



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



BAZI BÖCEK TÜRLERİNDE SİALİLTRANSFERAZ ENZİMLERİNİN *IN SILICO* YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI VE *IN VIVO* DOĞRULANMASI

Yüksek Lisans Tezi

Ceren ERSOY

Biyoloji Anabilim Dalı Adı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**Bazı Böcek Türlerinde Sialiltransferaz
Enzimlerinin *in silico* Yöntemlerle
Tanımlanması ve *in vivo* Doğrulanması**

Ceren ERSOY

Doç. Dr. Gamze TURGAY İZZETOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Yüksek Lisans Programı

İZMİR

2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Böcek Türlerinde Sialiltransferaz Enzimlerinin *in silico* Yöntemlerle Tanımlanması ve *in vivo* Doğrulanması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/ 02 / 2022

Ceren ERSOY

ÖZET**BAZI BÖCEK TÜRLERİNDE SİALİLTRANSFERAZ
ENZİMLERİNİN
IN SILICO YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI VE
IN VIVO DOĞRULANMASI**

Ersoy, Ceren

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gamze TURGAY İZZETOĞLU

Şubat 2022, 69 sayfa

Sialiltransferazlar, CMP-N-asetilnöraminik asit (CMP- β -Neu5Ac) donörlerinden sialik asitleri, glikokonjugatların uçlarında yer alan galaktoz (Gal), N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve N-asetilgalaktozamin (GalNAc) glikanlarına transfer eden enzimlerdir. Bu enzimler sialik asitleri glikokonjugatlara α 2-3, α 2-6 ve α 2-8 glikozidik bağları ile bağlarlar. Glikozidik bağlarına göre sialiltransferazlar 4 gruba ayrılırlar: β -galaktozit α 2,3-sialiltransferaz (ST3Gal I-VI), β -galaktozit α 2,6-sialiltransferaz (ST6Gal I-II), N-asetilgalaktozamin α 2,6-sialiltransferaz (ST6GalNAc I-VI), α 2,8-sialiltransferaz (ST8Sia I-VI). Omurgalı genomunda 20 tane sialiltransferaz bilinmektedir. Omurgasızlarda ise çalışmalar azdır, bu sebeple genomları bilinen böceklerin genel kullanıma açık veri tabanlarından elde edilen transkriptomdan (tüm mRNA dizileri) sialiltransferaz motif dizileri [sialilmotif L (large), sialilmotif S (small), sialilmotif VS (very small) ve sialilmotif III] hesaplamalı yöntemler ile tespit edilerek böceklerdeki sialiltransferazlar belirlenmiştir. Memelilerdeki sialiltransferaz enzimlerinin üç boyutlu yapılarıyla karşılaştırılarak aralarındaki benzerliklerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Ayrıca sialik asitli yapraklarla beslenen *Bombyx mori* larvalarında sialiltransferaz ST6Gal I gen ekspresyon seviyeleri Real-time PCR ile belirlenmiştir.

Yapılan biyoinformatik araştırmalar sonucunda sadece *Manduca sexta* ve *Galleria mellonella* türlerinde bu motifler bulunabilmiştir. Yine de bunun olabilesi gelecek çalışmalar ve evrimsel açıdan çok önemlidir. *M. sexta*'da omurgalılarıdaki ST6GalNAc I ve *G. mellonella*'da ise omurgalılarıdaki ST3Gal IV ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Real-time PCR sonuçlarına bakıldığında ipek böceğinin (*B. mori*) farklı gün ve farklı dokularında ST6Gal I gen ekspresyon

seviyeleri hepsinde değişiktir. Sialik asit uygulaması yapılan dokular arasında ST6Gal I ekspresyon seviyesi en yüksek yağ dokusu de görölmüştür.

Bu bilgiler omurgasızlarda sialiltransferazlar üzerine çalışmalara devam edilmesi için yol gösterici özellik taşımaktadır. Genomu belirlenen böceklerde çalışıldıkça sialiltransferaz enzimi için yeni diziler ortaya çıkacaktır. Bu da evrimsel açıdan da bu konu üzerine yeni çalışmalar yapılmasının göstergesidir.

Anahtar sözcükler: Böcek, sialik asit, sialiltransferaz, sialilmotif, Real-time PCR, biyoinformatik.



ABSTRACT

***IN SILICO* IDENTIFICATION AND *IN VIVO* VALIDATION OF SIALYLTRANSFERASE ENZYMES IN SOME INSECT SPECIES**

ERSOY, Ceren

MSc in Biology.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gamze TURGAY İZZETOĞLU

February 2022, 69 pages

Sialyltransferases are enzymes that transfer sialic acids from CMP- N-acetylneuramic acid (CMP- β -Neu5Ac) to galatose (Gal), N-acetylglucosamine (N-GlcNAc), N-acetylgalactosamine (N-GalNAc) glycans located at the ends of glycoconjugates. These enzymes transfer sialic acids to glycoconjugates via α 2-3, α 2-6, and α 2-8 glycosidic links. Sialyltransferases divided 4 groups by glycosidic links: β -galactoside α 2,3-sialyltransferase (ST3Gal I-VI), β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (ST6Gal I-II), N-acetylgalactosamine α 2,6- sialyltransferase (ST6GalNAc I-VI), α 2,8-sialyltransferase (ST8Sia I-VI). 20 sialyltransferases are known in the vertebrate genome. Studies in invertebrates are scarce, so sialyltransferase motif sequences (sialylmotif L (large), sialylmotif S (small), sialylmotif VS (very small) and sialylmotif III) in transcriptome (all mRNA sequences), obtained from genome databases of insects, will be determined by computational methods and sialyltransferases in insects defined. It is aimed to reveal the similarities between the three-dimensional structures of sialyltransferase enzymes in mammals. In addition, *Bombyx mori* ST6Gal I sialyltransferase gene expression determined with Real-time PCR by feeding with sialic acid leaves.

As a result of the bioinformatics studies, these motifs were found only in *Manduca sexta* and *Galleria mellonella* species. The possibility of this is very important for future studies and evolution. The sequence found in *M. sexta* was similar to ST6GalNAc I in vertebrates. The sequence found in *G. mellonella* was similar to ST3Gal IV in vertebrates. Looking at the Real-time PCR results, ST6Gal I gene expression levels are different in different tissues and in different stages of silkworm (*B. mori*). Among the tissues treated with sialic acid, the highest expression level of ST6Gal I was observed in fat body.

This information is a sign for further studies on sialyltransferases in invertebrates. As the genome determined insects were studied, new sequences for the sialyltransferase enzyme will appear. This shows, there should be future studies about evolutionary point of sialyltransferases.

Keywords: Insect, sialic acid, sialyltransferase, sialylmotif, Real-time PCR, bioinformatic.



ÖNSÖZ

Tez çalışmamın konusunu belirlerken literatür araştırmalarım sonucunda her ne kadar omurgalılarda sialiltransferazlarla ilgili çalışma olsa da omurgasızlar ve özellikle böceklerde bu konu üzerine çok az çalışma olduğunu gördük ve bu konu üzerine çalışmaya karar verdik. Bütün böceklerde sialiltransferazlar olduğunu düşündüğümüz için genomu bilinen diğer böceklerde biyoinformatik uygulamalar yaptık. Sialiltransferazlar içinde yer alan motifleri böcek protein dizilerinde programlar yardımıyla aradık. Bunun sonucunda böceklerde bazı sialiltransferazların olabileceğini belirledik. Daha sonra genomu bilinen *Bombyx mori*'de çalışarak bilinen sialiltransferaz geninin ekspresyon seviyesini gözlemledik. Bunun için ipek böceği yetiştirilmesiyle başlayıp 5. instara ulaşan larvaları kontrol ve uygulama grupları olarak ikiye ayırdık. Uygulama gruplarına sialik asit püskürtülmüş dut yapraklarıyla besledik. Hayvanlar diseksiyon edildikten sonra alınan dokulara RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-time PCR analizi yaptık.

İZMİR

08 /02 /2022

Ceren ERSOY



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sialik Asit	3
2.1.1. Sialik asit biyosentezi	4
2.2. Sialiltransferazlar	5
2.2.1. β -Galaktozit α 2,3-sialiltransferaz ailesi	7
2.2.2. β -Galaktozit α 2,6-sialiltransferaz ailesi.....	8
2.2.3. N-asetilgalaktozamin α 2,6- sialiltransferaz ailesi.....	8

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.4. α 2,8-Sialiltransferaz ailesi.....	9
2.3. Sialilmotifler	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Biyoinformatik Yöntemler.....	11
3.2. ST6Gal I Geninin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real-time PCR ile Belirlenmesi	13
3.2.1. Hayvanın yetiştirilmesi ve uygulama.....	13
3.2.2. Total RNA izolasyonu	15
3.2.3. cDNA sentezi	15
3.2.4. Real-time PCR analizi.....	16
3.2.5. İstatistiksel yöntemler	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. Biyoinformatik Sonuçlar.....	18
4.2. ST6Gal I Geninin mRNA Ekspresyon Seviyeleri.....	42
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ.....	60
TEŞEKKÜR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	69



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sialik asit sentezi.....	5
2.2. Sialiltransferaz yapısı.....	6
2.3. İnsan sialiltransferaz ailesinin 20 üyesi için homoloji gösterimi.....	7
3.1. İpek böceği yaşam döngüsü	14
4.1. <i>Homo sapiens</i> ST6Gal I dizisinde (AAH31476-1) motif L'nin gösterilmesi	32
4.2. <i>Manduca sexta</i> (XP_030035749.2), <i>Gallus gallus</i> ST6GalNAc I (NP_990571.2), <i>Homo sapiens</i> (sp Q9NSC7.1) ve <i>Mus musculus</i> (NP_035501.2)'un Clustal Omega'da hizalanması	39
4.3. <i>Galleria mellonella</i> (XP_031770363.1), <i>Gallus gallus</i> ST3Gal IV (AFN40450.1), <i>Homo sapiens</i> ST3Gal4 (AAH10645.1) ve <i>Mus musculus</i> ST3Gal4 (AAH11121.1)'un Clustal Omega'da hizalanması	40
4.4. <i>Manduca sexta</i> ve <i>Homo sapiens</i> ST6GalNAc I 3 boyutlu yapı karşılaştırması	40
4.5. <i>Galleria mellonella</i> ile <i>Homo sapiens</i> ST3Gal IV 3 boyutlu karşılaştırması	41
4.6. Sialiltransferaz genlerinin varsayımsal evrimsel süreci.....	41
4.7. Hemositlerde kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması	48
4.8. Orta bağırsakta kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

4.9. Yağ dokusunda kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	49
4.10. Testiste kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	49
4.11. Ovaryumda kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	50

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. IUPAC tek harf aminoasit kodlama	12
4.1. ST3Gal I için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	18
4.2. ST3Gal II için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.....	19
4.3. ST3Gal III için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	20
4.4. ST3Gal IV için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	21
4.5. ST3Gal V için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	22
4.6. ST3Gal VI için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	22
4.7. ST6Gal I için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	23
4.8. ST6Gal II için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.....	24
4.9. ST6GalNAc I için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri .	25
4.10. ST6GalNAc II için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	26
4.11. ST6GalNAc III için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	27
4.12. ST6GalNAc IV için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	28
4.13. ST6GalNAc V için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	29
4.14. ST6GalNAc VI için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri	30

