0A194QWA6	İzositrat dehidrogenaz [NADP]. (EC 1.1.1.42)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q7KUB1	82.5	H9JBL2	90.9
48S-63	H9JWZ8	Glutasyon sentaz (EC 6.3.2.3) (Glutasyon sentetaz)	Tespit edilemedi	Integral membran protein	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q8IQZ1	61.5	H9JWZ8	100
48S-64	A0A194Q2T9	Voltaj-bağımlı anyon-seçici kanal protein 3	Silyum düzenlenmesi	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q94920	61.6	H9JHF8	92.6
48S-65	A0A194PJB8	Transport ve Golgi organizasyonu protein 11	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q961C9	35.9	H9IVQ8	77.4
48S-66	H9JV99	BRO1 domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VB05	52.6	H9JV99	100
48S-67	Q5UAQ8	60S ribozomal protein L30	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VJ19	82.9	Q5UAQ8	100
48S-68	A0A194RCD3	Putativ ATP-bağımlı DNA helikaz HFM1	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VJY9	48.9	H9J7A3	91.7
48S-69	A0A0L7KSX2	Asit lipaz-2	Lipit metabolik süreç	Endoplazmik retikulum membran	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VKT9	44.1	H9J5B8	70.9
48S-70	A0A194QUR9	Adenil siklazla ilişkili protein	Hücre morfogenezi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VPX6	59.5	H9J1X8	87.3
48S-71	A0A194QC00	Riboz-fosfat difosfokinaz (EC 2.7.6.1)	Ribonükleosit monofosfat sentez süreci	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VT32	93.1	H9IVV5	99.4
48S-72	A0A194QUJ2	Nükleobindin-2	Tespit edilemedi	Salgılanan	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VVK7	47.2	H9ITR7	67.2
48S-73	Q1HPR5	NADH-ubikuinon redüktaz	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VX36	66.7	Q1HPR5	100
48S-74	Q2F6C2	CCT-beta (T-kompleks protein 1 alt ünite beta)	Protein katlanması	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q9W392	73.6	Q2F6C2	100
48S-75	A0A0L7L987	Karbonil redüktaz	Tespit edilemedi	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9J991	60.1

Kodlama	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer <i>B. mori</i> Protein ID	Benzerlik (%) ²
48S-76	A0A0N1PHY5	SKP1 benzeri G2 alelinin baskılayıcı proteini	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JPE9	76.2
48S-77	A0A194QEY1	Sinaptik vezikül membran protein VAT-1-benzeri	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9IX91	92

EK 3.3 Farklı Sıcaklıkların 24 ve 48 Saat Uygulandığı Gruplara ait Ortak Proteinler

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%) ²
1	A0A0N0PC01	2-oksooglutarat dehidrogenaz kompleksi dihidrolipoilisiz rezidüsü süksiniltransferaz bileşeni, mitokondriyal (EC 2.3.1.61) (E2K)	TCA	Mitokondriyal	WoLF PSORT	18 ve 30 °C	Q9VGQ1	68.2	H9J2S8	70
2	A0A0L7L4C4	Isı şoku protein hsp21.4	Metal iyon bağlama	Sitoplazmik	WoLF PSORT	24 ve 48 saat 30 °C	Q9VWG1	77	Q5R1P5	97.9
3	A0A0N1PF32	Uzama faktörü 1-alfa	Translasyon uzama faktörü aktivitesi	Sitoplazmik	UniProt	24 saat 37 °C ve 48 saat 30 °C	P08736	95	P29520	98.1
4	A0A212F799	Kompleks I-B16.6 (NADH dehidrogenaz [ubiquinone] 1 alfa alt ünite 13) (NADH-ubiquinon oksidoredüktaz B16.6 alt ünite)	Respirazom	Mitokondriyal	UniProt	48 saat 30 °C	Q9W402	59.7	H9IWG1	77.1
5	I4DIK4	40S ribozomal protein S3 (Ribozomal protein S3)	Translasyon	Mitokondriyal	WoLF PSORT	48 saat 30 °C ve 24 saat 37 °C	Tespit edilemedi		Q5UAP2	96.3
6	A0A194R521	Malik enzim	Malat dehidrogenaz (dekarboksile eden) (NAD ⁺) aktivite	Mikrozom	WoLF PSORT	24 ve 48 saat 30 °C	Q2QBM1	64.9	H9JA74	82.9
7	A0A0N0PDP4	Isı şoku 70 kDa protein benzeri 5	Protein katlanması	Mitokondriyal ve sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P29845	82.2	Tespit edilemedi	
8	A0A212F969	Elektron taşıyan flavoprotein alt ünite alfa (Alfa-ETF)	Flavin adenin dinükleotit bağlama	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q7KN94	75.8	Tespit edilemedi	
9	A0A212ERM6	Ubc protein (poliubikuitin-B)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P0CG69	99.7	H9IVY4	98.4
10	A0A0N0PD51	Guanin nükleotit-bağlayan protein alt ünite beta-benzeri protein	Tespit edilemedi	Çekirdek	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	O18640	86.2	H9JD80	95.9
11	H9JGQ9	WD_REPEATS_REGION domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		Tespit edilemedi	Q9VU68	66.6	H9JGQ9	100
12	H9JNV5	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JNV5	100
13	A0A194RR79	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Salgılanan	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JPS0	30.5
14	B2DBM1	Transgelin	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P14318	76.1	Q1HPM4	93.5
15	B3VBE3	Vakuolar proton pompası alt ünite B (V-ATPaz alt ünite B (Vakuolar proton pompası alt ünite B))	ATP metabolik süreç	Tespit edilemedi		Tespit edilemedi	P31409	98.1	B3VBE3	100

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)2
16	A0A0N1PFX2	Kısa zincirli zincir spesifik açıl-KoA dehidrogenaz, mitokondriyal	Flavin adenin dinükleotit bağlama	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VVU1	69.6	H9JP54	92.3
17	H9JHG0	NADH-ubikuinon oksidoredüktaz 75 kDa alt ünite, mitokondriyal	ATP sentezine eşlik eden elektron taşınması	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q94511	63.4	H9JHG0	100
18	A0A212EPG4	Aktin 5C izoform B (aktin-5C)	Tespit edilemedi	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P10987	100	P84183	100
19	A0A194RNR3	5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonükleotit formiltransferaz (EC 2.1.2.3) (EC 3.5.4.10) (Inozinikaz) (Fosforibozilaminoimidazolkarboksamid formiltransferaz)	de novo' IMP biyosentez süreci	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VC18	60.8	H9IYX7	80.6
20	Q2F6A1	Elektron transfer flavoprotein alt ünite beta (Beta-ETF)	Elektron transfer aktivitesi	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q0KHZ6	83	Q2F6A1	100
21	A0A194Q7R1	Elektron transfer flavoprotein-ubikuinon oksidoredüktaz (ETF-QO) (EC 1.5.5.1)	Metal iyon bağlama	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q7JWF1	67.9	H9JIR9	90.1
22	A0A194QQG7	Glukoz-6-fosfat izomeraz (EC 5.3.1.9)	Glukoneogenez	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P52029	66.1	H9J3Y2	76
23	A0A212EZM4	Glisin ayırım sistemi P protein (EC 1.4.4.2)	Glisin katabolik süreç	Mitokondriyal	UniProt	Tespit edilemedi	Q9VH09	71.3	H9IT12	91
24	A0A0L7LLA9	2-fosfo-D-gliserat hidrolizaz (EC 4.2.1.11) (Fragment)	Glikolitik süreç	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P15007	79.9	H9J7K1	86.8
25	I4DJ48	Fosfogliserat mutaz (EC 5.4.2.11) (EC 5.4.2.4)	Glikolitik süreç	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VAN7	81.6	H9JUN1	92.9
26	A0A212EN62	Fruktoz-bifosfat aldolaz (EC 4.1.2.13)	Glikolitik süreç	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P07764	84.7	Q1HPN7	94.3
27	A0A194RR70	Asparajin sentetaz [glutamin-hidrolize edici] (EC 6.3.5.4) (Glutamin-bağımlı asparajin sentetaz)	Glutamin metabolik süreç	Endoplazmik retikulum ve mitokondriyal membran-bağı protein	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JPR6	81.1
28	A0A212FN10	Hüresel retinoik asit bağlayıcı protein (sodyum/kalsiyum değişimi düzenleyici protein 1)	Lipit bağlama	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q8INK3	55.3	H9JU99	76.2
29	A0A194PLX8	Dipeptidaz (EC 3.4.13.19)	Metallodipeptidaz aktivite	Integral membran proteinini	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VBG1	56.9	H9JQI3	49.5
30	A0A212F0Z3	Hsc70/Hsp90 düzenleyici protein HOP (stresle uyarılan fosfoprotein 1)		Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JLS3	76.9

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Gen Ontoloji	Lokasyon	Lokasyon Veri Kaynağı	Uygulama	Benzer D. melanogaster Protein ID	Benzerlik (%)	Benzer B. mori Protein ID	Benzerlik (%)2
31	H9IWG3	CN hidrolaz domain-içeren protein	Azot bileşikleri metabolik süreç	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VI04	58.5	H9IWG3	100
32	A0A194QRN6	D-eritroz redüktaz	Oksidoredüktaz aktivite	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		H9JCL3	90.3
33	A0A0L7LPC3	Mitokondriyal aldehit dehidrogenaz (Fragment)	Oksidoredüktaz aktivitesi, donörlerin aldehit veya okso grubuna etki eder, alıcı olarak NAD veya NADP	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VB96	54.3	Q2F5Y9	87.3
34	A0A212EQU4	Arjinie kinaz (EC 2.7.3.3)	Fosfokreatin biyosentez süreci	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P48610	84.3	H9J8H0	92.5
35	A0A212ESF7	CCT-beta (T-kompleks protein 1 alt ünite beta)	Protein katlanma	Sitoplazmik	UniProt	Tespit edilemedi	Q9W392	75.7	Q2F6C2	92.9
36	Q2F5T3	ATP sentaz alt ünite alfa	Proton taşıyan ATP sentaz aktivitesi, dönme mekanizması	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P35381	87.8	Q2F5T3	100
37	A0A194QVH0	Katalaz (EC 1.11.1.6)	Oksidatif strese cevap	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P17336	72.5	H9ITX1	89.7
38	H9JU73	Karboksipeptidaz (EC 3.4.16.-)	Serin tipi karboksipeptidaz aktivitesi	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VDT5	53.1	H9JU73	100
39	H9JSZ7	Tiolaz_N domain-içeren protein	Transferaz aktivitesi, amino-açıl grupları dışındaki açıl gruplarının transfer edilmesi	Salgılanan	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VL70	60.9	H9JSZ7	100
40	A0A194Q038	40S ribozomal protein S17	Translasyon	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	P17704	85.6	H9IW52	98.5
41	A0A194RP27	60S ribozomal protein L10a	Translasyon	Sitoplazmik	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VTP4	84.7	H9J1F0	95.7
42	H9JE36	Süksinat-KoA ligaz alt ünite beta (EC 6.2.1.-)	TCA	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	A0A126GUR6	72.5	H9JE36	100
43	A0A194QPN6	Malat dehidrogenaz (EC 1.1.1.37)	TCA	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VKX2	73.9	H9JLM2	90.6
44	H9JU51	Malat dehidrogenaz (EC 1.1.1.37)	TCA	Mitokondriyal	WoLF PSORT	Tespit edilemedi	Q9VEB1	66.6	H9JU51	100
45	A0A212EP23	İzositrat dehidrogenaz [NADP]. (EC 1.1.1.42)	TCA	Tespit edilemedi		Tespit edilemedi	Tespit edilemedi		Q1HQ47	87.7

EK 3.4. Tanımlanan *G. mellonella* (değişen sıcaklık-24 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinlerinin yollara dağılımı.