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.15. Her sialiltransferaz için oluşturulan sialilmotifler	30
4.16. Böcek türlerinin protein dizileri.....	33
4.17. ST6Gal ailesi için olan böcek türlerinde puanlamaları.....	34
4.18. <i>Bombyx mori</i> 'de STGal I için motif L araması	35
4.19. <i>Manduca sexta</i> 'de ST6GalNAc I için motif L araması	36
4.20. <i>Galleria mellonella</i> 'da ST3Gal IV için motif L araması.....	37
4.21. 5. instar ipek böceği hemositlerinin kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları	42
4.22. 5. instar ipek böceği orta bağırsaklarının kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları.....	42
4.23. 5. instar ipek böceği yağ dokularının kontrol ve 0 uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları	43
4.24. 5. instar ipek böceğinin ovaryumlarının kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları.....	43
4.25. 5. instar ipek böceğinin testislerinin kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları	43
4.26. 260 nm/280 nm'de RNA saflığı değerleri.....	44
4.27. Real-time PCR target gen CT değerleri.....	45
4.28. Real-time PCR referans gen CT değerleri	46
4.29. Delta CT sonuçları.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Neu5Ac	N-asetilnöraminik asit
Neu5Gc	N-glikolilnöraminik asit
CMP- β -Neu5Ac	Sitidin monofosfat N-asetilnöraminik asit
CMP- β -Neu5Gc	CMP-N-glikolilnöraminik asit
CMP- β -KDN	CMP-deaminonöraminik asit
Gal	Galaktoz
GalNac	N-asetilgalaktozamin
GlcNac	N-asetilglukozamin
ST	Sialiltransferaz
ST3Gal I-VI	β -galaktosid α 2,3-sialiltransferaz I-VI
ST6Gal I-II	β -galaktosid α 2,6-sialiltransferaz I-II
ST6GalNacI-VI	N-asetilgalaktozamin α 2,6- sialiltransferaz I-VI
ST8Sia I-VI	α 2,8-sialiltransferaz I-VI
BmST	<i>Bombyx mori</i> α -2,6 sialiltransferaz
DmST	<i>Drosophila melanogaster</i> α -2,6 sialiltransferaz
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>

1. GİRİŞ

Sialiltransferazlar, CMP- β -Neu5Ac (sitidin monofosfat N-asetilnöraminik asit) donörlerinden sialik asitleri (Neu5Ac), glikokonjugatların uçlarında yer alan galaktoz (Gal), N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve N-asetilgalaktozamin (GalNAc) glikanlarına bağlayan enzimlerdir. Bu enzimler sialik asitleri glikokonjugatlara α 2-3, α 2-6 ve α 2-8 glikozidik bağları ile transfer ederler. Glikozidik bağlarına göre sialiltransferazlar 4 gruba ayrılırlar: ST3Gal I-VI (β -galaktozit α 2,3-sialiltransferaz I-VI), ST6Gal I-II (β -galaktozit α 2,6-sialiltransferaz I-II), ST6GalNAc I-VI (N-asetilgalaktozamin α 2,6-sialiltransferaz I-VI), ST8Sia I-VI (α 2,8-sialiltransferaz I-VI). Omurgalı genomunda 20 tane sialiltransferaz enzim ailesi bilinmesine (Harduin-Lepers, 2010) rağmen, omurgasızlarda özellikle de böceklerde bu konu üzerindeki çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bu nedenle model organizma olarak genel kullanıma açık veri tabanlarında genomu bilinen ve transkriptomu bulunan ipekböceği *Bombyx mori* kullanılmıştır.

Sialiltransferazlar, sialilmotif denen dört korunmuş bölgeye sahiptir. Bu motifler; sialilmotif L (large), sialilmotif S (small), sialilmotif VS (very small) ve sialilmotif III'tür. Sialilmotif L, proteinin merkezinde yer alan 45-60 aminoasitlik bölgedir. Donör substratın bağlanmasında rol oynar. Sialilmotif S, proteinin C-terminal bölgesinde bulunur, 20-30 aminoasit içerir. Donör ve alıcı substratların bağlanmasından sorumludur. Sialilmotif VS de, proteinin C-terminal bölgesinde yer alır, glutamat ve histidin dışında 4 aminoasit içerir. Katalitik aktivite gösterir. Sialilmotif III ise motif S ve VS arasındadır. Sialilmotif VS'de olduğu gibi katalitik aktivite gösterir (Takashima, 2008).

Bombyx mori ulaşılması ve bakımı kolay ayrıca genomu bilindiği için yıllardır model organizma olarak kullanılmaktadır. Böceklerde, *Drosophila melanogaster* hariç, N-glikanlar Neu5Ac şekeri içermezler. *D. melanogaster*'in α 2,6-sialiltransferaz (DmST) genom dizisi *B. mori* genom dizisiyle karşılaştırıldığında çok az benzerlik bulunmuştur. *D. melanogaster* α 2,6-sialiltransferaz, insan α 2,6-sialiltransferaz ve *B. mori* α 2,6-sialiltransferaz (BmST) transkriptleri karşılaştırıldıklarında, çok az benzerlik belirlenmişken, korunmuş bölgeler olan sialilmotiflerde yüksek oranda benzerlik görülmüştür (Kajiura et al., 2015).

B. mori'de gözlenen sialiltransferazlarla (sadece ST6Gal-I) ilgili Kajiura ve arkadaşlarının (2015) dışında literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Bu alışmada, *B. mori* 5. instar larvalarından kontrol grubu ve sialik asitli dut yaprakları ile beslenen uygulama grubu oluşturularak ST6Gal-I sialiltransferaz gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca omurgalıların protein dizilerinde sialilmotif dizileri (sialilmotif L, sialilmotif S, sialilmotif VS ve sialilmotif III) tespit edilip, elde edilen veriler analiz edilmiş ve bu sayede genomu bilinen böceklerde yer alan diğ er sialiltransferazlar gösterilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sialik Asit

Sialik asitler, glikoproteinlerin, glikolipitlerin ve GPI-zar çıpalarının N-ve O- bağı oligosakkaritlerinin en uç monomerleri olarak yer alırlar (Foster *et al.*, 1992; Brooks *et al.*, 2002). Glikokonjugatların oligosakkarit dizisinin en son ucunda yer alan sialik asitler 2. pozisyondaki karbon atomu ile alttaki şekere α 2-3, α 2-6 ve α 2-8 glikozidik bağlarıyla bağlanır (Schauer *et al.*, 1995; Kelm and Schauer, 1997). Örneğin alttaki galaktoza; onun 3 ve 6. pozisyonlarındaki karbon atomuna ya α 2-3 veya α 2-6 glikozidik bağlarla bağlanır. Altaki N-asetilgalaktozamine; onun 6. pozisyonundaki karbon atomuna α 2,6 glikozidik bağ ile bağlanır. Polisialik asitler şeklinde bulundukları zaman alttaki galaktoza α 2,3 olan bir başlangıç glikozidik bağdan sonra birbirlerine α 2-8 glikozidik bağla bağlanırlar. Çeşitli gruplarla farklı glikozidik bağların birleşmesiyle glikokonjugatlarda bulunan sialik asitlerde çok sayıda farklılık oluşturulur. Bu yapısal farklılıklar hücre içi ve hücreler arası moleküler ilişkilerde sialik asitlerin antibadiler ve lektinlerle tanınmasını belirler.

Böceklerde ilk defa sialik asit *Galleria mellonella*'nın organ kapsüllerindeki bağ dokusunun kimyasal özelliklerini belirleme çalışmaları sırasında keşfedilmiştir. Nöraminidaz (sialik asit ile alttaki şeker arasındaki bağı kesen enzim) ile enzimatik sindirime uğratılmış organ yüzeylerinin, bir katyonik boya olan rutenyum kırmızısı ile işaretlenerek ovaryum (Przelecka and Dutkowski, 1973), yağ dokusu (Dutkowski, 1977) ve sinir sistemini (Dybowska and Dutkowski, 1977) kuşatan bazal tabakalarda sialik asit bulunduğu elektron mikroskopunda gösterilmiştir. Embriyonik dönemde *Drosophila* sinir sisteminde çeşitli optik ve analitik yöntemlerle α 2,8 bağı glikozidik bağı Neu5Ac tip sialik asit varlığı tespit edilmiştir (Roth *et al.*, 1992). Spektrofotometrik yöntemle *G. mellonella*'nın larval, pupal ve ergin dönemlerin sinir sistemi, yağ dokusu ile ovaryumlarında gram kuru ağırlıkta mg olarak sialik asit belirlemeleri yapılmıştır (Karaçalı ve ark., 1995a). Yarı metamorfoz geçiren *Locusta migratoria* erginlerinde tükürük bezi, yağ dokusu, ovaryum, testis, kanat kasları ve hemolenflerinde sialik asit bulunduğu spektrofotometre ile belirlenmiştir (Karaçalı ve ark., 1995b). Aynı yıllarda lektin işaretleme yöntemiyle *Drosophila* embriyosunun pol hücresinde, blastodermde, ektoderm ve sinir sistemi hücrelerinde sialik asitlerin bulunduğu gösterilmiştir (D'Amica and Jacobs, 1995). Neu5Gc7,9Ac₂ tip sialik asit varlığı hem elektron mikroskobu yöntemiyle işaretlenerek hem de analitik yöntemle *G. mellonella*'nın larval protorasik bez

hücreleri plazma zarlarında tespit edilmiştir (Karaçalı ve ark., 1997). *Philaenus spumarius*'un Malpigi tüplerinde α 2-8 bağlı polisialik asit (Malykh *et al.*, 1999) ile *G. mellonella*'nın gelişen testislerinde (Deveci, 1997) yedi tip sialik asit; Neu5Ac, Neu5Gc, Neu4,5Ac₂, Neu5,9Ac₂, Neu2enAc, Neu5Gc9Ac, Neu5,8,9Ac₃ (Karaçalı ve ark., 1999) ve *Dociostaurus maroccanus* hemolenfinde Neu5Ac (Karaçalı ve ark., 2003) belirlenmiştir.

Böceklerde hücre yüzeylerinde bulunan sialik asitlerin görevleriyle de ilgili çalışmalar gittikçe artmaktadır. *Musca domestica*'nın tükürük bezlerinde inisitol ile birlikte 5-hidroksitriptamin reseptörü olarak iş görmektedir (Dalton, 1987). *L. migratoria*'da yumurta zarında vitellogenin reseptörü olarak rol oynadığı bildirilmiştir. *G. mellonella*'nın protorasik bezlerinde protorasikotropik hormon reseptörü olabileceği düşünülmektedir (Karaçalı ve ark., 1997). Güçlü elektronegatiflik özelliği nedeniyle iyon değiştirici gibi çalışmaktadır (Schauer, 2001). Bu özelliğine dayanarak *P. spumarius* Malpigi tüplerinde bir osmoregülatör olarak iş görmektedir (Malykh *et al.*, 1999). *Galleria mellonella*'da sialik asidin hemositlerin tanıdığı N-asetilgalaktozamin reseptörünü (Karaçalı ve Deveci, 2002) kapatan bir maske gibi rol oynadığı gösterilmiştir (Karaçalı ve ark., 2000). Larval dönemdeki protorasik bezlere nöraminidaz uygulanarak sialik asitlerin uzaklaştırılmasıyla yüzeyi yaşlandırılmış protorasik bezler elde edilmiştir. Yüzey şeker profili değiştirilmiş bu larval hücreler, larval hemositlerle yüz yüze getirildiğinde protorasik bez hücrelerine tıpkı pupal safhada olduğu gibi saldırdıkları ve bir kapsül oluşturacak şekilde kuşattığı görülmüştür (Karaçalı ve ark., 2000). Sialik asitlerin benzer maskeleyen rolü aynı böceğin larval nöral doku (Özkan ve Karaçalı., 2006), korpus kardiakum-korpus allatum kompleksi (Eratak ve Karaçalı, 2006) ve testis (Bayro ve Deveci, 2006) gibi diğer dokularının yüzey örtülerinde de gösterilmiştir. Bu çalışmalar sialik asitlerin yaşlanan ve yüzeyi değişen hücrelerin yok edilme mekanizmalarını, kendinden olmayanın (nonself) ayırt edilmesini, hemositlerin fagositoz aktivitesi için tanıdığı reseptör şekerini maskeleyişini kanıtlamaktadır.

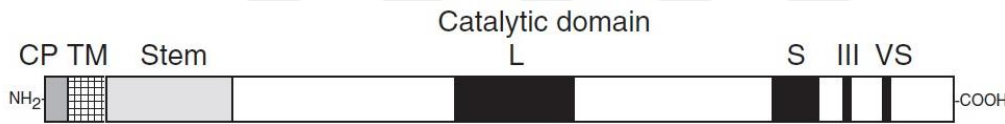
2.1.1. Sialik asit biyosentezi

Sialik asitin biyosentezinin ilk adımı uridin difosfat- N- asetilglikozaminden (UDP-GlcNAc) N-asetilmannozaminin (ManNAc) UDP-GlcNAc-2-epimeraz enzimiyle ayrılmasıdır. ManNAc, ManNAc kinaz enzimiyle fosfatlanarak ManNAc-6- fosfata dönüşür. ManNAc-6-fosfat ise NeuNAc-9-P sentaz ve fosfoenolpiruvat (PEP) ile NeuNAc-9-P (N-asetilnörömikasit-9-fosfat) oluşur. Bu Neu5Ac-9-P'den defosforilasyon ile Neu5Ac meydana gelir. CMP- Neu5Ac

Şekil 2.1. Sialik asit (Neu5Ac) biyosentezi.

Glikosiltransferazlar, aktif donörden sakkarit olan veya olmayan alıcılara bir şeker kısmının transferini katalize eden, her yerde bulunan bir enzim grubudur. Kompleks karbonhidratların ve polisakkaritlerin biyosentezi dikkate değer bir biyolojik öneme sahiptir. Bu moleküller enerji depolama, hücre duvarı yapısına katılma, hücre-hücre etkileşimleri ve sinyalleşme, konakçı-patojen etkileşimleri ve protein glikozilasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonları yönetir. Bu fonksiyonlar nedeniyle, özellikle karbonhidrat kısımların hücresel bir dil gibi davrandığı işlevler, kimyasal çeşitlilik gösteren karbonhidrat yapılara ve oligosakkarit ve polisakkaritlerin biyosentezinde rol alan yüzlerce farklı ve seçici glikosiltransferazlara dayanır (Coutinho *et al.*, 2003). Sialiltransferaz ise Golgi mebranına bağlı glikosiltransferazlardır. CAZy (karbonhidrat aktif enzim) glikosiltransferaz ailesi 29'a aittirler.

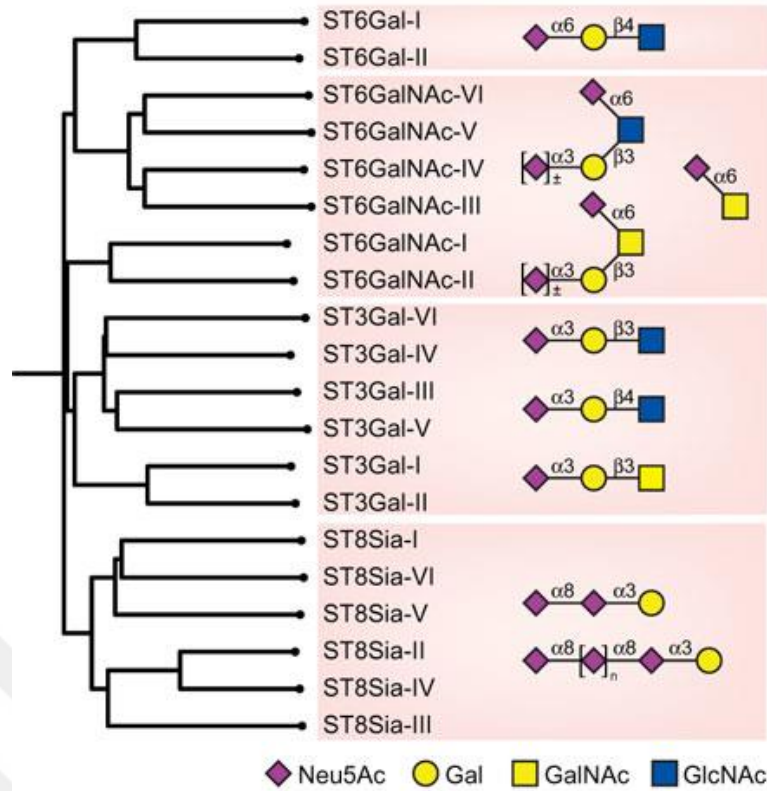
Tüm hayvan sialiltransferazları, tip II transmembran glikoproteindir ve kısa N-terminal sitoplazmik kuyruk, transmembran bölge ve katalitik bölgeden oluşur (Jeanneau *et al.*, 2004; Harduin-Lepen, 2010) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sialiltransferaz yapısı. CP; sitoplazmik kuyruk, TM; transmembran bölgesi, Catalytic domain; katalitik bölge L; sialil motif large, S; sialil motif small, III; sialil motif III, VS; sialil motif very small (Takashima, 2008).

Sialiltransferazlar α 2-3, α 2-6 ve α 2-8 glikozidik bağlarını sentezlerler, sentezledikleri karbonhidrat bağlarına ve kullandıkları monosakkaritlere göre de 4 gruba ayrılırlar (Şekil 2.3):

- β -galaktozit α 2,3-sialiltransferaz (ST3Gal I-VI)
- β -galaktozit α 2,6-sialiltransferaz (ST6Gal I-II)
- N-asetilgalaktozamin α 2,6- sialiltransferaz (ST6GalNAc I-VI)
- α 2,8-sialiltransferaz (ST8Sia I-VI)



Şekil 2.3. İnsan sialiltransferaz ailesinin 20 üyesi için homoloji gösterimi. Dört ana alt ailenin her biri tarafından üretilen sialitli ürünleri sembol biçiminde gösterilmiştir (Paulson and Rademacher, 2009).

2.2.1. β -Galaktozit α 2,3-sialiltransferaz ailesi

Yüksek omurgalı cDNA'larında 6 çeşit β -galaktozit α 2,3-sialiltransferaz belirlenmiştir. Bununla beraber 6 tane ST3Gal geni bulunmuştur. Glikokonjugantların galaktoz şekerlerine sialik asitleri α 2-3 glikozidik bağlarıyla katalize ederler (Harduin-Lepers, 2010).

Amino asit dizi benzerliklerinden, substrat spesifikliklerinden ve gen yapılarından iki alt aileye ayrılırlar. Alt ailelerden biri ST3Gal I ve ST3Gal II'yi, diğeri ise ST3Gal III, ST3Gal IV, ST3Gal V ve ST3Gal VI'yı içerir (Takashima, 2008). ST3Gal I ve ST3Gal II glikoprotein ve glikolipidlerde bulunan tip III disakkarit Gal β 1,3GalNAc oligosakkaridinin galaktozuna sialik asitleri transfer eder (Harduin-Lepers *et al.*, 2001). Farelerde ST3Gal I ve ST3Gal II genlerinin genomik yapıları benzerdir ama kromozomal yerleri farklıdır. ST3Gal I kromozom 15(15D2), ST3Gal II kromozom 8 (8q24.2)'de yer alırlar. Çoklu dizi hizalamaları omurgasızlarda ST3Gal dizilerinin varlığını göstermiştir. *Ciona intestinalis*'teki dizi ST3Gal I/II ST3Gal I ve ST3Gal II ile benzer enzimatik

aktivite gösterir ve ST3Gal I ve ST3Gal II alt ailelerinin ortak atasına ortolog olan atasal dizileri temsil edebileceği ileri sürülmüştür (Lehmann *et al.*, 2008; Harduin-Lepers, 2010).

ST3Gal III ve ST3Gal IV genellikle glikoproteinlerdeki Gal β 1,3GlcNAc ve Gal β 1,4GlcNAc yapılarını (tip I ve tip II) kullanır. ST3Gal IV knockout farelerin analizi; ST3Gal IV'ün, hemostazla ilgili plazma sialoglikoprotein N-glikanların sialilasyonunda ve iltihaplanmaya katılan glikan yapıları olan selektin ligandlarının sentezinde yer aldığını ortaya koyulmuştur (Ellies *et al.*, 2002; Takashima, 2008). ST3Gal V GM3 gangliosit sentazıdır. ST3Gal VI ise glikoprotein ve glikolipidlerde Gal β 1,4GlcNAc yapısına sialik asitleri bağlarlar. Farede ST3Gal III, ST3Gal IV ve ST3Gal VI genlerinin genomik yapıları ve ekzon intron sınırları benzerdir. Kromozomları sırasıyla 4(4D2.1), 9(9A4), 6(6C1) ve 16(16C1.2)'dir (Takashima, 2008).

2.2.2. β -Galaktozit α 2,6-sialiltransferaz ailesi

Sialiltransferaz içindeki en basit ailedir, ST6Gal I ve ST6Gal II olmak üzere iki alt aileden oluşur (Harduin *et al.*, 2001). ST6Gal I cDNA'sı ilk klonlanan sialiltransferazdır. Weinstein ve arkadaşları (1987) fare karaciğerinde, Grundmann ve ark. (1990) ise insanda ilk kez tanımlamışlardır.

Glikoproteinlerdeki tip II disakkaritin terminal galaktozuna sialik asitleri α 2-6 bağlarıyla bağlar. Üretilen rekombinant ST6Gal I ve ST6Gal II enzimleri, Gal(NAc) β 1-4GlcNAc taşıyan substratlara karşı geniş bir substrat spesifikliğı göstermiştir. Buna göre ST6Gal I oldukça geniş substrat spesifikliğı sergilerken, ST6Gal II ise kısıtlı substrat spesifikliğı sergilemektedir (Takashima, 2008; Harduin-Lepers, 2010). Tip I (Gal β 1,3GlcNAc) ve tip III (Gal β 1,3GalNAc) disakkaritleri kullanamazlar. Farede ST6Gal I ve ST6Gal II genleri benzerdir, ama kromozomal lokasyonları farklıdır. ST6GalI kromozom 16 (16B1), ST6GalII kromozom 17 (17C)'de yer alırlar (Takashima *et al.*, 2003; Takashima, 2008).

2.2.3. N-asetilgalaktozamin α 2,6- sialiltransferaz ailesi

ST6GalNAc ailesi CMP-sialik asitlerden sialikasitleri glikokonjugantlardaki N-asetilgalaktozamine α 2-6 bağlarıyla transfer eder. ST6GalNAc, 6 üyeye sahiptir ve amino asit benzerlikleri, substrat seçicilikleri ve gen yapılarına göre 2 alt aileye ayrılırlar. Alt ailelerden biri ST6GalNAc I ve ST6GalNAc II'yi, diğeri ise ST6GalNAc III, ST6GalNAc IV, ST6GalNAc V ve ST6GalNAc VI'yı içerir.

ST6GalNAc I ve II alıcı substrat olarak glikoproteinlerdeki O-glikanları, GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, Sia α 2,3Gal β 1,3GalNAc kullanırlar. Genomik yapıları benzerdir, kromozom lokasyonları farede kromozom 11(11E2), insanda ise kromozom 17(17q25)'dir.

ST6GalNAc III, IV, V ve VI ailelerinde %41,2 – 52,3 aminoasit dizi benzerliği vardır. Sia α 2,3Gal β 1,3GalNAc alıcısına bağlanırlar. ST6GalNAc III ve IV bir glikoproteini (Fetuin) alıcı substrat olarak kullanabilir, ama ST6GalNAc V ve VI kullanamaz. ST6GalNAc IV için oligosakkarit NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc, ST6GalNAc III, V, VI için gangliosit GM1b daha iyi bir substrattır.

Farelerde St6GalNAc III ve V'in kromozal lokasyonları çok yakındır ve kromozom 3(3H3)'de yer alırlar. ST6GalNAc IV ve VI ise kromozom 2(2B)'de yer alırlar. İnsanlarda ise St6GalNAc III ve V kromozom 1(1p31)'de yer alırlar. ST6GalNAc IV ve VI ise kromozom 9(9q34)'de yer alırlar (Takashima, 2008).

2.2.4. α 2,8-Sialiltransferaz ailesi

ST8Sia ailesi CMP-Sia'den sialik asitleri α 2-8 bağlarıyla glikokonjugantlara bağlar. Amino asit dizilimleri gen yapılarına göre 2 alt aileye ayrılır. Alt ailelerden biri ST8Sia I, V ve VI'yı, diğeri ise ST8Sia II, III ve IV'ü içerir.