#term ID	Tanım	Gözlenen Gen Sayısı	Arka Plan Gen Sayısı	Etkinlik	False Discovery Rate	Ağ ile Eşleşen Protein Sayısı (UniProt ID)
dme00072	Keton sentezi ve degradasyonu	2	7	1.63	0.0075	Q7K4Q9, Q9W3N9
dme00650	Bütanoat metabolizması	2	16	1.27	0.024	Q7K4Q9, Q9W3N10
dme00380	Triptofan metabolizması	2	20	1.17	0.0312	P17336, Q9W3N9
dme00640	Propanoat metabolizması	2	21	1.15	0.0312	Q94522, Q9W3N9
dme00900	Terpenoid biyosentezi	2	20	1.17	0.0312	Q7K4Q9, Q9W3N10
dme00030	Pentoz fosfat yolağı	2	24	1.09	0.0363	Q9VHN7, P07764
dme01210	2-Okzokarboksilik asit metabolizması	3	19	1.37	0.0024	Q7K4Q9, Q9W3N10, Q9VGZ3
dme00280	Valin, lösin, izölösün yıkımı	3	33	1.13	0.0078	Q7K4Q9, Q9W3N10, O18404
dme03050	Proteazom	3	51	0.94	0.023	Q9V3V6, Q9V405, P55035
dme04391	Hippo sinyal yolağı- sinek	3	58	0.88	0.028	Q7K4Q9, Q9W3N10, P53501
dme00630	Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması	4	32	1.27	0.00084	Q9VIE8, P17336, Q9W3N9, Q9VGZ3
dme00020	TCA	4	43	1.14	0.002	Q94522, Q9VIE8, Q9VD58, Q9VGZ3
dme01230	Amino asit biyosentezi	6	65	1.14	8.25E-05	Q9VD58, Q9VIE8, P07487, Q9VHN7, P07764, Q9VGZ3
dme03010	Ribozom	6	133	0.83	0.0022	Q9VA91, O61231, O76927, Q7JZW2, P19889, P48149
dme00190	Oksidatif fosforilasyon	6	140	0.8	0.0024	Q27331, Q9V7N5, O77460, Q24439, O01666, Q94511
dme04145	Fagozom	7	83	1.1	4.07E-05	Q27331, Q9V7N5, P06603, Q24560, Q95029, Q24246, P53501
dme04141	Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi	8	130	0.96	5.19E-05	P82147, Q7KN62, Q9VD29, M9MSL3, P29844, Q3YMU0, Q9VAY2, Q9V438
dme01200	Karbon metabolizması	9	117	1.06	8.47E-06	Q9VGZ3, Q9W3N9, Q9VD58, Q9VIE8, P07764, P17336, P07487, Q9VHN7, Q94522
dme01100	Metabolik yollar	23	994	0.54	8.47E-06	Q94511, O01666, Q24439, Q9VSU6, Q94522, Q9V7N5, Q27331, O18404, Q9VD58, Q9VIE8, Q9VBI2, A5XCL5, Q9VRJ4, Q9U915, P08879, Q9XTL9, P07487, Q9VHN7, P07764, Q7K4Q9, Q9W3N9, Q9VGZ3, O18373

EK 3.5. Tanımlanan *G. mellonella* (değişen sıcaklık-24 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinlerinin yollara dağılımı.

#term ID	Tanım	Gözlenen Gen Sayısı	Arka Plan Gen Sayısı	Etkinlik	False Discovery Rate	Ağ ile Eşleşen Protein Sayısı (UniProt ID)
bmor00072	Keton sentezi ve degradesyonu	2	4	1.82	0.0046	A5A798, H9JNC6
bmor00650	Bütanoat metabolizması	2	12	1.35	0.0204	A5A798, H9JNC6
bmor00640	Propanoat metabolizması	2	15	1.25	0.0279	H9JNC6, H9JTB8
bmor01210	2-Okzokarboksilik asit metabolizması	2	19	1.15	0.0395	H9JC76, H9JMD4
bmor00500	Nişasta ve sukroz metabolizması	2	20	1.12	0.0405	H9JGS8, H9JLG0
bmor00900	Terpenoid biyosentezi	2	23	1.06	0.0488	A5A798, H9JNC6
bmor00020	TCA	3	37	1.03	0.0155	H9JC76, H9JMD4, H9JTB8
bmor00630	Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması	3	36	1.04	0.0155	H9ITX1, H9JC76, H9JNC6
bmor00280	Valin, lösin, izolösin yıkımı	4	35	1.18	0.0015	Q1HPX9, A5A798, H9JC99, H9JNC6
bmor03050	Proteazom	4	33	1.21	0.0015	H9J1E8, H9J5J2, H9J723, Q2F5X3
bmor01230	Amino asit biyosentezi	5	64	1.02	0.0015	H9JC76, Q1EPM0, H9JMD4, Q1HPN7, H9JXE5
bmor04145	Fagozom	6	66	1.08	0.00018	H9JWQ1, H9IXX0, H9IYP1, Q8T8B2, Q6T9Z7, H9JWQ0
bmor00190	Oksidatif fosforilasyon	6	108	0.87	0.0015	H9J151, E5EVW5, H9JHG0, H9JPP9, H9JWQ0, Q1HPX4
bmor01200	Karbon metabolizması	8	102	1.02	3.04E-05	H9ITX1, H9JC76, Q1EPM0, H9JMD4, H9JNC6, H9JTB8, Q1HPN7, H9JXE5
bmor03010	Ribozom	8	111	0.98	4.13E-05	Q6PUF8, Q66SV9, Q5UAT0, Q5UAU1, H9J4B7, Q5UAM7, Q5UAN9, Q5UAP2
bmor04141	Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi	9	115	1.02	1.01E-05	H9IVD8, H9IZ19, H9IZ84, H9J250, H9J398, Q9GSB6, H9J5Q7, F8UN44, H9JT91
bmor01100	Metabolik yollar	26	831	0.62	3.23E-08	Q1HPX9, D2Y062, H9IZF8, H9J151, H9J385, H9J3A0, A5A798, H9J3S9, H9JC76, H9JC99, H9JCW5, H9JD41, Q1EPM0, H9JDV4, H9JGS8, H9JHG0, H9JLG0, H9JMD4, H9JNC6, H9JPP9, H9JQH9, H9JTB8, Q1HPN7, H9JWQ0, Q1HPX4, H9JXE5

EK 3.6. Tanımlanan *G. mellonella* (değişen sıcaklık-48 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinlerinin yollara dağılımı.

#term ID	Tanım	Gözlenen Gen Sayısı	Arka Plan Gen Sayısı	Etkinlik	False Discovery Rate	Ağ ile Eşleşen Protein Sayısı (UniProt ID)
dme00030	Pentoz fosfat yolağı	3	24	1.48	0.0017	Q9VUY9, Q9VT32, P07764
dme01230	Amino asit biyosentezi	4	65	1.17	0.0017	Q9VT32, Q0E9E2, P07764, Q7KUB1
dme00020	TCA	6	43	1.53	0.00000192	Q94522, P21914, Q94523, Q0E9E2, Q7KUB1, Q9VVC5
dme03050	Proteazom	6	51	1.45	0.00000192	O18413, Q9V3H2, P40301, P48601, Q7K148, P26270
dme01200	Karbon metabolizması	8	117	1.22	0.00000192	Q94522, Q9VT32, P21914, Q94523, Q0E9E2, P07764, Q7KUB1, Q9VVC5
dme01100	Metabolik yollar	14	994	0.53	0.00053	Q9W1H8, Q94522, Q9VXP4, Q9VX36, Q9VUY9, Q9VT32, Q9VI04, P21914, Q94523, Q0E9E2, Q8T079, P07764, Q7KUB1, Q9VVC5

EK 3.7. Tanımlanan *G. mellonella* (değişen sıcaklık-48 saat) proteinlerine dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinlerinin yollara dağılımı.

#term ID	Tanım	Gözlenen Gen Sayısı	Arka Plan Gen Sayısı	Etkinlik	False Discovery Rate	Ağ ile Eşleşen Protein Sayısı (UniProt ID)
bmor00340	Histidin metabolizması	2	9	1.68	0.0074	H9JAR1, H9JDY1
bmor00330	Arjinin ve prolin metabolizması	2	26	1.22	0.0362	H9JAR1, H9JDY1
bmor00380	Triptofan metabolizması	2	27	1.2	0.0362	H9JAR1, H9JKC3
bmor00071	Yağ asidi yıkımı	2	32	1.13	0.0447	H9JAR1, H9JXB6
bmor00280	Valin, lösin, izolösin yıkımı	2	35	1.09	0.0464	H9JAR1, H9JXB6
bmor00310	Lizin yıkımı	2	34	1.1	0.0464	H9JAR1, H9JKC3
bmor00620	Piruvat metabolizması	2	34	1.1	0.0464	H9JAR1, H9JFZ5
bmor00970	Aminoasit-tRNA biyosentezi	2	36	1.08	0.0464	H9J390, Q04451
bmor00410	Beta-Alanin metabolizması	3	17	1.58	0.0011	H9IWG3, H9JAR1, H9JDY1
bmor00030	Pentoz fosfat yolağı	3	25	1.41	0.0025	H9IVV5, H9JD28, H9JTG5
bmor00010	Glikoliz/ Glukoneogenezis	3	41	1.2	0.0074	H9JAR1, H9JD28, H9JTG5
bmor00480	Glutasyon metabolizması	3	44	1.17	0.0074	Q60GK5, H9JBL2, H9JWZ8
bmor00190	Oksidatif fosforilasyon	3	108	0.78	0.0464	H9JHK2, H9JMN7, Q1HPR5
bmor04144	Endositoz	3	101	0.81	0.0464	Q8N0P2, H9JT03, H9JV99
bmor01230	Amino asit biyosentezi	4	64	1.13	0.0025	H9IVV5, H9JBL2, H9JFZ5, H9JTG5
bmor03050	Proteazom	5	33	1.51	1.10E-05	H9J4D7, Q1HPL3, H9JI85, Q1HQB7, H9JXB2
bmor00020	TCA	6	37	1.54	2.10E-06	H9JBL2, H9JFZ5, H9JHK2, H9JKC3, H9JMN7, H9JTB8
bmor01200	Karbon metabolizması	8	102	1.23	2.10E-06	H9IVV5, H9JBL2, H9JFZ5, H9JHK2, H9JKC3, H9JMN7, H9JTB8, H9JTG5
bmor01100	Metabolik yollar	17	831	0.64	3.73E-06	H9IVV5, H9IWG3, H9J0E8, H9J991, H9JAR1, H9JBL2, H9JD28, H9JDY1, H9JFZ5, H9JHK2, H9JKC3, H9JMN7, Q1HPR5, H9JTB8, H9JTG5, H9JWZ8, H9JXB6

EK 3.8. Tanımlanan *G. mellonella* (değişen sıcaklık-24 ve 48 saat ortak) proteinlerine dizi benzerliği gösteren *D. melanogaster* proteinlerinin yollara dağılımı.