ST8Sia I gangliosit GM3 sentaz olarak bilinir. GD3 gangliosit, adezyon, toksin bağlanması, nörit uzantısı, hücre büyümesi ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik olaylarda kritik olduğu düşünülen b- ve c-serisi gangliositlerin bir başlangıç molekülüdür (Takashima, 2008).

ST8sia V geni kıkırdaklı balıklardan memelilere kadar bulunmuştur. ST8Sia V'in de gangliositlerin (GD1a, GT1b, GD3 ve GT3) biyosentezinde rol aldığı belirlenmiştir. ST8Si VI geni de kemikli balıklardan memelilere kadar bulunmuştur (Halduin-Leper,2010). ST8Sia VI ise glikoproteinlerin ve sialiloligosakkaritlerin O-glikanlarında yüksek aktivite gösterir. ST8Sia V ve VI genomik yapıları benzerdir. ST8Sia I, V ve VI'nın bulundukları kromozomlar sırasıyla 6(6G2), 18(18E3) ve 2(2A1)'dir.

Diğer alt ailede bulunan ST8Sia II, III ve IV %66,9 amino asit dizi benzerliği gösterir. ST8Sia II ve IV'ün polisialiltransferazlar olduğu bilinmektedir. Nöral hücre adezyon molekülleri (NCAM'ler) üzerinde polisialik asit sentezleyebilirler, ancak ST8Sia III, polisialik asidi enzimin kendisinde

sentezleyebilmesine rağmen (otopolisialilasyon) NCAM'leri üzerinde polisialik asidi sentezleyemez. ST8Sia III glikoproteinlerdeki N-glikanlar olan Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc'a sialik asit bağlarlar (Takashima, 2008).

ST8Sia II ve IV genleri kemikli balıklardan memelilere kadar belirlenmiştir (Halduin-Lepers, 2010). ST8Sia II ve IV'ün genomik yapıları benzerdir. Farelerde ST8Sia II, III ve IV sırasıyla kromozom 7(7C), 18(18E1) ve 1(1D)'de bulunurlar (Takashima, 2008).

2.3. Sialilmotifler

Sialiltransferazlar Golginin lümeni yönünde yaklaşık 250 amino asit içeren katalitik bölgeye sahiptirler. Yapılan çoklu dizi hizalamalarda sialiltransferazların amino asit dizileri arasında çok küçük bir benzerlik bulunmuştur (Datta, 2009). Aynı zamanda bulunan bu motif diğer glikosiltransferaz protein aileleriyle homoloji göstermemektedir. Korunmuş bu bölgelere sialilmotif denir. İlk olarak Paulson ve Livingston (1993) sialilmotif L (Large), daha sonra Drickamer (1993) tarafından sialilmotif S (Small) bulunmuştur. Daha sonra Geremia ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmayla sialilmotif VS (very small)'ı ve Jeanneau ve arkadaşları (2004) sialilmotif III keşfetmişlerdir. Bu sialilmotifler omurgalı ve omurgasız hayvanların tüm sialiltransferazlarında tanımlanmıştır (Halduin-Lepers, 2010).

Sialilmotif L proteinin ortasında yer alır ve 5 tanesi korunmuş olmak üzere 48-49 amino asitten oluşur. Homolog gruplar arasında %60-70 ve heterolog gruplar arasında %30-60 özdeşlik sergiler. Bu kısımda mevcut olan bazı değişkenlik gösteren amino asitler de yüksek oranda korunur ve yer değiştirmeleri sınırlıdır (Datta, 2008). Sialilmotif S, 23 amino asit kısmından oluşur, glisin ve sisteini kesin içerir. Sialilmotif L ve S disülfid bağ oluşumunda rol oynayan sisteini içerirler (Halduin-Lepers, 2010). Sialilmotif III, biri tirozin amino asidi olması koşuluyla 4 amino asitten, sialilmotif-VS ise biri glutamik asit olması koşuluyla 6 amino asitten oluşur (Halduin-Lepers, 2010).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı; böcek genomlarında sialiltransferaz dizilerinde ortak korunmuş bölgeler olan sialilmotifleri biyoinformatik yöntemlerle böceklerdeki sialiltransferazların belirlenmesi ve *Bombyx mori*'de bulunan ST6Gal I sialiltransferaz gen ifadelerinin farklı dokularda gösterilmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Biyoinformatik Yöntemler

B. mori transkriptom ve proteomuna ait gen ve protein dizi bilgileri Yokoi ve arkadaşlarının (2021) çalışmasından yararlanarak Life Science Database Archive'den (<https://dbarchive.biosciencedbc.jp/en/kaiko/download.html>) alınmıştır. Diğer çalışılan böceklerin protein dizilerine ise güncel dizi verilerine ulaşmamızı sağlayan, canlıların genom ve proteom gibi bilgilerinin bulunduğu ulaşımı kolay National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanından ulaşılmıştır.

Sialilmotifler amino asit dizilimi şeklinde bulunup, tüm omurgalı ve omurgasız canlılarda ortaktır. Omurgalı genomlarındaki sialilmotifler, genomu bilinen böceklerin protein dizilerinde aşağıda gösterilen hesaplamalı yöntemler kullanılarak belirlenmiştir:

- Clustal Omega; çoklu dizi hizalaması için biyoinformatikte yaygın olarak kullanılan bir dizi bilgisayar programıdır. İki ve daha fazla dizinin hizalanmasını sağlar.
- Regular expression (düzenli ifadeler); düzenli ifadeler bütün modern programlama dillerinin parçasıdır. Birçok veriden ulaşılmak istenilen bilgiyi bir kalıp haline getirerek aramayı kolaylaştırır. Belli yazım kuralları vardır. Amino asitler için IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) tarafından belirlenen tek harfli kodlama kullanılır (Tablo 3.1).
- Motifte bilinmeyen için amino asit için herhangi biri anlamına gelen “x” veya “.” konulmaktadır.
- [], içinde yer alan harfler herhangi biri anlamına gelir, [AIV] – A, I veya V’nin temsil ettiği amino asitlerden biri olabilir.
- () veya {}, içinde yer alan sayılar amino asidin kaç kere tekrarlanacağını belirtir. (2), (2,3), (2,5) gibi.
- PRATT ise istenilen dizilerden belli motif parametrelerinde, motif uzunluğu, yan yana gelebilecek bilinmeyen sayısı, kullanılan sembol sayısı, amino asit en

fazla kaç kere tekrarlayabilir vb., düzenli ifadelerle bir kalıp oluşturulmasını sağlamaktadır.

Tablo 3.1. IUPAC tek harf aminoasit kodlama.

IUPAC amino acid code	Three letter code	Amino acid	IUPAC amino acid code	Three letter code	Amino acid
A	Ala	Alanin	K	Lys	Lizin
C	Cys	Sistein	L	Leu	Lösin
D	Asp	Aspartik asit	M	Met	Metionin
E	Glu	Glutamik asit	N	Asn	Asparajin
F	Phe	Fenilalanin	P	Pro	Prolin
G	Gly	Glisin	Q	Gln	Glutamin
H	His	Histidin	R	Arg	Arjinin
I	Ile	İzolösin	S	Ser	Serin
Y	Tyr	Tirozin	T	Thr	Treonin
W	Trp	Triptofan	V	Val	Valin

- PROSITE veri tabanı; genomik veya cDNA dizilerinden çevrilen proteinlerin işlevini belirleme yöntemidir. Uygun hesaplama araçlarıyla yeni dizinin hangi bilinen protein ailesine (varsa) ait olduğunu hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlar (Sigrist *et al.*, 2012).

- Web tabanlı motif dizi analiz araçları (Motif-based sequence analysis tools) (MEME-Suite) programı; motif arama programıdır, veri tabanlarında istenilen motifi bulunmasını sağlar. MEME, bir diziyi girdi olarak alır ve istendiği kadar çok motif çıkarır. Her motif için en iyi genişliği, oluşum sayısını ve açıklamayı otomatik olarak seçmek için istatistiksel modelleme tekniklerini kullanır (Bailey *et al.*, 2006).

- FIMO uygulaması verilen DNA, RNA veya protein motifini istenilen canlının veri tabanında aranmasını sağlayan programdır. Protein motiflerinin tanımlanmasında genel amaçlı bir araçtır. Bütün olası sonuçları verir (Grant *et al.*, 2011).

- I-Tasser, web tabanlı amino asit dizilerin 3 boyutlu protein yapılarını tahmin eden araçtır.

- Pymol, yapısal biyoloji için mevcut olan, açık kaynaklı bir moleküler görselleştirme sistemidir. Küçük moleküllerin ve proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin yüksek kaliteli 3 boyutlu görüntülerini üretir.

Bilinen omurgalı sialiltransferaz amino asit dizilerine NCBI'dan ulaşılmıştır. Çoklu dizi hizalamaları genom dizisi ve protein dizisi veri tabanlarından biyolojik verileri indeksleyen ve sürdüren sistem, The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)'de bulunan Clustal Omega sisteminden yapılmıştır. Böcek dizilerinde motif araması için düzenli ifadeler kullanılmıştır. Öncelikle omurgalı sialiltransferazlarında bulunan sialilmotif dizileri hizalanmıştır. Bu hizalamadan Prosite programında yer alan “PRATT” uygulaması kullanılarak motif dizileri tek bir kalıp haline getirilmiştir. Böylece biyoinformatik açıdan arama kolaylaştırılmıştır. Oluşturulan motifler “MEME-Suite” de yer alan “FIMO” (Find Individual Motif Occurrences) uygulaması kullanılarak böcek dizilerinde aratılmıştır. Bulunan sialiltransferaz dizilerinin “PYMOL” programında 3 boyutlu yapılarına bakılıp insan sialiltransferazlarının 3 boyutlu yapılarıyla karşılaştırılmıştır.

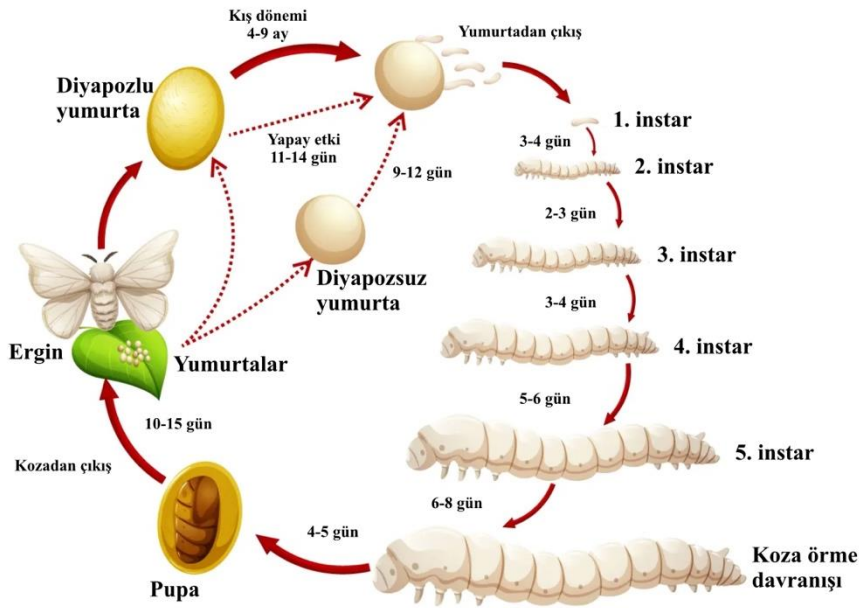
3.2. ST6Gal I Geninin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real-time PCR ile Belirlenmesi

3.2.1. Hayvanın yetiştirilmesi ve uygulama

Çalışma materyalini oluşturan evcil ipek böceği *Bombyx mori* hibrid yumurtaları Bursa Koza Birlik'ten temin edilmiştir. Böceklerin yetiştirilmesi bölümümüzün İpek Böceği Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Öncelikle laboratuvarın genel temizliği yapıp, sonra %3'lük formaldehit püskürtülerek laboratuvarın ve kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu sağlanmıştır. 24°C'de inkübasyona alınan yumurtalardan yaklaşık 8-10 günde kılavuz larvaların çıkmasını takiben %90 inficar sonucu beslemeye uygun olarak hazırlanan ve dezenfekte edilen kültür odasında larvaların gelişimi takip edilmiştir. İpek böceğinin normal gelişmesi için sıcaklık önemli rol oynadığından kültür odasının optimum sıcaklığı $24 \pm 1^\circ\text{C}$ arasında tutulmuştur. Çok kuru şartlar altında yaprakların beslemeye uygun olmaması veya çok fazla nemli ortamda ise özellikle de büyük yaşlarda hastalıkların ortaya çıkışının kolaylaşması nedeniyle kültür odasının nemi yaklaşık %70 olarak sağlanmıştır. İpek böceğinin solunumundan dolayı ortaya çıkan CO₂ gazının hava sirkülasyonu ile kültür odasında dağılmasına dikkat edilmiştir. Böceklerin çok karanlığı ve fazla ışığı sevmemelerinden dolayı beslenme döneminde doğal fotoperiyot yani uzun gün periyodu kullanılarak, karanlık ve aydınlık arasında uygunluk sağlanmıştır.

(Omura, 1967; İpekböcekçiliği ve Dutçuluk Seminer Notları, 1985). Beslenmeleri için günde üç öğün Ege Üniversitesi Kampüsü'nde yetişmiş olan dut ağaçlarının yaprakları kullanılmıştır. Günde bir kez yatak temizliği yapıp, herhangi bir kontaminasyonun olmamasına dikkat edilmiştir.

Evcil ipek böceği *Bombyx mori*, yumurtadan çıkışından itibaren ergin hale gelinceye kadar geçirdiği tam metamorfoz süresince birbirine göre çok farklılıklar gösteren gelişim evreleri (yumurta, larva, pupa ve ergin gibi) içermektedir. Yumurtadan çıkan larvalar genelde 4 defa deri değiştirerek toplam 5 instarda larval evrelerini tamamlar. Sadece larva evresinde beslenen ipek böcekleri 5. instarın 7. gününden itibaren beslenmelerini durdurarak koza örmeye başlar. Pupa oluşumundan yaklaşık 15 gün sonra kozanın delinmesiyle kelebek olarak dışarı çıkarlar. Çiftleşmenin hemen ardından yumurta bırakımını takiben erginler ölür ve böceğin hayat döngüsü tamamlanır (Parlak, 2001) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İpek böceği yaşam döngüsü (<https://www.takshilalearning.com/how-many-stages-are-there-in-the-life-cycle-of-a-silkworm/'den> Türkçe'ye çevrilerek).

Çalışmamızda, normal dut yapraklarıyla beslenen kontrol grubuna paralel olarak 5. instarın 0. gününden itibaren her gün ultra saf su ile taze olarak hazırlanan 0,1M konsantrasyondaki sialik asit (Neu5Ac)'li solüsyon püskürtülen dut yapraklarının kuruması beklenildikten sonra beslenen uygulama grubu oluşturulmuştur. 7 gün boyunca bu besleme prosedürüne devam edilen hem

kontrol hem de uygulama grubu 5. instar ipek böceklerinin 1, 4 ve 7. günlerinde diseksiyon gerçekleştirilmiştir. Her disekte edilecek gün için 10 adet dişi 10 adet de erkek denk gelecek şekilde kontrol grubu için 120, uygulama grubu için 120 adet olmak üzere toplamda 240 adet böcek beslenmiştir. Disekte yapılan günlerde kontrolden 20 tane, uygulamadan da 20 tane ipek böceği disekte edilmiştir. *Bombyx mori*'deki BmST gen ekspresyon profili, Real-time PCR kullanılarak belirlenmiştir. BmST için özel primerler (Kajura et al., 2015) ve *B. mori* 5. instar larvalarından elde edilen cDNA'lar kullanılmıştır.

3.2.2 Total RNA izolasyonu

Kontrol (direkt dut yapraklarıyla beslenen) ve uygulama (sialik asitli dut yapraklarıyla beslenen) gruplarına ait ipek böceklerinden 20'şer tane alınarak disekte edilen orta bağırsak, yağ dokusu, ovaryum, testis ve hemosit içinde trizol bulunan ependorflara ayrı ayrı konulmuştur. Diğer işleme geçilinceye kadar tüpler -80°C'deki soğutucuda saklanmıştır.

İzolasyon için soğutucudan çıkarılan dokuların üzerine son hacim yaklaşık 1000 µl olacak şekilde trizol eklenip vortekslenerek homojen ve pembe bir görünüm elde edilmiştir. Homojen hale gelen dokulara faz oluşumu sağlamak için 200µl kloroform eklenmiştir. RNA izolasyonu, 4°C'de, 12000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme sonunda oluşan 1. faz RNA (sulu faz-renksiz), 2. faz DNA (beyaz renkli) ve 3. faz protein (organik faz-kırmızı renkli)'den renksiz olan 1. fazdan gerçekleştirilmiştir. RNA'yı safsızlaştırmak için RNA ile aynı hacimde olacak şekilde izopropanol eklenmiştir. Tekrar 4°C'de 10 dakika 12000 rpm santrifüjlemenin ardından oluşan çökelek üzerine 900 µl etanol eklenerek ve son defa 2 dakika 7500 rpm santrifüjlenip 57°C'a ayarlı etüvde bu etanol uçurulmuştur. Kalan çökeleğe RNase free su eklenip pipetleme yapılarak karıştırılmıştır.

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür. Bu yöntemde izole edilen ideal saflıktaki RNA'ların saflığı A260/A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olması beklenmektedir. Bu aşamada elde edilen mRNA'ların bozulmasını engellemek için örnekler -80°C'de saklanmıştır.

3.2.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılmıştır. Her örnek için RNA+RNase free su karışımından 11µl konulmuş

ve 2 µl random heksamer primer eklenmiştir. Tüpler ısısal döngü (Thermal Cycler ya da PCR cihazı) cihazına konularak 65°C’de 10 dk boyunca RNA’lar denatüre edilmiştir. PCR cihazından alınan örnekler soğutma kabına yerleştirilerek ve her tüpe 7 µl mastermix karışımından (reaction buffer, protector RNase inhibitor, deoxynucleotide mix, transcriptor reverse transcriptase)’ndan eklenmiştir. Tüpler yeniden PCR cihazına yerleştirilerek optimize edilen programda çalıştırılmıştır.

3.2.4. Real-time PCR analizi

Transferaz enzimlerinden sorumlu genler için karışım hazırlanırken tek reaksiyon için son hacim 15 µl olacak şekilde nükleaz free su (3,8 µl), forward primer (20uM) (0,5 µl), reverse primer (20uM) (0,5 µl), enzim ve deoksinükleotit trifosfat (dNTP) (10 µl) içeren bir karışım hazırlanmıştır. Referans gen *B. mori* ribosomal protein 49 (Bmrp49) için ise tek reaksiyon için karışımın son hacmi 15 µl olacak şekilde nükleaz free su (4.0 µl), primer karışımı (1.0 µl), enzim ve dNTP (10 µl) kullanılmıştır. Tek reaksiyon için her bi tüpe reaktif eklenip, karışımdan 15’er µl cihaza uygun platelere transfer edilmiştir. Her bir kuyuya son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 5 µl örnek veya kontrol ilave edilmiştir. Hazırlanan plateler soğuk bloktaki adaptörleri ile birlikte santrifüjlenmiştir. Tek bir plate içinde reaksiyonlar test içi duplikasyon yöntemi ile 2 defa gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen kantitatif sonuçları sağlamak için $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılmıştır. Bu metot ile BmST enzimiyle ilgili genlerin CT değerleri Bmrp49 geni ile normalize edilerek (ΔCT) ve gruplar arasında oranlanarak $\Delta\Delta CT$ değeri elde edilmiştir. Bu değer 2’den büyük olması gen ifadesindeki artışı, -2’den düşük olması ise gen ifadesindeki azalışı ifade etmektedir.

Primerler:

Bombyx mori ST6Gal I geni ve referans geni için kullanılacak primerlerin nükleotid dizileri aşağıdaki gibidir. Bu primerler Kajiura ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları çalışmadan alınmıştır.

Kontrol (Bmrp49 gene)

forward: 5'-CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC-3'

reverse: 5'-TGCTGGGCTCTTTCCACGA-3'

***Bombyx mori* ST6Gal I (BmST)**

forward: 5'- GAGTCGCCGGTGTCTTACT-3'

reverse: 5'- CCTCGTTGAAAGGTGTCGAT-3'

3.2.5. İstatistiksel yöntemler

PCR analizinden elde edilen sonuçlardan kontrol ve uygulama grupları karşılaştırılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Bu analiz için “IBM SPSS Statistics 26” istatistik programında bağımsız gruplarda t- testi yöntemi uygulanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Biyoinformatik Sonuçlar

NCBI veri tabanından elde edilen amino asit verileri dizileri, erişim numaraları ve uzunlukları tablolarda verilmiştir. Her sialiltransferaz enzimi için ayrı ayrı bakılmıştır (Tablo 4.1-4.14).

Tablo 4.1. ST3Gal I için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Arvicola amphibius</i>	XP_038197477.1	340 aa
<i>Bufo bufo</i>	XP_040288117.1	341 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV42502.1	337 aa
<i>Catharus ustulatus</i>	XP_032920965.1	342 aa
<i>Centrocerus urophasianus</i>	XP_042664778.1	342 aa
<i>Cervus elaphus</i>	XP_043735110.1	339 aa
<i>Chelonia mydas</i>	XP_043394995.1	339 aa
<i>Corvus kubaryi</i>	XP_041891671.1	342 aa
<i>Cygnus olor</i>	XP_040403218.1	342 aa
<i>Dermochelys coriacea</i>	XP_038245757.1	339 aa
<i>Dipodomys spectabilis</i>	XP_042555928.1	339 aa
<i>Dromiciops gliroides</i>	XP_043861228.1	341 aa
<i>Falco naumanni</i>	XP_040441979.1	342 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_990548.1	342 aa
<i>Hirundo rustica</i>	XP_039938105.1	342 aa
<i>Homo sapiens</i>	NP_775479.1	340 aa
<i>Mesocricetus auratus</i>	XP_040586243.1	340 aa
<i>Mus musculus</i>	AAH99693.1	337 aa
<i>Neovison vison</i>	XP_044100847.1	342 aa
<i>Onychostruthus taczanowskii</i>	XP_041263527.1	342 aa
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_028918742.1	342 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007938727.1	340 aa
<i>Oryx dammah</i>	XP_040118020.1	339 aa
<i>Ovis aries</i>	XP_042110005.1	338 aa
<i>Panthera leo</i>	XP_042780086.1	342 aa
<i>Panthera tigris</i>	XP_042829321.1	342 aa
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	XP_042121306.1	340 aa
<i>Prionailurus bengalensis</i>	XP_043457768.1	342 aa
<i>Pteropus giganteus</i>	XP_039701830.1	342 aa
<i>Pyrgilauda ruficollis</i>	XP_041335289.1	342 aa
<i>Rana temporaria</i>	XP_040210931.1	335 aa
<i>Sceloporus undulatus</i>	XP_042318064.1	343 aa
<i>Sturnira hondurensis</i>	XP_036904487.1	342 aa
<i>Sus scrofa</i>	NP_001004047.1	343 aa
<i>Taeniopygia guttata</i>	XP_030122595.3	341 aa
<i>Tyto alba</i>	XP_042642045.1	342 aa
<i>Ursus arctos horribilis</i>	XP_026351162.1	342 aa
<i>Vulpes lagopus</i>	XP_041625595.1	342 aa

ST3Gal I sialiltransferaz amino asit dizleri için 38 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizi 343 amino asit ile *Sceloporus undulatus*'a, en kısa amino asit dizisi 335 amino asit ile *Rana temporaria*'e aittir. Ortalama uzunlukları 340 amino asittir.