#term ID	Tanım	Gözlenen Gen Sayısı	Arka Plan Gen Sayısı	Etkinlik	False Discovery Rate	Ağ ile Eşleşen Protein Sayısı (UniProt ID)
dme00410	Beta-Alanin metabolizması	2	18	1,62	0,0047	Q9VI04,Q9VB96
dme00380	Triptofan metabolizması	2	20	1,58	0,0052	P17336,Q9VB96
dme00030	Pentoz fosfat yolağı	2	24	1,5	0,0067	P52029,P07764
dme00260	Glisin, serin, tireonin metabolizması	2	28	1,43	0,0083	Q9VH09,Q9VAN7
dme00270	Sistein, metionin metabolizması	2	33	1,36	0,0105	Q9VKX2,Q9VEB1
dme00310	Lizin yıkımı	2	35	1,33	0,011	Q9VGQ1,Q9VB96
dme01212	Yağ asidi metabolizması	2	44	1,23	0,0158	Q9VVU1,Q9VL70
dme00330	Arjinin ve prolin metabolizması	2	53	1,15	0,0211	P48610,Q9VB96
dme03018	RNA yıkımı	2	58	1,11	0,0237	P15007,P29845
dme04145	Fagozom	2	83	0,96	0,0435	P31409,P10987
dme00071	Yağ asidi yıkımı	3	33	1,53	0,00079	Q9VVU1,Q9VL70,Q9VB96
dme00280	Valin, lösin, izolösin yıkımı	3	33	1,53	0,00079	Q9VVU1,Q9VL70,Q9VB96
dme00020	TCA	3	43	1,42	0,0012	Q9VKX2,Q9VGQ1,Q9VEB1
dme01230	Amino asit biyosentezi	3	65	1,24	0,0031	P15007,Q9VAN7,P07764
dme00630	Gliksilat ve dikarboksilat metabolizması	4	32	1,67	2,37E-05	P17336,Q9VKX2,Q9VH09,Q9VEB1
dme00620	Pirüvat metabolizması	4	45	1,52	6,65E-05	Q9VKX2,Q2QBM1,Q9VEB1,Q9VB96
dme00190	Oksidatif fosforilasyon	4	140	1,03	0,0025	Q9W402,Q94511,P35381,P31409
dme00010	Glikoliz/ Glukoneogenezis	5	55	1,53	6,61E-06	P15007,Q9VAN7,P52029,Q9VB96,P07764
dme01200	Karbon metabolizması	10	117	1,51	3,13E-11	P17336,P15007,Q9VKX2,Q9VH09,Q9VGQ1,Q2QBM1,Q9VEB1,Q9VAN7,P52029,P07764
dme01100	Metabolik yollar	18	994	0,83	2,52E-10	Q9W402,Q94511,P35381,Q9VVU1,P15007,Q9VL70,Q9VKX2,Q9VI04,Q9VH09,Q9VGQ1,Q2QBM1,P31409,Q9VEB1,Q9VAN7,P52029,Q9VC18,Q9VB96,P07764

EK 3.9. Tanımlanan *G. mellonella* (değişen sıcaklık-24 ve 48 saat ortak) proteinlerine dizi benzerliği gösteren *B. mori* proteinlerinin yollara dağılımı.

#term ID	Tanım	Gözlenen Gen Sayısı	Arka Plan Gen Sayısı	Etkinlik	False Discovery Rate	Ağ ile Eşleşen Protein Sayısı (UniProt ID)
bmor00410	Beta-Alanin metabolizması	2	17	1,63	0,0048	H9IWG3,Q2F5Y9
bmor00030	Pentoz fosfat yolağı	2	25	1,47	0,0089	H9J3Y2,Q1HPN7
bmor00330	Arjinin ve prolin metabolizması	2	26	1,45	0,0089	H9J8H0,Q2F5Y9
bmor00380	Triptofan metabolizması	2	27	1,43	0,0089	H9ITX1,Q2F5Y9
bmor00260	Glisin, serin, tireonin metabolizması	2	31	1,37	0,0107	H9IT12,H9JUN1
bmor00270	Sistein, metionin metabolizması	2	35	1,32	0,0118	H9JLM2,H9JU51
bmor01212	Yağ asidi metabolizması	2	53	1,14	0,024	H9JP54,H9JSZ7
bmor00071	Yağ asidi yıkımı	3	32	1,53	0,00064	Q2F5Y9,H9JP54,H9JSZ7
bmor00280	Valin, lösin, izolösin yıkımı	3	35	1,5	0,00073	Q2F5Y9,H9JP54,H9JSZ7
bmor03010	Ribozom	3	111	0,99	0,0107	H9IW52,H9J1F0,Q5UAP2
bmor00020	TCA	4	37	1,6	3,61E-05	Q1HQ47,H9JE36,H9JLM2,H9JU51
bmor00620	Piruvat metabolizması	4	34	1,63	3,61E-05	H9JA74,Q2F5Y9,H9JLM2,H9JU51
bmor00630	Gliksilat ve dikarboksilat metabolizması	4	36	1,61	3,61E-05	H9IT12,H9ITX1,H9JLM2,H9JU51
bmor01230	Amino asit biyosentezi	4	64	1,36	0,00021	H9J7K1,Q1HQ47,Q1HPN7,H9JUN1
bmor00190	Oksidatif fosforilasyon	4	108	1,13	0,001	H9IWG1,Q2F5T3,B3VBE3,H9JHG0
bmor00010	Glikoliz/ Glukoneogenezis	5	41	1,65	2,16E-06	H9J3Y2,H9J7K1,Q2F5Y9,Q1HPN7,H9JUN1
bmor01200	Karbon metabolizması	11	102	1,6	1,46E-13	H9IT12,H9ITX1,H9J3Y2,H9J7K1,H9JA74,Q1HQ47,H9JE36,H9JLM2,Q1HPN7,H9JU51,H9JUN1
bmor01100	Metabolik yollar	22	831	0,99	9,42E-16	H9IT12,H9IWG1,H9IWG3,Q2F5T3,B3VBE3,H9IYX7,H9J3Y2,H9J7K1,H9J8H0,H9JA74,H9JCL3,Q1HQ47,H9JE36,H9JHG0,Q2F5Y9,H9JLM2,H9JP54,H9JPR6,H9JSZ7,Q1HPN7,H9JU51,H9JUN1

EK 3.10. Yirmi dört saat uygulamasına ait tanımlanan proteinlerin Reactome ile değerlendirilmesi.

Numara	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
1	A0A0L7LJF6	Anneksin	Tespit edilemedi	Q8INK3	Trigliserit metabolizması.
2	A0A0N0PBV0	İzositrat dehidrogenaz [NAD] alt ünite, mitokondriyal	Tespit edilemedi	Q94511	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
3	H9JTB8	Süksinat--KoA ligaz [ADP/GDP-forming] alt ünite alfa, mitokondriyal (EC 6.2.1.4) (EC 6.2.1.5) (Süksinil-KoA sentetaz alt ünite alfa) (SCS-alfa)	24 saat 37 °C	Q94522	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
4	A0A212F8Q4	RNA-bağlayıcı protein lark	24 saat 37 °C	Q94901	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
5	A0A0N0PE34	İzositrat dehidrogenaz [NAD] alt ünite beta, mitokondriyal	Tespit edilemedi	Q9VD58	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
6	A0A194QVC2	Mitokondriyal-processing peptidaz alt ünite beta	Tespit edilemedi	Q9VFF0	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
7	A0A212EUY6	Akonitat hidrataz (EC 4.2.1.3) (Fragment)	Tespit edilemedi	Q9VIE8	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
8	A0A212F576	Sitrat hidrolizaz (EC 4.2.1.3) (Fragment)	Tespit edilemedi	Q9VIE8	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
9	A0A0L7KT39	NADH dehidrogenaz [ubikuinon] 1 alfa kompleks alt ünite 12	Tespit edilemedi	Q9VQD7	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron taşıma.
10	A0A194PW14	Dehidrogenaz/redüktaz SDR ailesi üyesi 4	Tespit edilemedi	Q9VRJ4	Retinoik Asit ile Sinyal iletme, Peroksizomal protein alımı.
11	A0A0N1IAJ4	Kinezin hafif zincir	Tespit edilemedi	P46824	RHO GTPazlar, KTN1, Kinesins, Intra-Golgi ve retrograd Golgi-to-ER trafiğini, MHC sınıf II antijen sunumunu, ALK füzyonları ile sinyalleşmeyi ve aktive edilmiş nokta mutantlarını aktive eder.
12	A0A194Q1Q4	Protein NipSnap	24 saat 37 °C	Q9VXK0	RHO GTPaz döngüsü.
13	A0A0L7LQD1	Staphylococcal nükleaz domain-içeren protein 1	Tespit edilemedi	Q9VU68	Platelette artmış sitozolik Ca ²⁺ 'ya yanıt.
14	H9JK90	Ubikuitin karboksi-terminal hidrolaz (EC 3.4.19.12)	Tespit edilemedi	Q9VZU7	Protein ubikuitinasyonu, Deubikuitinasyon.
15	H9JXE5	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Q9VHN7	Pentoz fosfat yolu.
16	Q1HPX4	ATP sentaz alt ünite gamma	24 saat 30 °C	O01666	Organel biyogenezi ve bakımı, Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron iletimi.
17	H9JPP9	ATP sentaz alt ünite O, mitokondriyal	Tespit edilemedi	Q24439	Organel biyogenezi ve bakımı, Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum elektron iletimi.

Numara	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
18	A0A212EIE9	cAMP-bağımlı protein kinaz R2 (cAMP-bağımlı protein kinaz tip II düzenleyici alt ünite)	Tespit edilemedi	P81900	Organel biyogenezi ve bakımı, G2/M Geçışı, Mitotik G2-G2/M evreleri, Silium Birleşmesi, Hedgehog 'kapalı' durumu.
19	A0A212FKT7	Ribozomal protein S5	Tespit edilemedi	Q9V3T9	Steroid hormonlarının metabolizması, defektif CYP11A1, AICSR'ye neden olur, Mitokondriyal demir-sülfür küme biyogenezi.
20	A0A212F9L5	Putativ laminin A zincir (laminin alt ünite gamma-1)	24 saat 37 °C	P15215	Proteinlerin metabolizması, İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF) taşınması ve alımının İnsülin benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler (IGFBP'ler) tarafından düzenlenmesi, Gelişim biyolojisi, EGR2 ve SOX10 aracılı Schwann hücre miyelinasyonunun başlatılması, MET ile sinyal verilmesi, Hücre dışı matris organizasyonu, Hücre dışı matrisin bozulması, L1CAM etkileşimleri.
21	H9JDV4	Nükleozit difosfat kinaz (EC 2.7.4.6)	Tespit edilemedi	P08879	Nükleotitlerin Metabolizması, Nükleotit di- ve trifosfatların birbirine dönüşümü.
22	A0A0N1PI50	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz [NAD(+)] (EC 1.1.1.8)	Tespit edilemedi	P13706	Lipid metabolizması, Gliserofosfolipid biyosentezi.
23	A0A194R6Y9	Fruktoz-bifosfat aldolaz (EC 4.1.2.13)	Tespit edilemedi	P07764	Karbohidrat metabolizması.
24	A0A212FNP3	Selenofosfat sentetaz 1	Tespit edilemedi	O18373	Amino asit ve türevlerinin metabolizması, Selenosistein sentezi, Selenoamino asit metabolizması.
25	A0A194PLH7	3-hidroksiaçil-KoA dehidrogenaz tip-2	24 Saat 18 °C	O18404	Amino asitlerin ve türevlerinin metabolizması.
26	A0A194QYW2	Dihidropteridin redüktaz	Tespit edilemedi	Q9VSU6	Amino asitlerin ve türevlerinin metabolizması.
27	A0A194PSL1	AsetilKoA asetiltransferaz, mitokondriyal	Tespit edilemedi	Q9W3N9	Amino asitlerin ve türevlerinin metabolizması.
28	A5A798	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sentaz (HMG-KoA sentaz) (EC 2.3.3.10)	Tespit edilemedi	Q7K4Q9	Keton vücut metabolizması, PPARalfa tarafından lipid metabolizmasının düzenlenmesi.
29	A0A0N1ICI4	Sitrat hidrolizaz (EC 4.2.1.3) (Sitoplazmik akonitat hidrataz)	Tespit edilemedi	Q9VGZ3	Demir alımı ve taşınması.
30	A0A194R0M3	Adenilat kinaz (EC 2.7.4.3)	24 saat 30 °C	Q9U915	Nükleotit di- ve trifosfatların birbirine dönüşümü.
31	A0A194QZM2	UMP-CMP kinaz (EC 2.7.4.14)	Tespit edilemedi	Q9VBI2	Nükleotit di- ve trifosfatların birbirine dönüşümü.
32	A0A194QME0	Ökaryotik transkripsiyon başlatıcı faktör 5	Tespit edilemedi	Q9VXK6	GTP hidrolizi ve 60S ribozomal alt ünitenin birleştirilmesi, Ökaryotik transkripsiyon başlatma.
33	A0A194PIF2	Alfa-1,4 glukan fosforilaz (EC 2.4.1.1)	Tespit edilemedi	Q9XTL9	Glikojen metabolizması.
34	A0A194R5L3	Ökaryotik transkripsiyon başlatıcı faktör 5A (eIF-5A)	24 saat 37 °C	Q9GU68	Gama karboksilasyonu, hiposin oluşumu ve arilsülfataz aktivasyonu.

Numara	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
35	A0A194QF74	Serin/tireonin-protein fosfataz 2A 65 kDa düzenleyici alt ünite A alfa izoform	24 Saat 18 °C	P36179	G2/M Geçışı, Mitotik G2-G2/M evreleri.
36	H9IWQ1	Tubulin beta zincir	Tespit edilemedi	Q24560	CCT/TriC ile tubulin katlama ara ürünlerinin oluşumu, Prefoldin aracılı substratın CCT/TriC'ye transferi, Prefoldin ve TriC/CCT'nin aktin ve tübülün katlanmasında işbirliği, Strese hücrel tepkiler, Şaperonin aracılı protein katlanması, Uyarılara hücrel tepkiler, Protein katlanma, Organel biyogenezi ve bakımı, G2/M Geçışı, Mitotik G2-G2/M evreleri, Silium Birleşmesi, Hedgehog 'kapalı' durum, G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü.
37	A0A0N1PK05	Tubulin beta zincir	Tespit edilemedi	Q24560	CCT/TriC ile tubulin katlama ara ürünlerinin oluşumu, Prefoldin aracılı substratın CCT/TriC'ye transferi, Prefoldin ve TriC/CCT'nin aktin ve tübülün katlanmasında işbirliği, Strese hücrel tepkiler, Şaperonin aracılı protein katlanması, Uyarılara hücrel tepkiler, Protein katlanma, Organel biyogenezi ve bakımı, G2/M Geçışı, Mitotik G2-G2/M evreleri, Silium Birleşmesi, Hedgehog 'kapalı' durum, G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü.
38	A0A212EJZ3	Tubulin alfa zincir	Tespit edilemedi	P06603	CCT/TriC ile tübülün katlama ara ürünlerinin oluşumu.
39	A0A194QLM0	CCT-alfa (T-kompleks protein 1 alt ünite alfa)	Tespit edilemedi	P12613	CCT/TriC ile tübülün katlama ara ürünlerinin oluşumu.
40	H9IVX5	T-kompleks protein 1 alt ünite gama	Tespit edilemedi	P48605	CCT/TriC ile tübülün katlama ara ürünlerinin oluşumu.
41	A0A0N1INQ1	Tubulin beta-1 zincir	24 Saat 18 °C	Q24560	CCT/TriC ile tübülün katlama ara ürünlerinin oluşumu.
42	A0A212FJL1	CCT-teta (T-kompleks protein 1 alt ünite theta)	Tespit edilemedi	Q7K3J0	CCT/TriC ile tübülün katlama ara ürünlerinin oluşumu.
43	Q2F6C3	Şaperonin alt ünite 6a zeta	Tespit edilemedi	Q9VXQ5	CCT/TriC ile tübülün katlama ara ürünlerinin oluşumu.
44	A0A0L7LHN5	Pirolin-5-karboksilat dehidrogenaz	Tespit edilemedi	Q9W392	CCT/TriC ile tübülün katlama ara ürünlerinin oluşumu.
45	A0A212EPX7	Aktin (aktin ile ilgili protein 3)	Tespit edilemedi	P32392	Fcgamma reseptörüne (FCGR) bağımlı fagositoz, FCGR3A aracılı fagositoz, EPH-Ephrin sinyali, Klatrin aracılı endositoz.
46	A0A212FAS0	Vezikül-birleştirici ATPaz (EC 3.6.4.6)	Tespit edilemedi	Q7KN62	E3 ubikuitin ligazları hedef proteinleri ubikuitinate, Nötrofil degranülasyonu, DNA Hasarı Atlaması, Deubikuitinasyon, Protein metilasyonu, Agregajı, Asparajin N-bağılı glikozilasyon, Hh mutantları ERAD tarafından bozunur, Hedgehog ligand biyogenezi, ABC-ailesi proteinleri aracılı taşımaya neden olur, Defektif CFTR, Isı stresine hücrel tepki, Deubikuitinasyon, RHO GTPaz döngüsü.

Numara	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
47	Q6T3A7	Tiol Peroksiredoksin	24 saat 30 °C	Q9V3P0	Reaktif Oksijen Türlerinin Detoksifikasyonu, TP53 Metabolik Genleri Düzenler, Düzensiz CDK5, Alzheimer hastalığında birden fazla nörodejeneratif yolu tetikler.
48	H9J8M2	Trafik protein kompleksi alt ünite	Tespit edilemedi	Q9VLI9	COPII aracılı vezikül taşınması, RAB GEF'ler, RAB'ler, Syndecan etkileşimleri üzerinde GTP ile GSYİH değişimi.
49	A0A212FHR9	Katepsin L proteinaz (katepsin L izoform X1)	Tespit edilemedi	Q95029	Sınıf I MHC aracılı antijen işleme ve sunumu, RUNX1, MHC sınıf II antijen sunumu ile transkripsiyonel düzenleme, Endozomal TLR'nin taşınması ve işlenmesi, Hücre dışı matrisin bozulması, Kollajen bozulması, Kollajen fibrillerinin ve diğer multimerik yapıların toplanması.
50	A0A212F1F4	GTP-bağlayıcı protein SAR1b (GTP-bağlayıcı protein sar1)	Tespit edilemedi	Q9VD29	Sınıf I MHC aracılı antijen işleme ve sunumu, MHC sınıf II antijen sunumu, SREBP (SREBF) ile kolesterol biyosentezinin düzenlenmesi, COPII aracılı vezikül taşınması, ER'de kargo konsantrasyonu, Plazma lipoprotein birleşimi, yeniden şekillenme ve temizleme.
51	A0A212FGT6	Protein disülfid-izomeraz (EC 5.3.4.1)	24 saat 37 °C	Q3YMU0	Sınıf I MHC aracılı antijen işleme ve sunumu, Asparajin N-bağlı glikozilasyon.
52	A0A0L7L6B3	Limpet protein	Tespit edilemedi	P08736	Şaperon aracılı otofaji, Isı stresine hücrel tepki, Protein Metilasyonu, Ökaryotik transkripsiyon uzaması, Nötrofil degranülasyonu.
58	Q2F5X3	26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 4	Tespit edilemedi	P55035	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, SLIT'lerin ve ROBO'ların ekspresyonunun düzenlenmesi, Amino asitlerin ve türevlerinin metabolizması, G2/M Geçiş, Mitotik G2-G2/M evreleri, Hedgehog 'kapalı' durumu, G2 kontrol noktasından sonra GTSE1'in G2'deki rolü /M ilerleme.
59	A0A194PLU9	26S proteaz düzenleyici alt ünite 6A	Tespit edilemedi	Q9V3V6	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, SLIT'lerin ve ROBO'ların ekspresyonunun düzenlenmesi, Amino asitlerin ve türevlerinin metabolizması, G2/M Geçiş, Mitotik G2-G2/M evreleri, Hedgehog 'kapalı' durumu, G2 kontrol noktasından sonra GTSE1'in G2'deki rolü /M ilerleme.
60	A0A212ERW1	26S protease düzenleyici alt ünite 6B (26S proteazom düzenleyici alt ünite 6B)	Tespit edilemedi	Q9V405	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, SLIT'lerin ve ROBO'ların ekspresyonunun düzenlenmesi, Amino asitlerin ve türevlerinin metabolizması, G2/M Geçiş, Mitotik G2-G2/M evreleri, Hedgehog 'kapalı' durumu, G2 kontrol noktasından sonra GTSE1'in G2'deki rolü /M ilerleme.
61	H9IYP1	WD_REPEATS_REGION domain-içeren protein	24 Saat 18 °C	Q24246	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, Organel biyogenez ve bakımı, G2/M Geçiş, Mitotik G2-G2/M evreleri, Silium Birleşmesi.
62	A0A0L7L560	Kalretikulin	Tespit edilemedi	P29845	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, Organel biyogenez ve bakımı.
63	A0A212FEQ6	60S asidik ribozomal protein P0	Tespit edilemedi	P19889	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, SLIT'lerin ve ROBO'ların ekspresyonunun düzenlenmesi, Amino asit ve türevlerinin metabolizması, Selenosistein sentezi, GTP hidrolizi ve 60S ribozomal alt ünitenin birleştirilmesi, Açlığa hücrel tepki, Selenoamino asit metabolizması, Ökaryotik transkripsiyon başlatma.

Numara	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
64	A0A194RIZ0	H(+)-taşıyan iki birimliATPaz (EC 7.1.2.2)	24 Saat 18 °C	Q27331	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, Açlığa hücrel tepkiler.
65	H9JWQ0	V-tip proton ATPaz alt ünite C	Tespit edilemedi	Q9V7N5	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler, Açlığa hücrel tepkiler.
66	H9ITX1	Katalaz (EC 1.11.1.6)	Tespit edilemedi	P17336	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler.
67	A0A0N0PFU8	Protein disülfid izomeraz A6	Tespit edilemedi	Q9V438	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler.
68	H9JT91	Uncharacterized protein	24 saat 30 °C	Q9VAY2	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler.
69	A0A0N1IEI0	Peptidilprolin izomeraz (EC 5.2.1.8)	Tespit edilemedi	Q9VL78	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler.
70	F8UN44	Isı şoku protein 70-3	24 Saat 18 °C	P29844	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler.
71	A0A194PKJ2	Isı şoku 70 kDa protein 4L	Tespit edilemedi	M9MSL3	Strese hücrel tepkiler, Uyarılara hücrel tepkiler.
72	A0A212EUA9	Alfa-aktinin sarkomerik	Tespit edilemedi	P18091	Hücre-hücre iletişimi, Hücre dışı matris organizasyonu, Sinyal iletimi.
73	A0A194PP56	14-3-3 protein zeta	24 saat 30 °C	P29310	Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları, Apoptoz İçin İçsel Yol, TP53 Metabolik Genleri Düzenler, SLC2A4'ün (GLUT4) plazma zarına yer değiştirmesi, FOXO aracılı transkripsiyon.
74	A0A212EUI1	Troponin I	24 saat 37 °C	P36188	Kalp iletim, Çizgili Kas Kasılması.
75	A0A194RDC8	Troponin I	Tespit edilemedi	P36188	Kalp iletim, Çizgili Kas Kasılması.
76	H9JPG9	Transferrin	24 saat 37 °C	Q9VWV6	Bulunamadı
77	A0A212FJV5	Fosfatidat fosfataz (EC 3.1.3.4)	Tespit edilemedi	A0A0B4JD00	Bulunamadı
78	A0A194Q0Y5	Protein hu-li tai shao	Tespit edilemedi	A0A0B4K7A5	Bulunamadı
79	A0A194PXA9	Ubikuitin-aktive eden enzim E1 (EC 6.2.1.45)	24 saat 30 °C	A0A0B4KF46	Bulunamadı
80	A0A194R7F0	Heterojen nükleer ribonükleoprotein R	Tespit edilemedi	A0A0B4KHI4	Bulunamadı
81	A0A0N1INR1	40S ribozomal protein S15 (EC 2.5.1.25)	24 saat 37 °C	A1ZAH8	Bulunamadı
82	A0A194RHU0	UTP—glukoz-1-fosfat uridiltransferaz (EC 2.7.7.9)	Tespit edilemedi	A5XCL5	Bulunamadı
83	Q2F5N1	Prohibitin	Tespit edilemedi	A8DYI7	Bulunamadı
84	A0A212F964	Uncharacterized protein (Fragment)	24 saat 30 °C	C0HK92	Bulunamadı
85	A0A194QB90	Uzama faktörü 1-alfa	24 saat 30 °C	M9PD08	Bulunamadı
86	H9JCV2	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	O02649	Bulunamadı
87	H9JXG1	Uncharacterized protein	24 saat 30 °C	P05661	Bulunamadı
88	A0A0L7LTZ0	Uncharacterized protein	24 Saat 18 °C	P06754	Bulunamadı
89	H9J0L9	Maltaz	Tespit edilemedi	P07190	Bulunamadı
90	Q1EPM0	Gliseralehit-3-fosfat dehidrogenaz (EC 1.2.1.12)	Tespit edilemedi	P07487	Bulunamadı