Tablo 4.2. ST3Gal II için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Astyanax mexicanus</i>	KAG9273172.1	352 aa
<i>Bufo bufo</i>	XP_040265603.1	353 aa
<i>Bufo gargarizans</i>	XP_044125603.1	353 aa
<i>Callorhynchus milii</i>	XP_042196482.1	351 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV42605.1	350 aa
<i>Centrocercus urophasianus</i>	XP_042690714.1	349 aa
<i>Chelmon rostratus</i>	XP_041794478.1	532 aa
<i>Chelonia mydas</i>	XP_043382312.1	347 aa
<i>Clupea harengus</i>	XP_031420742.1	352 aa
<i>Coregonus clupeaformis</i>	XP_041693276.1	352 aa
<i>Danio rerio</i>	NP_001004012.1	374 aa
<i>Dermochelys coriacea</i>	XP_043351129.1	347 aa
<i>Dromiciops gliroides</i>	XP_043837565.1	350 aa
<i>Equus asinus</i>	XP_044617003.1	350 aa
<i>Gambusia affinis</i>	XP_043981778.1	369 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_989811.3	349 aa
<i>Gracilinanus agilis</i>	XP_044519045.1	350 aa
<i>Homo sapiens</i>	NP_008858.1	350 aa
<i>Lagopus leucura</i>	XP_042741963.1	349 aa
<i>Mus musculus</i>	NP_033205.2	350 aa
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XP_042157431.1	352 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007938538.1	350 aa
<i>Ovis aries</i>	XP_042087389.1	350 aa
<i>Panthera leo</i>	XP_042774581.1	350 aa
<i>Panthera tigris</i>	XP_042824643.1	350 aa
<i>Protopterus annectens</i>	XP_043937248.1	350 aa
<i>Puma yagouaroundi</i>	XP_040299026.1	350 aa
<i>Puntigrus tetrazona</i>	XP_043120284.1	401 aa
<i>Sceloporus undulatus</i>	XP_042336791.1	350 aa
<i>Siniperca chuatsi</i>	XP_044049960.1	472 aa
<i>Solea senegalensis</i>	XP_043891446.1	502 aa
<i>Sturnira hondurensis</i>	XP_036919557.1	350 aa
<i>Thunnus albacares</i>	XP_044212342.1	502 aa
<i>Tyto alba</i>	XP_042653500.1	348 aa
<i>Ursus arctos horribilis</i>	XP_044238435.1	350 aa
<i>Ursus maritimus</i>	XP_040489502.1	350 aa
<i>Varanus komodoensis</i>	XP_044290169.1	347 aa

ST3Gal II sialiltransferaz amino asit dizileri için 37 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 532 amino asit ile *Chelmon rostratus* ve *Oncorhynchus*

tshawytscha'a, en kısa amino asit dizisi 347 amino asit ile *Varanus komodoensis*, *Chelonia mydas* ve *Dermochelys coriacea*'a aittir. Ortalama uzunlukları 373 amino asittir.

Tablo 4.3. ST3Gal III için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit diziler. Uniprot veri tabanından alınmışlardır (uniprot.org).

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	tr A0A0F7RQ85	365 aa
<i>Canis lupus familiaris</i>	tr A0A5F4C6A9	355 aa
<i>Capra hircus</i>	tr A0A452G1C9	374 aa
<i>Cercocebus atys</i>	tr A0A2K5P3Z2	444 aa
<i>Danio rerio</i>	tr Q702R9	372 aa
<i>Electrophorus electricus</i>	tr A0A4W4FK24	328 aa
<i>Equus caballus</i>	tr A0A3Q2H8F7	379 aa
<i>Felis catus</i>	tr A0A337SDC6	343 aa
<i>Gallus gallus</i>	tr I6WCL0	358 aa
<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	tr A0A2I2YEH8	359 aa
<i>Homo sapiens</i>	sp Q11203	375 aa
<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	tr A0A287DE82	374 aa
<i>Macaca mulatta</i>	tr F6Q8A3	366 aa
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	tr A0A2K5YDH9	444 aa
<i>Mus musculus</i>	sp P97325	374 aa
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	tr A0A6I8P786	410 aa
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	tr G1SPU8	374 aa
<i>Oryzias latipes</i>	tr Q5ND64	356 aa
<i>Ovis aries</i>	tr W5NQT4	374 aa
<i>Pan troglodytes</i>	tr K7C6P5	390 aa
<i>Papio anubis</i>	tr A0A2I3MFN7	444 aa
<i>Rattus norvegicus</i>	sp Q02734	374 aa
<i>Rhinopithecus bieti</i>	tr A0A2K6K9I8	444 aa
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	tr A0A2K6SVM6	448 aa
<i>Sus scrofa</i>	tr Q70D54	374 aa
<i>Xenopus tropicalis</i>	tr F6Z9V9	358 aa

ST3Gal III amino asit dizileri için 26 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 448 amino asit ile *Saimiri boliviensis boliviensis*'e, en kısa amino asit dizisi 328 amino asit ile *Electrophorus electricus*'a aittir. Ortalama uzunlukları 382 amino asittir.

Tablo 4.4. ST3Gal IV için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Anguilla anguilla</i>	XP_035241901.1	337 aa
<i>Arvicola amphibius</i>	XP_038179619.1	335 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV42469.1	333 aa
<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>	OWK17246.1	333 aa
<i>Chiloscyllium plagiosum</i>	XP_043532842.1	339 aa
<i>Cricetulus griseus</i>	NP_001233628.1	334 aa
<i>Cyclopterus lumpus</i>	XP_034404701.1	339 aa
<i>Cygnus atratus</i>	XP_035411736.1	386 aa
<i>Cyprinodon tularosa</i>	XP_038131210.1	337 aa
<i>Egretta garzetta</i>	XP_035753356.1	429 aa
<i>Epinephelus lanceolatus</i>	XP_033487660.1	339 aa
<i>Etheostoma cragini</i>	XP_034722782.1	342 aa
<i>Gambusia affinis</i>	XP_043974563.1	352 aa
<i>Gracilinanus agilis</i>	XP_044524275.1	328 aa
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	XP_034080596.1	341 aa
<i>Hippoglossus stenolepis</i>	XP_035010132.1	341 aa
<i>Homo sapiens</i>	AAH10645.1	333 aa
<i>Macaca mulatta</i>	NP_001253604.1	333 aa
<i>Micropterus salmoides</i>	XP_038548506.1	339 aa
<i>Mus musculus</i>	AAH11121.1	333 aa
<i>Nothobranchius furzeri</i>	KAF7219249.1	339 aa
<i>Notolabrus celidotus</i>	XP_034557406.1	340 aa
<i>Ochotona princeps</i>	XP_004593348.1	332 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007945420.1	333 aa
<i>Pan troglodytes</i>	sp P61130.1	328 aa
<i>Pongo abelii</i>	NP_001125146.1	333 aa
<i>Protopterus annectens</i>	XP_043936746.1	349 aa
<i>Pseudochaenichthys georgianus</i>	XP_033952636.1	341 aa
<i>Rattus norvegicus</i>	sp P61131.1	333 aa
<i>Sus scrofa</i>	NP_998922.1	333 aa
<i>Tachyglossus aculeatus</i>	XP_038609808.1	334 aa
<i>Thunnus albacares</i>	XP_044210036.1	340 aa
<i>Thunnus maccoyii</i>	XP_042269678.1	343 aa
<i>Toxotes jaculatrix</i>	XP_040901744.1	340 aa
<i>Turdus rufiventris</i>	KAF4793472.1	326 aa
<i>Varanus komodoensis</i>	KAF7242225.1	354 aa

ST3Gal IV amino asit dizileri için 36 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 429 amino asit ile *Egretta garzetta*'ya, en kısa amino asit dizisi ise 326 amino asit ile *Turdus rufiventris*'e aittir. Ortalama uzunlukları 341 amino asittir.

Tablo 4.5. ST3Gal V için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Alosa sapidissima</i>	XP_041930871.1	365 aa
<i>Bos taurus</i>	NP_991376.2	420 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV36419.1	325 aa
<i>Chelmon rostratus</i>	XP_041800049.1	365 aa
<i>Chelydra serpentina</i>	KAG6925886.1	370 aa
<i>Cyprinodon tularosa</i>	XP_038157382.1	419 aa
<i>Danio rerio</i>	AAI64193.1	364 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_001001192.1	368 aa
<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>	XP_040028789.1	357 aa
<i>Haplochromis burtoni</i>	XP_005944354.2	365 aa
<i>Homo sapiens</i>	sp Q9UNP4.4	418 aa
<i>Hyaena hyaena</i>	XP_039108561.1	419 aa
<i>Micropterus salmoides</i>	XP_038555264.1	367 aa
<i>Mus musculus</i>	sp O88829.2	414 aa
<i>Neovison vison</i>	XP_044117490.1	419 aa
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XP_024284682.1	363 aa
<i>Oryx dammah</i>	XP_040080263.1	420 aa
<i>Pan troglodytes</i>	sp Q6KB55.1	362 aa
<i>Pimephales promelas</i>	XP_039550124.1	388 aa
<i>Plectropomus leopardus</i>	XP_042349748.1	397 aa
<i>Polypterus senegalus</i>	XP_039607719.1	393 aa
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_112627.2	387 aa
<i>Vulpes lagopus</i>	XP_041611854.1	421 aa
<i>Xiphias gladius</i>	XP_039975896.1	398 aa

ST3Gal V sialiltransferaz amino asit dizileri için 24 türün dizisi alınmıştır. En uzun amino asit dizisi 421 amino asitle *Vulpes lagopus*'a, en kısa amino asit dizisi ise 325 amino asitle *Castor canadensis*'e aittir. Ortalama uzunlukları 388 amino asittir.

Tablo 4.6. ST3Gal VI için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Bos taurus</i>	sp Q6H8M7.1	331 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_001001192.1	368 aa
<i>Homo sapiens</i>	sp Q9Y274.1	331 aa
<i>Mauremys mutica</i>	XP_044857660.1	335 aa
<i>Mus musculus</i>	sp Q8VIB3.3	329 aa
<i>Neomonachus schauinslandi</i>	XP_021543632.1	331 aa
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_997485.2	331 aa
<i>Tachyglossus aculeatus</i>	XP_038622280.1	331 aa
<i>Xenopus tropicalis</i>	AAI35191.1	331 aa

ST3Gal VI amino asit dizileri için 9 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 368 amino asitle *Gallus gallus*'a, en kısa amino asit dizisi 329 amino asitle *Mus musculus*'a aittir. Ortalama uzunlukları 335 amino asittir.

Tablo 4.7. ST6Gal I için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Alosa sapidissima</i>	XP_041948361.1	500 aa
<i>Anolis carolinensis</i>	CBQ74101.1	404 aa
<i>Bos taurus</i>	AAI12481.1	254 aa
<i>Branchiostoma floridae</i>	CBQ74112.1	360 aa
<i>Bubalus bubalis</i>	AGY46252.1	405 aa
<i>Caligus rogercresseyi</i>	QQP35462.1	419 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV43039.1	406 aa
<i>Capra hircus</i>	ADW11242.1	405 aa
<i>Catharus ustulatus</i>	XP_032924577.1	420 aa
<i>Centrocercus urophasianus</i>	XP_042676409.1	413 aa
<i>Cervus canadensis</i>	XP_043329393.1	405 aa
<i>Cheilinus undulatus</i>	XP_041657688.1	499 aa
<i>Chelmon rostratus</i>	XP_041807537.1	490 aa
<i>Chelydra serpentina</i>	KAG692494.1	409 aa
<i>Corvus kubaryi</i>	XP_041897759.1	413 aa
<i>Danio rerio</i>	AAI17604.1	404 aa
<i>Dipodomys spectabilis</i>	XP_042524534.1	406 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_001382995.1	413 aa
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	CBQ74103.1	490 aa
<i>Gracilinanus agilis</i>	XP_044529110.1	332 aa
<i>Homo sapiens</i>	AAH31476.1	406 aa
<i>Lagopus leucura</i>	XP_042734122.1	413 aa
<i>Microtus oregoni</i>	XP_041534003.1	399 aa
<i>Monodelphis domestica</i>	CBQ74107.1	401 aa
<i>Mus musculus</i>	AAH96026.1	403 aa
<i>Neovison vison</i>	XP_044107898.1	399 aa
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XP_042155964.1	503 aa
<i>Ovis aries</i>	NP_001254809.1	405 aa
<i>Panthera leo</i>	XP_042810953.1	399 aa
<i>Panthera tigris</i>	XP_042854886.1	399 aa
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	XP_042115033.1	402 aa
<i>Siniperca chuatsi</i>	XP_044078518.1	499 aa
<i>Taeniopygia guttata</i>	CBQ74105.1	413 aa
<i>Tyto alba</i>	XP_042655311.1	415 aa
<i>Ursus arctos horribilis</i>	XP_044239408.1	399 aa
<i>Varanus komodoensis</i>	XP_044288713.1	419 aa
<i>Vulpes lagopus</i>	XP_041587689.1	399 aa
<i>Xenopus tropicalis</i>	CBQ74109.1	473 aa

ST6Gal I amino asit dizisi için 38 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 503 amino asit ile *Oncorhynchus tshawytscha*'ya, en kısa amino asit dizisi 254 amino asitle *Bos taurus*'a aittir. Ortalama uzunlukları 415 amino asittir.