Numara	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
91	Q1HPU0	Tropomiyozin-1	Tespit edilemedi	P09491	Bulunamadı
92	A0A0L7LMS4	GTP-bağlayıcı nüklear protein	Tespit edilemedi	P14318	Bulunamadı
93	Q68HB4	Profilin	Tespit edilemedi	P25843	Bulunamadı
94	H9ITN2	Miyozin_tail_1 domain-içeren protein	Tespit edilemedi	P35415	Bulunamadı
95	H9ITN3	Miyozin_tail_1 domain-içeren protein	Tespit edilemedi	P35415	Bulunamadı
96	A0A212FJB4	Putativ hrp48.1	Tespit edilemedi	P48809	Bulunamadı
97	A0A212EZ57	Aktin (aktin, kas)	Tespit edilemedi	P53501	Bulunamadı
98	Q9GSB6	Isı şoku protein hsp20.4	Tespit edilemedi	P82147	Bulunamadı
99	H9IZM8	Uncharacterized protein	24 saat 37 °C	Q0E8X8	Bulunamadı
100	A0A194PME6	Klavesin-2	Tespit edilemedi	Q2MGL8	Bulunamadı
101	A0A0N1IQ26	Polen-spesifik protein SF3	Tespit edilemedi	Q59DP4	Bulunamadı
102	A0A212EJU8	Kanopi-1 benzeri protein	Tespit edilemedi	Q7JXF7	Bulunamadı
103	A0A194PDR4	Vigilin	Tespit edilemedi	Q7KN75	Bulunamadı
104	A0A194Q8A1	Four and a half LIM domains protein 2	Tespit edilemedi	Q7KUQ5	Bulunamadı
105	A0A212F8M7	Kısa-zincir dehidrogenaz/redüktaz	Tespit edilemedi	Q8IPP8	Bulunamadı
106	A0A194QE2	EH domain-içeren protein 1	Tespit edilemedi	Q8T6I0	Bulunamadı
107	Q27451	Fenoloksidaz alt ünite 1 (EC 1.14.18.1) (PO 1) (Tirozinaz 1)	24 saat 37 °C	Q9V521	Bulunamadı
108	A0A194R1H9	Fosfatidilinozitol taşıma protein alfa izoform	Tespit edilemedi	Q9VDY8	Bulunamadı
109	A0A0N1IIW8	Epidermal büyüme faktörü reseptör kinaz substrat 8	Tespit edilemedi	Q9VPU7	Bulunamadı
110	A0A194QE52	Seril-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.11)	Tespit edilemedi	Q9VQL1	Bulunamadı
111	H9JQL3	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Q9VSL2	Bulunamadı
112	A0A212F2C1	Tirozin--tRNA ligaz (EC 6.1.1.1) (Tirozil-tRNA sentetaz)	Tespit edilemedi	Q9VV60	Bulunamadı
113	A0A194RM69	Uncharacterized protein	24 Saat 18 °C	Q9VY78	Bulunamadı
114	I4DJA4	Poli(U)-spesifik endoribonükleaz (EC 3.1.-.-)	24 saat 30 °C	Q9VZ49	Bulunamadı
115	H9ITD6	Uncharacterized protein	Tespit edilemedi	Q9VZ69	Bulunamadı
116	A0A212FDZ4	Transgelin	Tespit edilemedi	Q9VZI1	Bulunamadı
117	A0A0L7KPU4	Aldo-keto redüktaz	24 saat 30 °C	Q9VZK8	Bulunamadı

EK 3.11. Kırk sekiz saat uygulamasına ait tanımlanan proteinlerin Reactome ile değerlendirilmesi.

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
1	A0A194QGB2	RNA-bağlayıcı protein lark	48 saat 30 °C	Q94901	RUNX2 tarafından transkripsiyonel düzenleme.
2	A0A0N1IP51	Tubulin alfa zincir	Tespit edilemedi	P06603	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, Hedgehog tarafından sinyalizasyon, Hedgehog 'kapalı' durumu.
3	A0A194QHV4	Tubulin beta zincir	Tespit edilemedi	Q24560	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, Hedgehog tarafından sinyalizasyon, Hedgehog 'kapalı' durumu.
4	A0A0N0PB72	26S proteaz düzenleyici alt ünite 8	Tespit edilemedi	O18413	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, AUF1 (hnRNP D0) mRNA'yı bağlar ve destabilize eder, Hedgehog ligand biyogenezi, Hedgehog ile Sinyalleşme, Hedgehog 'kapalı' durumu, proteazom aracılı bozunma ile aktive edilmiş PAK-2p34'ün düzenlenmesi, Çapraz- çözünür eksojen antijenlerin (endozomlar) sunumu, Ornitin dekarboksilazın (ODC) düzenlenmesi, p53-Bağımsız DNA Hasar Tepkisi, p53-Bağımsız G1/S DNA hasar kontrol noktası, Fosforillenmiş Cdc25A'nın Ubikuitin Aracılı Bozunması, E3 ubikuitin likuitin COP1, Ubikuitin Aracılı Bozunması Siklin D'nin bağımlı bozunması, CD4'ün Vpu aracılı bozunması, Apoptozun Düzenlenmesi, AU açısından zengin elementleri bağlayan proteinler tarafından mRNA stabilitesinin düzenlenmesi, FBXL7, mitotik giriş sırasında ve erken mitozda AURKA'yı aşağı düzenler, SCF-beta-TrCP aracılı bozunma Emi1, AXIN'in Bozulması, NOTCH4 sinyalinin negatif düzenlenmesi, RUNX3 ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesi, APOBEC3G'nin Vif aracılı bozulması, Hh mutantları ERA tarafından bozulur D, DVL Bozulması, NFE2L2 ile ROS algılama.
5	A0A194PMM8	26S proteazom ATPaz olmayan düzenleyici alt ünite 7	Tespit edilemedi	P26270	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, AUF1 (hnRNP D0) mRNA'yı bağlar ve destabilize eder, Hedgehog ligand biyogenezi, Hedgehog ile Sinyalleşme, Hedgehog 'kapalı' durumu, proteazom aracılı bozunma ile aktive edilmiş PAK-2p34'ün düzenlenmesi, Çapraz- çözünür eksojen antijenlerin (endozomlar) sunumu, Ornitin dekarboksilazın (ODC) düzenlenmesi, p53-Bağımsız DNA Hasar Tepkisi, p53-Bağımsız G1/S DNA hasar kontrol noktası, Fosforillenmiş Cdc25A'nın Ubikuitin Aracılı Bozunması, E3 ubikuitin likuitin COP1, Ubikuitin Aracılı Bozunması Siklin D'nin bağımlı bozunması, CD4'ün Vpu aracılı bozunması, Apoptozun Düzenlenmesi, AU açısından zengin elementleri bağlayan proteinler tarafından mRNA stabilitesinin düzenlenmesi, FBXL7, mitotik giriş sırasında ve erken mitozda AURKA'yı aşağı düzenler, SCF-beta-TrCP aracılı bozunma Emi1, AXIN'in Bozulması, NOTCH4 sinyalinin negatif düzenlenmesi, RUNX3 ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesi, APOBEC3G'nin Vif aracılı bozulması, Hh mutantları ERA tarafından bozulur D, DVL Bozulması, NFE2L2 ile ROS algılama.

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
6	A0A212F9V0	Proteazom alt ünite alfa tip	48 saat 30 °C	P40301	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, AUF1 (hnRNP D0) mRNA'yı bağlar ve destabilize eder, Hedgehod ligand biyogenezi, Hedgehod ile Sinyalleşme, Hedgehod 'kapalı' durumu, proteazom aracılı bozunma ile aktive edilmiş PAK-2p34'ün düzenlenmesi, Çapraz- çözünür eksojen antijenlerin (endozomlar) sunumu, Ornitin dekarboksilazın (ODC) düzenlenmesi, p53-Bağımsız DNA Hasar Tepkisi, p53-Bağımsız G1/S DNA hasar kontrol noktası, Fosforillenmiş Cdc25A'nın Ubikuitin Aracılı Bozunması, E3 ubikuitin likuitin COP1, Ubikuitin Aracılı Bozunması Siklin D'nin bağımlı bozunması, CD4'ün Vpu aracılı bozunması, Apoptozun Düzenlenmesi, AU açısından zengin elementleri bağlayan proteinler tarafından mRNA stabilitesinin düzenlenmesi, FBXL7, mitotik giriş sırasında ve erken mitozda AURKA'yı aşağı düzenler, SCF-beta-TrCP aracılı bozunma Emi1, AXIN'in Bozulması, NOTCH4 sinyalinin negatif düzenlenmesi, RUNX3 ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesi, APOBEC3G'nin Vif aracılı bozulması, Hh mutantları ERA tarafından bozulur D, DVL Bozulması, NFE2L2 ile ROS algılama.
7	A0A194PG29	26S proteaz düzenleyici alt ünite 4	48 saat 30 °C	P48601	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, AUF1 (hnRNP D0) mRNA'yı bağlar ve destabilize eder, Hedgehod ligand biyogenezi, Hedgehod ile Sinyalleşme, Hedgehod 'kapalı' durumu, proteazom aracılı bozunma ile aktive edilmiş PAK-2p34'ün düzenlenmesi, Çapraz- çözünür eksojen antijenlerin (endozomlar) sunumu, Ornitin dekarboksilazın (ODC) düzenlenmesi, p53-Bağımsız DNA Hasar Tepkisi, p53-Bağımsız G1/S DNA hasar kontrol noktası, Fosforillenmiş Cdc25A'nın Ubikuitin Aracılı Bozunması, E3 ubikuitin likuitin COP1, Ubikuitin Aracılı Bozunması Siklin D'nin bağımlı bozunması, CD4'ün Vpu aracılı bozunması, Apoptozun Düzenlenmesi, AU açısından zengin elementleri bağlayan proteinler tarafından mRNA stabilitesinin düzenlenmesi, FBXL7, mitotik giriş sırasında ve erken mitozda AURKA'yı aşağı düzenler, SCF-beta-TrCP aracılı bozunma Emi1, AXIN'in Bozulması, NOTCH4 sinyalinin negatif düzenlenmesi, RUNX3 ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesi, APOBEC3G'nin Vif aracılı bozulması, Hh mutantları ERA tarafından bozulur D, DVL Bozulması, NFE2L2 ile ROS algılama.
8	H9J4D7	Proteazom alt ünite beta	Tespit edilemedi	Q7K148	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, AUF1 (hnRNP D0) mRNA'yı bağlar ve destabilize eder, Hedgehod ligand biyogenezi, Hedgehod ile Sinyalleşme, Hedgehod 'kapalı' durumu, proteazom aracılı bozunma ile aktive edilmiş PAK-2p34'ün düzenlenmesi, Çapraz- çözünür eksojen antijenlerin (endozomlar) sunumu, Ornitin dekarboksilazın (ODC) düzenlenmesi, p53-Bağımsız DNA Hasar Tepkisi, p53-Bağımsız G1/S DNA hasar kontrol noktası, Fosforillenmiş Cdc25A'nın Ubikuitin Aracılı Bozunması, E3 ubikuitin likuitin COP1, Ubikuitin Aracılı Bozunması Siklin D'nin bağımlı bozunması, CD4'ün Vpu aracılı bozunması, Apoptozun Düzenlenmesi, AU açısından zengin elementleri bağlayan proteinler tarafından mRNA stabilitesinin düzenlenmesi, FBXL7, mitotik giriş sırasında ve erken mitozda AURKA'yı aşağı düzenler, SCF-beta-TrCP aracılı bozunma Emi1, AXIN'in Bozulması, NOTCH4 sinyalinin negatif düzenlenmesi, RUNX3 ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesi, APOBEC3G'nin Vif aracılı bozulması, Hh mutantları ERA tarafından bozulur D, DVL Bozulması, NFE2L2 ile ROS algılama.

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
9	A0A212EQ66	26S proteazom düzenleyici alt ünite RPN11	48 saat 37 °C	Q9V3H2	G2 kontrol noktasından sonra G2/M ilerlemesinde GTSE1'in rolü, AUF1 (hnRNP D0) mRNA'yı bağlar ve destabilize eder, Hedgehod ligand biyogenezi, Hedgehod ile Sinyalleşme, Hedgehod 'kapalı' durumu, proteazom aracılı bozunma ile aktive edilmiş PAK-2p34'ün düzenlenmesi, Çapraz- çözünür eksojen antijenlerin (endozomlar) sunumu, Ornitin dekarboksilazın (ODC) düzenlenmesi, p53-Bağımsız DNA Hasar Tepkisi, p53-Bağımsız G1/S DNA hasar kontrol noktası, Fosforillenmiş Cdc25A'nın Ubikuitin Aracılı Bozunması, E3 ubikuitin likuitin COP1, Ubikuitin Aracılı Bozunması Siklin D'nin bağımlı bozunması, CD4'ün Vpu aracılı bozunması, Apoptozun Düzenlenmesi, AU açısından zengin elementleri bağlayan proteinler tarafından mRNA stabilitesinin düzenlenmesi, FBXL7, mitotik giriş sırasında ve erken mitozda AURKA'yı aşağı düzenler, SCF-beta-TrCP aracılı bozunma Emi1, AXIN'in Bozulması, NOTCH4 sinyalinin negatif düzenlenmesi, RUNX3 ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesi, APOBEC3G'nin Vif aracılı bozulması, Hh mutantları ERA tarafından bozulur D, DVL Bozulması, NFE2L2 ile ROS algılama.
10	A0A0N1I5N0	90 kDa ısı şoku proteini ATPaz benzeri 1 aktivatörü	Tespit edilemedi	P21914	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum Elektron taşınması, Solunum Elektron taşınması, kemiozmotik eşleşme ile ATP sentezi ve proteinleri ayırarak ısı üretimi.
11	A0A0N1I5J0	Süksinat xcv dehidrogenaz [ubiquinon] demir-sülfür alt ünite, mitokondriyal (EC 1.3.5.1)	Tespit edilemedi	P21914	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum Elektron taşınması, Solunum Elektron taşınması, kemiozmotik eşleşme ile ATP sentezi ve proteinleri ayırarak ısı üretimi.
12	A0A212FEF5	Süksinat dehidrogenaz [ubiquinone] flavoprotein alt ünite, mitokondriyal (EC 1.3.5.1)	48 saat 30 °C	Q94523	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum Elektron taşınması, Solunum Elektron taşınması, kemiozmotik eşleşme ile ATP sentezi ve proteinleri ayırarak ısı üretimi.

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
13	A0A194RKT2	Süksinat--KoA ligaz [ADP/GDP-oluşturan] alt ünite alfa, mitokondriyal (EC 6.2.1.4) (EC 6.2.1.5) (Süksinil-KoA sentetaz alt ünite alfa) (SCS-alfa)	48 saat 30 °C	Q94522	Sitrik asit (TCA) döngüsü ve solunum Elektron transport.
14	A0A212EVS5	DJ-1 beta (protein dj-1beta)	48 saat 37 °C	Q9VA37	Transkripsiyon kofaktörlerinin SUMOilasyonu, Şaperon Aracılı Otofaji, Geç endozomal mikrootofaji, Aggregafaji.
15	A0A194QUR9	Adenil siklaz ile ilgili protein	Tespit edilemedi	Q9VPX6	ROBO reseptörleri tarafından sinyal, Artmış trombosit sitozolik Ca ²⁺ ya yanıt, Nötrofil degranülasyonu.
16	A0A194Q570	Protein MEMO1	48 Saat 18 °C	Q9VG04	ERBB2 tarafından sinyalizasyon.
17	A0A194PZU9	Genel transkripsiyon faktörü TFIIB (Transkripsiyon başlatma faktörü IIB)	Tespit edilemedi	P29052	RNA Polimeraz II Transkripsiyon, RNA polimeraz II, snRNA genlerini kopyalar, HIV Yaşam Döngüsü.
18	A0A0N0PDR2	Protein hu-li tai shao	Tespit edilemedi	Q02645	RHO GTPase döngüsü, Çeşitli taşıma ve etkileri
19	Q1HPR5	NADH-ubikuinon redüktaz	Tespit edilemedi	Q9VX36	Solunum Elektron taşıması, kemiozmotik eşleşme ile ATP sentezi ve proteinleri ayırarak ısı üretimi.
20	A0A194QUJ2	Nükleobindin-2	Tespit edilemedi	Q9VVK7	İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF) taşınmasının ve insülin benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinleri (ILGFP'ler) tarafından alınımının düzenlenmesi.
21	H9J9S0	CCT-alfa (T-kompleks protein 1 alt ünite alfa)	Tespit edilemedi	P12613	Protein katlanması, Interlökin-12 stimülasyonundan sonra JAK-STAT sinyaliyle Gen ve protein ekspresyonu, Silium Asemble.
22	H9JJV4	Uncharacterized protein	48 saat 30 °C	Q7K012	Nükleotit Eksizyon Onarımı, Debikuitinasyon, RUNX1, Kromatin organizasyonu tarafından transkripsiyonel düzenleme.
23	A0A194RE01	Beta-ureidopropionase	48 saat 30 °C	Q9VI04	Nükleotit katabolizması.
24	Q2F6C2	CCT-beta (T-kompleks protein 1 alt ünite beta)	Tespit edilemedi	Q9W392	Nötrofil degranülasyonu, Protein katlanması, Silium asemble, RHO GTPaz döngüsü.

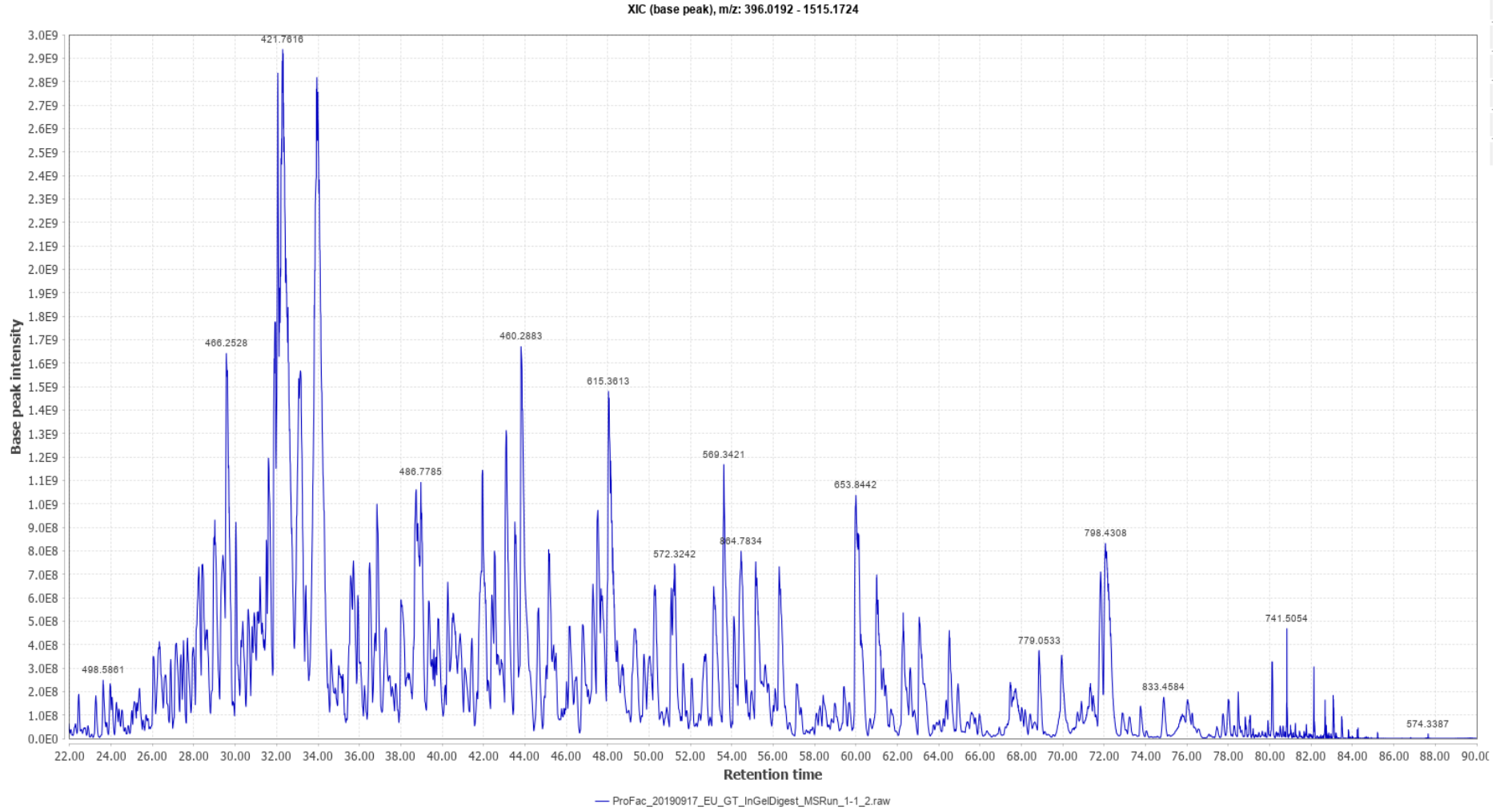
Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
25	A0A0N1I3K6	Fosfoglukomutaz	48 saat 30 °C	Q9VUY9	Nötrofil degranülasyonu, Protein katlanması, Silium asemble, RHO GTPaz döngüsü.
26	Q1HQ36	Ubikuitin konjuge enzim E2	48 saat 30 °C	P35128	Endozomda başlatılan MyD88 bağımlı kaskadı, plazma zarında başlatılan MyD88:MAL(TIRAP) kaskadı, Interlökin-1 ailesi sinyalleme, Fc epsilon reseptörü (FCER1) sinyali, TCR sinyali, C-tipi lektin reseptörleri (CLR'ler), Agrefaji, Nükleotit-layıcı bağ etki alanı, lösin açısından zengin tekrar içeren reseptör (NLR) sinyal yolu, MyD88'den bağımsız TLR4 kaskadı, Toll Like Reseptör 3 (TLR3) Cascade, TAK1, IKK kompleksinin fosforilasyonu ve aktivasyonu ile NFkB'yi aktive eder, MAP kinaz aktivasyonu, Sınıf I MHC aracılı antijen işleme & sunum, ISG15 antiviral mekanizma, E3 ubikuitin ligaz ubikuitinat hedef proteinler.
27	H9JXB6	Uncharacterized protein	48 Saat 18 °C	Q9W1H8	Mitochondriyal Yağ Asidi Beta Oksidasyonu, Gliserofosfolipid biyosentezi.
28	I4DIL6	40S ribozomal protein S12	Tespit edilemedi	P80455	Çekirdekçik ve sitozolde rRNA işlemenin ana yolu, Ökaryotik tranlasyon başlatma, Grip Enfeksiyonu, Selenoamino asit metabolizması, Ökaryotik tranlasyon uzaması, EIF2AK4'ün (GCN2) amino asit eksikliğine tepkisi, ROBO reseptörleri tarafından sinyalizasyon, Non-sense Aracılı Bozunma (NMD), Zarı hedefleyen SRP'ye bağımlı kotranslasyon proteini, Ökaryotik tranlasyon sonlandırma.
29	H9IS78	Koatomer alt ünite delta	48 saat 30 °C	Q9W555	Golgi içi ve geriye dönük Golgi-ER arası trafik, COPI aracılı ileriye dönük taşıma.
30	H9J0E8	SGNH_hydro domain-içeren protein	48 Saat 18 °C	Q9VXP4	Golgi içi ve geriye dönük Golgi-ER arası trafik.
31	H9JQN8	Protein disülfid izomeraz (EC 5.3.4.1)	Tespit edilemedi	P54399	Hedgehog ligant biyogenezi, Hedgehog sinyal iletimi.
32	H9JSP9	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz [NAD(+)]. (EC 1.1.1.8)	Tespit edilemedi	P13706	Gliserofosfolipit biyosentezi.
33	A0A212ENA4	Fruktoz-bifosfat aldolaz (EC 4.1.2.13)	48 saat 37 °C	P07764	Glikoz metabolizması, Fruktoz metabolizması, Kalıtsal fruktoz intoleransı.
34	A0A194RCD3	Putativ ATP-bağımlı DNA helikaz HFM1	Tespit edilemedi	Q9VJY9	RNA aracılı gen susturma.
35	Q1HPK6	Translasyon uzama faktörü 2 (EF-2)	48 Saat 18 °C	P13060	Gama karboksilasyonu, hiposin oluşumu ve arilsülfataz aktivasyonu, Nötrofil degranülasyonu, Protein metilasyonu, Difteri toksininin alımı ve işlevi, Ökaryotik Translasyon Uzaması.