Tablo 4.8. ST6Gal II için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Amblyraja radiata</i>	XP_032878517.1	515 aa
<i>Arvicola amphibius</i>	XP_038200090.1	523 aa
<i>Bos taurus</i>	NP_001008668.2	495 aa
<i>Bufo bufo</i>	XP_040280992.1	495 aa
<i>Bufo gargarizans</i>	XP_044142333.1	495 aa
<i>Centrocercus urophasianus</i>	XP_042666213.1	529 aa
<i>Chlorocebus sabaes</i>	XP_008006491.1	529 aa
<i>Danio rerio</i>	NP_001153386.1	514 aa
<i>Dipodomys spectabilis</i>	XP_042551496.1	523 aa
<i>Falco naumanni</i>	XP_040440585.1	529 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_001161219.1	529 aa
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	NP_001254589.1	541 aa
<i>Hyaena hyaena</i>	XP_039078628.1	530 aa
<i>Mesocricetus auratus</i>	XP_040585344.1	523 aa
<i>Mus musculus</i>	NP_001334332.1	524 aa
<i>Neovison vison</i>	XP_044119721.1	531 aa
<i>Nibea albiflora</i>	KAG8004438.1	407 aa
<i>Ochotona curzoniae</i>	XP_040849315.1	524 aa
<i>Onychostruthus taczanowskii</i>	XP_041274075.1	522 aa
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_028914026.1	522 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007957739.1	529 aa
<i>Oryx dammah</i>	XP_040080141.1	495 aa
<i>Oryzias latipes</i>	NP_001098242.1	509 aa
<i>Pan troglodytes</i>	NP_001181861.1	529 aa
<i>Panthera leo</i>	XP_042787783.1	530 aa
<i>Panthera tigris</i>	XP_042836993.1	530 aa
<i>Prionailurus bengalensis</i>	XP_043458971.1	530 aa
<i>Pteropus giganteus</i>	XP_039696093.1	524 aa
<i>Puma yagouaroundi</i>	XP_040310075.1	530 aa
<i>Pyrgilauda ruficollis</i>	XP_041324424.1	522 aa
<i>Rana temporaria</i>	XP_040192391.1	501 aa
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001094358.1	525 aa
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	XP_003922824.2	529 aa
<i>Sceloporus undulatus</i>	XP_042313874.1	542 aa
<i>Sturnira hondurensis</i>	XP_036926367.1	509 aa
<i>Trichonephila clavata</i>	GFQ98393.1	404 aa
<i>Varanus komodoensis</i>	XP_044284740.1	529 aa

ST6Gal II sialiltransferaz dizileri için 37 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 542 amino asitle *Sceloporus undulatus*'a, en kısa amino asit dizisi 407 amino asitle *Nibea albiflora*'ya aittir. Ortalama uzunlukları 515 amino asittir.

Tablo 4.9. ST6GalNAc I için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Astyanax mexicanus</i>	KAG9268075.1	448 aa
<i>Bufo bufo</i>	XP_040293002.1	471 aa
<i>Bufo gargarizans</i>	XP_044154123.1	471 aa
<i>Callithrix jacchus</i>	XP_035157752.1	597 aa
<i>Catharus ustulatus</i>	XP_032932959.1	656 aa
<i>Cebus imitator</i>	XP_017391343.1	593 aa
<i>Choloepus didactylus</i>	XP_037666476.1	614 aa
<i>Chlorocebus sabaeus</i>	XP_008009852.2	600 aa
<i>Cygnus atratus</i>	XP_035426453.1	621 aa
<i>Dipodomys spectabilis</i>	XP_042558578.1	547 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_990571.2	566 aa
<i>Homo sapiens</i>	AAH22462.1	471 aa
<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	XP_013217098.2	634 aa
<i>Molossus molossus</i>	XP_036125690.1	461 aa
<i>Molothrus ater</i>	XP_036250724.1	569 aa
<i>Mus musculus</i>	AAI45375.1	515 aa
<i>Myotis myotis</i>	XP_036195113.1	614 aa
<i>Ochotona curzoniae</i>	XP_040845288.1	588 aa
<i>Ochotona princeps</i>	XP_004593097.1	513 aa
<i>Onychomys torridus</i>	XP_036051227.1	509 aa
<i>Onchostruthus taczanowskii</i>	XP_041265306.1	568 aa
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_001507824.4	529 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007958041.1	583 aa
<i>Oryx dammah</i>	XP_040100510.1	591 aa
<i>Ovis aries</i>	XP_027831208.2	591 aa
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	XP_042139341.1	478 aa
<i>Pipistrellus kuhlii</i>	XP_036268224.2	466 aa
<i>Pipra filicauda</i>	XP_039246136.1	563 aa
<i>Pyrgilauda ruficollis</i>	XP_041342532.1	566 aa
<i>Rana temporaria</i>	XP_040186035.1	503 aa
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	XP_029453356.1	516 aa
<i>Rousettus aegyptiacus</i>	XP_015998634.2	583 aa
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	XP_003931748.2	597 aa
<i>Tachyglossus aculeatus</i>	XP_038597848.1	582 aa
<i>Taeniopygia guttata</i>	XP_002188632.4	587 aa
<i>Talpa occidentalis</i>	XP_037348462.1	555 aa
<i>Trichosurus vulpecula</i>	XP_036613863.1	368 aa

ST6GalNAc I amino asit dizileri için 37 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 634 amino asit ile *Ictidomys tridecemlineatus*'a, en kısa amino asit dizisi 368 amino asitle *Trichosurus vulpecula*'ya aittir. Ortalama uzunlukları 548 amino asittir.

Tablo 4.10. ST6GalNAc II için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Arvicola amphibius</i>	XP_038182313.1	372 aa
<i>Betta splendens</i>	XP_029015824.1	368 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV42808.1	374 aa
<i>Chelonia mydas</i>	XP_043384295.1	398 aa
<i>Chelydra serpentina</i>	KAG6931586.1	398 aa
<i>Clupea harengus</i>	XP_031416875.1	368 aa
<i>Corvus cornix cornix</i>	XP_039418339.1	403 aa
<i>Corvus kubaryi</i>	XP_041888570.1	403 aa
<i>Dermochelys coriacea</i>	XP_038227908.1	398 aa
<i>Dromiciops gliroides</i>	XP_043820483.1	380 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_990564.2	404 aa
<i>Hirundo rustica</i>	XP_039937674.1	403 aa
<i>Homo sapiens</i>	AAH40455.1	374 aa
<i>Melanotaenia boesemani]</i>	XP_041831568.1	380 aa
<i>Mesocricetus auratus</i>	XP_012968633.1	372 aa
<i>Mus musculus</i>	NP_033206.2	373 aa
<i>Neovison vison</i>	XP_044103294.1	374 aa
<i>Ochotona curzoniae</i>	XP_040845547.1	375 aa
<i>Onychostruthus taczanowskii</i>	XP_041265159.1	403 aa
<i>Oreochromis aureus</i>	XP_031586352.1	321 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_042639464.1	498 aa
<i>Passer montanus</i>	XP_039572256.1	403 aa
<i>Pimephales promelas</i>	XP_039510069.1	381 aa
<i>Pipra filicauda</i>	XP_027586024.1	399 aa
<i>Plectropomus leopardus</i>	XP_042360489.1	369 aa
<i>Polyodon spathula</i>	XP_041076968.1	384 aa
<i>Polypterus senegalus</i>	XP_039595540.1	412 aa
<i>Puma yagouaroundi</i>	XP_040312436.1	374 aa
<i>Puntigrus tetrazona</i>	XP_043081948.1	390 aa
<i>Rana temporaria</i>	XP_040186883.1	447 aa
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001026822.1	373 aa
<i>Taeniopygia guttata</i>	XP_030143203.3	403 aa
<i>Thunnus albacares</i>	XP_044187613.1	374 aa
<i>Toxotes jaculatrix</i>	XP_040918354.1	372 aa
<i>Tyto alba</i>	XP_032858368.2	403 aa
<i>Ursus arctos horribilis</i>	XP_026339857.1	374 aa
<i>Varanus komodoensis</i>	XP_044309911.1	402 aa

ST6GalNAc II dizileri için 37 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 498 amino asit ile *Orycteropus afer afer*'a, en kısa amino asit dizisi 321 amino asit ile *Oreochromis aureus*'a aittir. Ortalama uzunlukları 356 amino asittir.

Tablo 4.11. ST6GalNAc III için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Amblyraja radiata</i>	XP_040467090.1	305 aa
<i>Arvicola amphibius</i>	XP_005924607.1	301 aa
<i>Astyanax mexicanus</i>	KAG9273714.1	306 aa
<i>Betta splendens</i>	XP_041064533.1	314 aa
<i>Bufo bufo</i>	XP_032884915.1	246 aa
<i>Bufo gargarizans</i>	XP_044158305.1	306 aa
<i>Callorhynchus milii</i>	XP_042321603.1	258 aa
<i>Carcharodon carcharias</i>	XP_041277784.1	305 aa
<i>Catharus ustulatus</i>	XP_037537813.1	306 aa
<i>Chelydra serpentina</i>	XP_038167460.1	305 aa
<i>Clupea harengus</i>	XP_007944698.1	316 aa
<i>Coregonus clupeaformis</i>	KAG6932860.1	305 aa
<i>Dipodomys spectabilis</i>	XP_012670837.2	306 aa
<i>Equus asinus</i>	XP_014705023.2	305 aa
<i>Falco naumanni</i>	XP_040843150.1	305 aa
<i>Gracilinanus agilis</i>	XP_044529373.1	344 aa
<i>Haplochromis burtoni</i>	XP_007885458.2	333 aa
<i>Homo sapiens</i>	sp Q8NDV1.1	305 aa
<i>Mus musculus</i>	NP_035502.1	305 aa
<i>Nematolebias whitei</i>	XP_032856444.1	305 aa
<i>Ochotona curzoniae</i>	NP_061996.2	305 aa
<i>Onychostruthus taczanowskii</i>	XP_041698885.1	302 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_032923389.1	305 aa
<i>Oryx dammah</i>	XP_040216606.1	306 aa
<i>Passer montanus</i>	XP_039590942.1	306 aa
<i>Perca fluviatilis</i>	XP_039871280.1	301 aa
<i>Pimephales promelas</i>	XP_039567431.1	305 aa
<i>Plectropomus leopardus</i>	XP_042541575.1	305 aa
<i>Polypterus senegalus</i>	XP_039672343.1	306 aa
<i>Rana temporaria</i>	XP_040264756.1	306 aa
<i>Rattus norvegicus</i>	XP_040910565.1	306 aa
<i>Sceloporus undulatus</i>	XP_042353377.1	399 aa
<i>Simochromis diagramma</i>	XP_039999920.1	335 aa
<i>Siniperca chuatsi</i>	XP_044075292.1	306 aa
<i>Solea senegalensis</i>	XP_043886225.1	319 aa
<i>Toxotes jaculatrix</i>	XP_028986979.1	317 aa
<i>Xiphias gladius</i>	XP_040088474.1	305 aa

ST6GalNAc III dizileri için 36 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 399 amino asit ile *Sceloporus undulatus*'a, en kısa amino asit dizisi 246 amino asit ile *Bufo bufo*'ya aittir. Ortalama uzunlukları 317 amino asittir.