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
36	Q5UAQ8	60S ribozomal protein L30	Tespit edilemedi	Q9VJ19	Ökaryotik translayon başlatma, Çekirdekçik ve sitozolde rRNA işlemenin ana yolu, Grip Enfeksiyonu, Selenoamino asit metabolizması, Ökaryotik translayon uzaması, EIF2AK4'ün (GCN2) amino asit eksikliğine yanıtı, ROBO reseptörleri tarafından sinyalleme, Non-sense Aracılı Bozunma (NMD), Membrani hedefleyen SRP'ye bağımlı kotranslasyon proteini, Ökaryotik translayon sonlandırma.
37	A0A212FHV4	Katepsin D	Tespit edilemedi	Q7K485	ESR aracılı sinyalleşme, MHC sınıf II antijen sunumu, Nötrofil degranülasyonu, Kollajen bozulması, Anjiyotensinojenin Anjiyotensinlere Metabolizması.
38	A0A194Q2T9	Voltaj bağımlı anyon seçici kanal protein 3	Tespit edilemedi	Q94920	Deubikuitinasyon, Mitokondriyal kalsiyum iyon transportu.
39	A0A212F7J4	Pirüvat karboksilaz (EC 6.4.1.1)	48 saat 30 °C	Q0E9E2	Defektif HLCS çoklu karboksilaz eksikliğine neden olur, Suda çözünen vitamin ve kofaktörlerin metabolizması, Glikoz metabolizması,
40	A0A0N1IMX8	Filamin-A	48 saat 30 °C	Q9VEN1	Hücre bağlantı organizasyonu, RHO GTPaz'lar PAK'ları aktive eder, GP1b-IX-V aktivasyon sinyali, Artmış trombosit sitozolik Ca ²⁺ 'ya yanıt, OAS antiviral yanıtı
41	Q8N0P2	Isı şoku kognat protein (Isı şoku protein 70)	48 saat 30 °C	P11147	AUF1 (hnRNP D0) mRNA'yı bağlar ve destabilize eder, AU açısından zengin elementleri bağlayan proteinler tarafından mRNA stabilitesinin düzenlenmesi
42	A0A194Q8Q3	Daynamin-1-benzeri protein	48 saat 30 °C	Q9VQE0	Apoptotik uygulama fazı
43	A0A194QWZ9	F-aktin-şapka protein alt ünite alfa	48 saat 37 °C	Q9W2N0	Gelişmiş glikosilasyon son ürün reseptör sinyali, COPI aracılı anterograd taşıma, liganların varlığında steroid hormon reseptörleri (SHR) için HSP90 şaperon döngüsü, MHC sınıf II antijen sunumu, Golgi içi ve geriye dönük Golgi-ER trafiği, Megakaryositle ilgili faktörler geliştirme ve trombosit üretimi, Kokleanın iç tüy hücreleri tarafından sesin duyuşal olarak işlenmesi.
44	A0A0L7LJW2	Diadenozin tetrafosfat sentetaz (EC 6.1.1.14) (Glisin--tRNA ligaz)	Tespit edilemedi	Q9VUK8	Bulunamadı
45	H9JDY1	M20_dimer domain-içeren protein	Tespit edilemedi	A0A0B4LEQ0	Bulunamadı
46	A0A0N0PDP9	Transkripsiyonel aktivatör protein Pur-alfa	Tespit edilemedi	F3YDK4	Bulunamadı

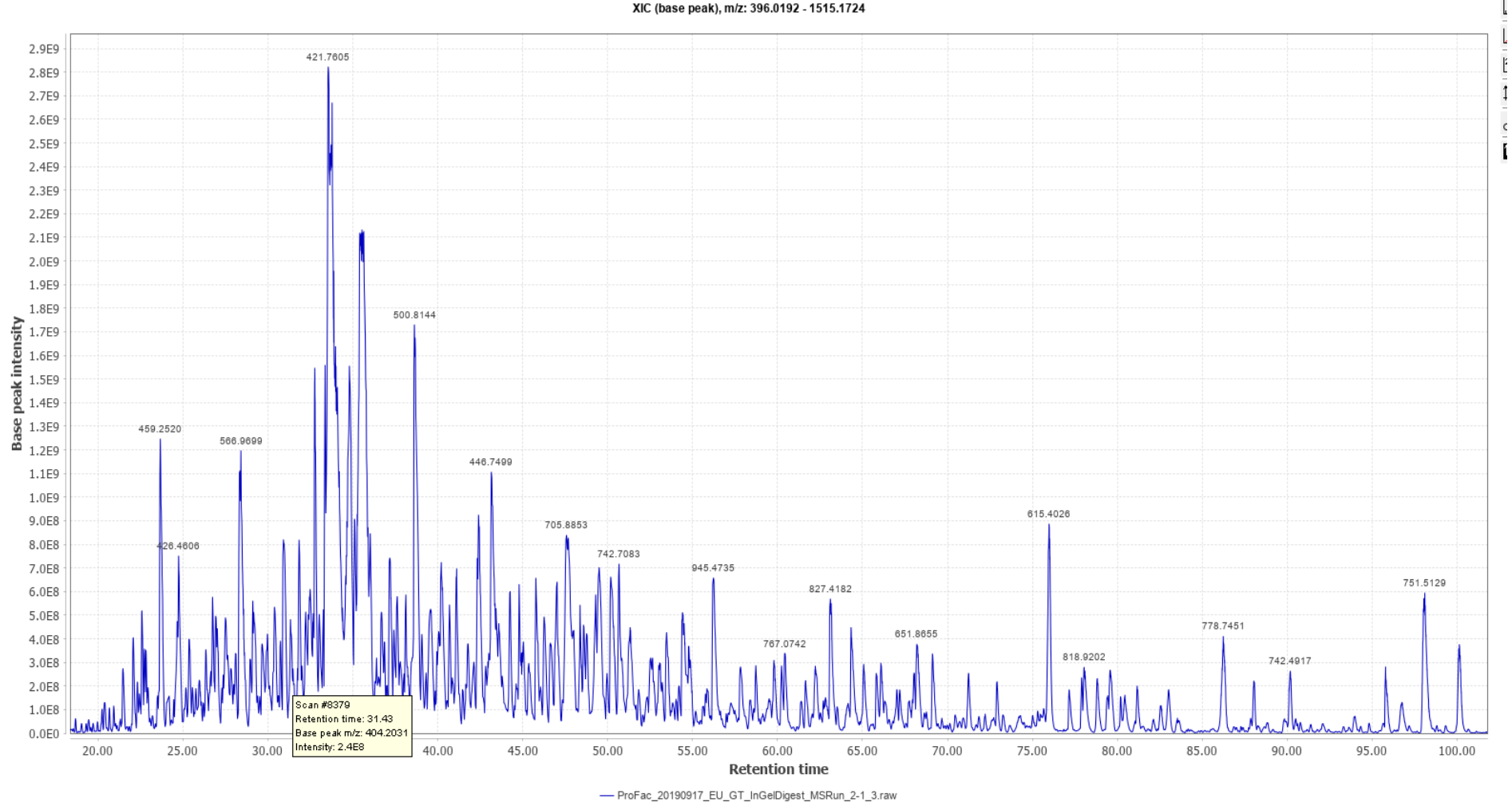
Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
47	H9JEV3	Kalponin-homolog (CH) domain-içeren protein	Tespit edilemedi	M9PE30	Bulunamadı
48	A0A0L7LEP4	Heterojen nüklear ribonükleoprotein A1 (Fragment)	Tespit edilemedi	P07909	Bulunamadı
49	A0A212EMJ3	RNA helikaz (EC 3.6.4.13)	48 saat 30 °C	P09052	Bulunamadı
50	A0A212EI48	Glutasyon S-transferaz teta (Glutasyon S-transferaz 1-1-benzeri)	48 saat 30 °C	P20432	Bulunamadı
51	A0A212F4L1	Heterojen nüklear ribonükleoprotein A1	48 saat 30 °C	P48810	Bulunamadı
52	A0A212ELM3	Lamin Dm0 isoform 1	Tespit edilemedi	Q03427	Bulunamadı
53	H9IWS5	Uncharacterized protein	48 saat 37 °C	Q7KS11	Bulunamadı
54	A0A194QWA6	İzositrat dehidrogenaz [NADP]. (EC 1.1.1.42)	Tespit edilemedi	Q7KUB1	Bulunamadı
55	H9JWZ8	Glutasyon sentaz (EC 6.3.2.3) (Glutasyon sentetaz)	Tespit edilemedi	Q8IQZ1	Bulunamadı
56	A0A0N1IDA5	Putativ oksidoredüktaz GLYR1-benzeri	48 saat 30 °C	Q8T079	Bulunamadı
57	A0A194QPV0	Peroksiredoksin-5 (EC 1.11.1.24)	48 saat 30 °C	Q960M4	Bulunamadı

Nu.	UniProt ID	Protein Adı	Uygulama	Benzer <i>D. melanogaster</i> Protein ID	Reactome'da Belirlenen Yolak
58	A0A194PJB8	Transport ve Golgi organizasyonu protein 11	Tespit edilemedi	Q961C9	Bulunamadı
59	A0A194QC71	Counting faktör ile ilgili protein D	48 saat 30 °C	Q9V3U6	Bulunamadı
60	A0A0N1PIQ5	Ferritin (EC 1.16.3.1)	48 saat 30 °C	Q9VA83	Bulunamadı
61	H9JV99	BRO1 domain-içeren protein	Tespit edilemedi	Q9VB05	Bulunamadı
62	H9J598	Dipeptidil peptidaz 3 (EC 3.4.14.4)	48 saat 30 °C	Q9VHR8	Bulunamadı
63	A0A0L7KSX2	Asit lipaz-2	Tespit edilemedi	Q9VKT9	Bulunamadı
64	A0A194QYC5	Seril-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.11)	48 saat 30 °C	Q9VQL1	Bulunamadı
65	A0A194QC00	Riboz fosfat difosfokinaz (EC 2.7.6.1)	Tespit edilemedi	Q9VT32	Bulunamadı
66	A0A0N0PB49	Tirozin--tRNA ligaz (EC 6.1.1.1) (Tirozil-tRNA sentetaz)	48 saat 30 °C	Q9VV60	Bulunamadı
67	H9JKC3	Transket_pyr domain-içeren protein	48 saat 30 °C	Q9VVC5	Bulunamadı
68	A0A212EUQ6	Tioredoksin domain-içeren protein 4	48 saat 37 °C	Q9VXI3	Bulunamadı
69	A0A212F0X8	RNA polimeraz II transkripsiyon aracısı alt ünite 18	48 Saat 18 °C	Q9XZT1	Bulunamadı

EK 4.1. Farklı Sıcaklıkların 24 Saat Uygulandığı Grup Hemolenf Proteinlerine ait Kromatogram Örneği.



EK 4.2. Farklı Sıcaklıkların 24 Saat Uygulandığı Grup Vücut Doku Proteinlerine ait Kromatogram Örneği.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Güler TOPRAK
Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi	2005
Y. Lisans	Erciyes Üniversitesi	2007

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Sönmezer, D., Latifoğlu, F., **Toprak, G.**, Düzler, A., Işoğlu, İ.A., 2021. Pericardial fluid and vascular tissue engineering: A preliminary study. Biomed Mater Eng., 32(2):101-113.
2. Özcan, S., Alessio, N., **Toprak, G.** et al., 2015. Myeloma cells can corrupt senescent mesenchymal stromal cells and impair their anti-tumor activity. Oncotarget, 6(37):39482-39492.
3. Seday, Ü., Gülşen, O., Uzun, A., **Toprak, G.**, 2014. Response of citrus rootstocks to different salinity levels for morphological and antioxidative enzyme activities. journal of animal and plant sciences, cilt.24, sa.2, ss.512-520.

4. Tez, C., Özcan, S., Gündüz, İ., Haskiliç, Ş., İbiş, O., **Toprak, G.**, 2009. Esterase variation in Turkish white-toothed shrews (*Crocidura*): Record of a trimeric esterase. Archives of Biological Sciences, 61(4):719-22.

Diğer Bilimsel Çalışmalar

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

1. Latifoğlu F., Sönmezer D., **Toprak G.**, Düzler A., İşler İ. A., Kaan D. Cell isolating from bovine pericardial fluid and culturing for next tissue engineering applications. International Conference on Technology, Engineering and Science (Icones 2018), Antalya, Türkiye, 26 - 29 Ekim 2018, cilt.4, ss.224-229.
2. Yaman C., **Toprak G.**, Coşge Şenkal B., Köse F. Seed Germination Studies on Endemic *Salvia cryptantha* Montbret & Aucher ex Benth in Turkey. International Conference on Engineering and Natural Sciences (ICENS) 2016, Sarajevo, Bosna-Hersek, 24 - 28 Mayıs 2016, cilt.5, ss.1263-1265.
3. Acar M. B., Özcan S., Galderisi U., Alessio N., **Toprak G.**, Mert E., et al., Investigation of Young and Senescent Mesenchymal Stem Cell Secretome Effects on Cancer Cell Lines. 2nd International Congress on StemCell and Cellular Therapies, 15 - 18 Ekim 2015.
4. Acar M.B., Özcan S., Galderisi U., Alessio N., **Toprak G.**, Mert E., et al. Investigation of Young and Senescent Mesenchymal Stem Cell Secretome Effects on Cancer Cell Lines. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, Antalya, Türkiye, 15 - 18 Ekim 2015, ss.206.
5. Özcan S., Acar M. B., Alessio N., Galderisi U., **Toprak G.** Mert E., et al. Secretome of naïve senescent mesenchymal stromal cell promotes senescence in ARH-77 myeloma cells: A proteome analysis of changes in secretome composition. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, Antalya, Türkiye, 15 - 18 Ekim 2015, ss.185.

6. Özcan S., Acar M. B., Alessio N., Galderisi U., **Toprak G.** Mert E., et al. Secretome of Naive Senescent Mesenchymal Stromal Cell Promotes Senescence in ARH-77 Myeloma Cells: A Proteome Analysis of Changes in Secretome Composition. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, 15 - 18 Ekim 2015.
7. Özcan S., **Toprak G.**, bütner K., Becher D. Charecterization of Antigenic Proteins in *Bordetella bronchiseptica*. 10th International Symposium on Bordetella, 8 - 11 Eylül 2013.
8. Ceylan D., **Toprak G.** Effects of H₂O₂ Stresses on Antioxidant Enzyme Systems of *Phanerochaete chrysosporium*. International Conference Enzymes Science and Technology, Aydın, Türkiye, 31 Ekim - 04 Kasım 2011, ss.78.
9. **Toprak G.**, Karadaş E., Dişyapar T., Ceylan D., Dabanlı D., Özcan S. Effects of H₂O₂ Stresses on Antioxidant Enzyme Systems of *Phanerochaete chrysosporium*. International Conference on Enzyme Science and Technology, Kayseri, Türkiye, 31 Ekim - 04 Aralık 2011, ss.78.
10. Dabanlı D., **Toprak G.**, Ceylan D., Dinç G., Özcan S. Cytotoxicity of *Echinops orientalis* extract on prostate adenocarcinoma cell line P3. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications, Kayseri, Türkiye, 7 - 09 Ekim 2011, ss.51.
11. Gönen Z. B., Özcan S., **Toprak G.**, Bahar D., Şahin F. S. Stem Cell Isolation From Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED). 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application, 7 - 09 Ekim 2011.
12. Gönen Z. B., Özcan S., **Toprak G.**, Dabanlı D., Şahin F. S. Stem Cell Isolation From Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED). 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application, Türkiye, 1 - 04 Ekim 2011, ss.76.
13. **Toprak G.**, Özcan S., Gönen Z. B., Dabanlı D., Şahin F. S. Rabbit Dental Pulp Stem Cell Cultivation. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application, Türkiye, 1 - 04 Ekim 2011, ss.74.

14. Dinç G., Özcan S., **Toprak G.**, Dabanlı D., Taheri S., Akalın H., et al. Investigation of The Role of *Piwil2* on Transition of Tumorigenic Mammary Epithelial Cells (MCF7 Cell Line) to The Breast Cancer Stem Cells. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application, Türkiye, 1 - 04 Ekim 2011, ss.55.
15. Özcan S., Dabanlı D., Şahin F. S., **Toprak G.**, Dinç G., Akalın H., et al. The Role of *Piwil2* In Reprogramming of Human Mesenchymal Stem Cells. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application, Türkiye, 1 - 04 Ekim 2011, ss.52.
16. **Toprak G.**, Ceylan D., Dabanlı D., Karadaş E., Saatçi E., Özcan S. The Effect of GFP Transfection On Gst Pi In Human Prostate Cancer Cell Line LNCap. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application, Türkiye, 1 - 04 Ekim 2011, ss.77.
17. Ceylan D., **Toprak G.**, Dabanlı D., Dişyapar T., Özcan S. The Effect Of *Piwil2* Transfection on GST Pi In Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application, Türkiye, 1 - 04 Ekim 2011, ss.79.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Sönmezer D., Latifoğlu F., **Toprak G.**, Düzler A. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on Cells Isolated from Pericardial Fluid. Medical Technologies Congress (TIPTEKNO), İzmir, Türkiye, 3 - 05 Ekim 2019, ss.184-187.
2. Sönmezer D., Latifoğlu F., Işoğlu A., Düzler A., **Toprak G.**, Ceylan D., Hücre Bileşeni ve Byomalzeime ile Vasküler Doku Üretimi. Tıp Teknolojileri Kongresi, Antalya, Türkiye, 27 - 29 Ekim 2016.
3. Özcan S., Acar M. B., Alessio N., Galderisi U., **Toprak G.**, Öztürk A. R., et al. Secretome of naïve senescent mesenchymal stromal cell promotes senescence in ARH-77 myeloma cells, this effect is dampened by cancer-priming of MSCs. A proteome analysis of changes in secretome composition. 14th Human Proteome Organizasyonu World Congres (HUPO), Vancouver, Kanada, 27 - 30 Eylül 2015, ss.161.

4. Özcan S., **Toprak G.**, Büttner K., Becher D., Otto A., Özcengiz G., et al. Immunoproteome Analysis of *Bordetella bronchiseptica* by IP- nLC-MS/MS. 14th Human Proteome Organizasyonu World Congres (HUPO), Vancouver, Kanada, 27 - 30 Eylül 2015, ss.192.
5. Yaman C., Coşge Şenkal B., **Toprak G.** *Alkanna orientalis* var. *orientalis* Tohumlarının Canlılık ve Çimlenme Potansiyeli. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Çanakkale, Türkiye, 7- 10 Eylül 2015, ss.761-764
6. Vural C., Şapcı H., **Toprak G.**, Dabanlı D., Özcan S. *Echinops antalyensis* Asteraceae türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül, Ege Üniversitesi İzmir, Türkiye, 3 - 07 Eylül 2012, ss.1306.
7. Karadaş E., Şapcı H., **Toprak G.**, Dadandı M. Y., Vural C., Özcan S. *Echinops onopordum* türünün antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi.21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, 3 - 07 Eylül 2012, ss.1241.
8. Ceylan D., **Toprak G.**, Şapcı H., Dabanlı D., Vural C., Özcan S. *Echinops rito* türünün antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül, Ege Üniversitesi İzmir, Türkiye, 3 - 07 Eylül 2012, ss.1194.
9. Vural C., **Toprak G.**, Şapcı H., Dabanlı D., Özcan S. *Echinops dumanii* türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesin incelenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül, Ege Üniversitesi İzmir, Türkiye, 3 - 07 Eylül 2012, ss.1305.
10. Dabanlı D., **Toprak G.**, Şapcı H., Vural C., Özcan S. *Echinops orientalis* türünün antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül, Ege Üniversitesi İzmir, Türkiye, 3 - 07 Eylül 2012, ss.1201.
11. Telcioğlu M., **Toprak G.**, Şapcı H., Dabanlı D., Vural C., Özcan S. *Echinops microcephalus* türünün antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, 3 - 07 Eylül 2012, ss.1294.
15. Ceylan D., **Toprak G.**, Şapcı H., Dabanlı D., Vural C., Özcan S. *Echinops ritro* türünün antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, 1 - 04 Eylül 2012, ss.1194.

16. Şapcı H., **Toprak G.**, Dabanlı D., Vural C., Özcan S. *Achillae sieheana* türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, 1 - 04 Eylül 2012, ss.1289.
18. **Toprak G.**, Ercan N., Özcan S. Cr (III), Ni (II) ve Pb (II) Ağır metal stresi uygulanan *Phanerochaete chrysosporium*'da antioksidan enzimlerde değişen miktarların belirlenmesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, Türkiye, 23 - 27 Haziran 2008, ss.253.
19. Yediyıldız A., **Toprak G.**, Özcan S. Kuraklık ve tuz stresi uygulanan buğday (*Triticum aestivum*) çeşitlerinde antioksidan enzim aktivitesindeki değişimlerin belirlenmesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, Türkiye, 23 - 27 Haziran 2008, ss.352.
20. Torun C., Özcan S., **Toprak G.**, Vural C. *Thymus argaeus*'un organik ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Trabzon, Türkiye., Türkiye, 23 - 27 Haziran 2008, ss.335.
21. Vural C., Özcan S., **Toprak G.**, Torun C. *Thymus sipyleus* Boiss subsp rosulans Borbas J. Jalas'ın organik ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi. Biyolojik Bilimleri Araştırma Dergisi (BİBAD), Türkiye, 23 - 27 Haziran 2008, ss.17-22.
22. Çakır S., Akbulut M., **Toprak G.**, Uruç K., Kılıç S. Selenyum toksisitesinin arpa bitkisinde antioksidan enzim aktivitesine etkisi. 19. Biyoloji Kongresi., Trabzon, Türkiye, 1 - 04 Haziran 2008, ss.364-365.
23. **Toprak G.**, Özcan S. Cd(II) ve Cu(II) ağır metal stresi uygulanan *Phanerochaete chrysosporium*'da antioksidan enzimlerde değişen miktarların belirlenmesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, Türkiye, 1 - 04 Haziran 2008, ss.258.

Diğer Yayınlar

1. Cantürk Tan F., Yay A.H., **Toprak G.**, Yıldız O.G., 2020. Gama radyasyonun indüklediği nefrotoksiteye karşılık pycnogenolün koruyucu etkisi. Genel Tıp Dergisi, cilt.30, sa.3, ss.140-150.

2. Özcan S., **Toprak G.**, Torun C., Vural C., 2008. *Thymus sipyleus* Boiss subsp. *rosulans* (Borbas) J. Jalas'ın organik ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi. Biyolojik Bilimleri Araştırma Dergisi (BİBAD), cilt.1, sa.1, ss.17-22.
3. Özcan S., **Toprak G.**, Erdoğan Ş., Vural C., 2008. *Thymus argaeus* Boiss. & Balansa'un Organik Ekstrakt ve Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, cilt.1, sa.1, ss.17-22.

Projeler

1. Karaciğer Fibrozis Modellerinde Sık Kullanılan Kimyasal Ajanların Farklı Doz ve Zaman Dilimindeki Etkilerinin Belirlenmesi. TSA-2016-6571. 2016-2018.
2. Sığır perikard sıvısı ve biyomalzeme kullanılarak vasküler doku üretimi. FOA-2016-6692. 2016-2019.
3. Farklı evrelerdeki Büyük Balmumu güvesi, *Galleria mellonella* larvalarının orta barsak proteinlerinin 2D-PAGE yöntemiyle analiz edilmesi FBA-2017-7680. 2017-2019.