Tablo 4.12. ST6GalNAc IV için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Astyanax mexicanus</i>	KAG9266085.1	209 aa
<i>Betta splendens</i>	XP_029025285.1	285 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV42176.1	302 aa
<i>Chelmon rostratus</i>	XP_041815877.1	288 aa
<i>Chelydra serpentina</i>	KAG6933934.1	322 aa
<i>Coregonus clupeaformis</i>	XP_041753599.1	293 aa
<i>Dromiciops gliroides</i>	XP_043845826.1	303 aa
<i>Equus asinus</i>	XP_014719116.1	302 aa
<i>Haplochromis burtoni</i>	XP_005917305.1	287 aa
<i>Homo sapiens</i>	sp Q9H4F1.2	302 aa
<i>Lagopus leucura</i>	XP_042735284.1	326 aa
<i>Mesocricetus auratus</i>	XP_040591579.1	302 aa
<i>Mus musculus</i>	sp Q9R2B6.1	360 aa
<i>Nematolebias whitei</i>	XP_037547923.1	311 aa
<i>Neogale vison</i>	XP_044120752.1	302 aa
<i>Neovison vison</i>	XP_044120752.1	302 aa
<i>Onychostruthus taczanowskii</i>	XP_041262812.1	297 aa
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XP_024237525.1	295 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007942487.1	302 aa
<i>Puntigrus tetrazona</i>	XP_043085883.1	288 aa
<i>Pyrgilauda ruficollis</i>	XP_041330990.1	297 aa
<i>Sceloporus undulatus</i>	XP_042334777.1	302 aa
<i>Solea senegalensis</i>	XP_043868946.1	294 aa
<i>Thunnus albacares</i>	XP_044189517.1	287 aa
<i>Thunnus maccoyii</i>	XP_042251311.1	287 aa
<i>Toxotes jaculatrix</i>	XP_040915747.1	287 aa
<i>Ursus arctos horribilis</i>	XP_026369824.1	302 aa

ST6GalNAc IV amino asit dizileri için 27 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 360 amino asit ile *Mus musculus*'a, en kısa amino asit dizisi ise 209 amino asitle *Astyanax mexicanus*'a aittir. Ortalama uzunlukları 294 amino asittir.

Tablo 4.13. ST6GalNAc V için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Bubalus bubalis</i>	XP_006068477.1	330 aa
<i>Bufo gargarizans</i>	XP_044157630.1	320 aa
<i>Cervus canadensis</i>	XP_043303347.1	327 aa
<i>Cervus elaphus</i>	XP_043733105.1	327 aa
<i>Chelonia mydas</i>	XP_007062629.3	333 aa
<i>Danio rerio</i>	NP_001006663.2	312 aa
<i>Dromiciops gliroides</i>	XP_043855439.1	345 aa
<i>Equus asinus</i>	XP_014704942.2	330 aa
<i>Gallus gallus</i>	NP_001264423.1	349 aa
<i>Homo sapiens</i>	sp Q9BVH7.1	336 aa
<i>Jaculus jaculus</i>	XP_004653688.1	330 aa
<i>Mauremys mutica</i>	XP_044882135.1	330 aa
<i>Mus musculus</i>	sp Q9QYJ1.1	336 aa
<i>Mustela putorius furo</i>	XP_004758225.1	333 aa
<i>Neomonachus schauinslandi</i>	XP_021533808.1	328 aa
<i>Neovison vison</i>	XP_044094424.1	333 aa
<i>Panthera leo</i>	XP_042808195.1	331 aa
<i>Panthera tigris</i>	XP_042853546.1	332 aa
<i>Prionailurus bengalensis</i>	XP_043431242.1	329 aa
<i>Protopterus annectens</i>	XP_043941787.1	324 aa
<i>Ursus arctos horribilis</i>	XP_044239870.1	294 aa
<i>Varanus komodoensis</i>	XP_044297016.1	340 aa

ST6GalNAc V amino asit dizileri için 22 türe ulaşılmıştır. En uzun dizi 349 amino asitle *Gallus gallus*'a, en kısa dizi ise 294 amino asit ile *Ursus arctos horribilis*'e aittir. Ortalama uzunlukları 329 amino asittir.

Tablo 4.14. ST6GalNAc VI için kullanılan omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri.

Adı	Genbank erişim numarası	Dizi uzunluğu (amino asit)
<i>Bos taurus</i>	NP_001001151.2	332 aa
<i>Castor canadensis</i>	JAV36222.1	299 aa
<i>Catharus ustulatus</i>	XP_032933439.1	296 aa
<i>Cervus elaphus hippelaphus</i>	OWK10365.1	304 aa
<i>Chiloscyllium plagiosum</i>	XP_043576392.1	299 aa
<i>Dromiciops gliroides</i>	XP_043839331.1	299 aa
<i>Gambusia affinis</i>	XP_043999875.1	308 aa
<i>Gracilinanus agilis</i>	XP_044520005.1	299 aa
<i>Homo sapiens</i>	sp Q969X2.1	333 aa
<i>Mauremys mutica</i>	XP_044848859.1	296 aa
<i>Mus musculus</i>	sp Q9JMY5.1	333 aa
<i>Nematolebias whitei</i>	XP_037548379.1	308 aa
<i>Orycteropus afer afer</i>	XP_007942488.1	333 aa
<i>Protopterus annectens</i>	XP_043921250.1	305 aa
<i>Puntigrus tetrazona</i>	XP_043085791.1	308 aa
<i>Siniperca chuatsi</i>	XP_044031425.1	308 aa
<i>Solea senegalensis</i>	XP_043868943.1	304 aa
<i>Tyto alba</i>	XP_042642943.1	296 aa
<i>Varanus komodoensis</i>	XP_044295768.1	296 aa

ST6GalNAc VI amino asit dizileri için 19 türe ulaşılmıştır. En uzun amino asit dizisi 333 amino asit ile *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Orycteropus afer afer*'a, en kısa amino asit dizisi 296 amino asit ile *Mauremys mutica*, *Varanus komodoensis*, *Tyto alba* ve *Catharus ustulatus*'a aittir. Ortalama uzunlukları 308 amino asittir.

Her sialiltransferaz için sialilmotif L, motif S, motif VS ve motif III motiflerinin düzenli ifade şeklindeki halleri PROSITE veri tabanında yer alan Pratt uygulaması kullanılarak bulunmuştur (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Her sialiltransferaz için oluşturulan sialilmotifler.

Sialiltransferaz	Sialilmotif	Motif dizisi
ST6Gal I	Motif L	C-A-x-V-x-S-x-G-x(4)-S-x-L-G-x(2)-I-x(0,1)-D-x-H-x(2)-V-x-R-x-N-x-A-P-x(7)-V-G-x-K-T
	Motif S	P-x-S-G-x(2)-G-x(7)-C-x(6)-E
	Motif III	H-Y(2)-x
	Motif VS	H-P-x(3)-E
ST6Gal II	Motif L	C-A-x-V-x(8,9)-S-x-L-G-x-E-I-D-x-H-D-x(2)-L-R-F-N-x-A-P-T-x(3,4)-E-x(0,1)-D-V-G-x-K-T
	Motif S	P-S-S-G-F-x-G-x(7)-C-x(2,4)-V-x(2)-Y
	Motif III	H-Y-x-[ED]
	Motif VS	H-P-L-x(2)-E

St3Gal I	Motif L	C-A-x(0,1)-V-x(0,1)-G-N-S-G-N-L-x(4)-Y-G-x(2)-I-x(2)-H-x-F-V-x-R-M-N-x-A-P-T-x(3)-E-x(2)-V-G-x(2)-T-T
	Motif S	P-S-T-G-x-L-S-x(2)-F-x(2)-H-x-C-D-x-V-x(2)-Y-G-F
	Motif III	H-Y-W-E
	Motif VS	H-D-x-D-x-E
ST3Gal II	Motif L	C-x-V-V-G-N-S-G-N-x(4,6)-G-x(10,12)-R-x-N-x-A-P-T-x(3)-E-x-D-x-G-x(2)-T
	Motif S	P-S-T-G-M-L-x-L-F-F-x-L-H-x-C-D-E-V-x-V-x-G-F
	Motif III	H-Y-W-E
	Motif VS	H-D-A-D-x-E
ST3Gal III	Motif L	C-I-x(1,2)-G-x(1,2)-G-x(0,2)-L-x(4,5)-L-G-x(2)-I-D-x-Y-x(2)-V-x-R-x-N-x-A-P-V-x-G-x(5)-G-x-K-T-T
	Motif S	P-x(2)-G-x(2)-A-x(1,2)-T-x(0,1)-A-x(3)-C-D-x-V-x(3)-G-F
	Motif III	H-Y(2)-E
	Motif VS	H-x(4)-E
ST3Gal IV	Motif L	C-x(1,2)-V-x(0,1)-G-N-G-x(4)-N-x(0,1)-S-x(1,2)-G-x(2)-I-x(3)-D-x(2)-I-R-x-N-x(2)-P-V-x-G-Y-E-x-D-V-G-x(2)-T
	Motif S	P-x(0,1)-T-x(0,1)-G-x(6)-A-L-x(2)-C-D-x-V-x(2)-A-G-F
	Motif III	H-Y(2)-x
	Motif VS	H-x(4)-E
ST3Gal V	Motif L	C-V-x(2)-G-x-G-G-x-L-x(2,4)-L-x(0,2)-G-x(6)-D-x(2)-I-R-L-N-x(2)-P-x(7)-V-G-x(2)-T
	Motif S	P-T-x-G-x(2)-A-x(3)-A-x(3)-C-D-E-V-S-x(2)-G-F
	Motif III	H-Y-[FY]-x
	Motif VS	H-N-V-x(2)-E
ST3Gal VI	Motif L	C-V-V-V-G-N-G-G-x-L-x-N-x-T-L-G-x(2)-I-D-S-Y-D-x(0,2)-I-x(0,2)-R-M-N-x-G-P-V-x-G-x-E-x(2)-V-G
	Motif S	P-x(4)-I-A-x-T-x-A-F-x-I-C-x-E-V-H-x-A-G-F
	Motif III	H-Y(2)-G
	Motif VS	H-N-x(2)-A-E
ST6GalNAc I	Motif L	C-x-V-V-G-x-G-G-I-x(1,3)-S-x(2,4)-G-x-E-I-D-x-H-x(3)-F-R-x(2)-G-A-x(5)-E-x-D-V-G-x(2)-T
	Motif S	P-x(2)-G-A-x(2)-L-x(2)-A-x(0,2)-L-x(0,2)-C-D-x-V-x(2)-Y-G-[FY]
	Motif III	[HY]-Y-[YF]-[DE]
	Motif VS	H-D-[FY]-x-[LM]-E
ST6GalNAc II	Motif L	C-A-V-x-G-N-G-G-I-L-x-G-S-x(2)-G-x(2)-I-D-x-H-x(2)-V-F-R-x-N-G-A-x(3)-G-x(3)-D-V-G
	Motif S	P-x-x-G-A-x(2)-L-x(2)-A-x-H-x-C-D-x-V-S-A-x-G-F
	Motif III	H-Y-[FY]-[ED]
	Motif VS	H-x(4)-E
ST6GalNAc III	Motif L	C-x(3)-S-x-S-G-Q-M-x(5)-G-x(2)-I-x(4)-C-x-W-R-M-N-N-A-P-x(2)-G-x(1,2)-E-x(0,1)-D-V-G-x(2)-T

	Motif S	L-S-T-G-W-F-T-x(1,2)-L-x(0,1)-A-M-x(2)-C-x(2)-I-x(3)-G-M
	Motif III	H-Y(2)-E
	Motif VS	H-R-F-I-T-E
ST6GalNAc IV	Motif L	C-x(5)-S-G-x-M-x(1,3)-G-x(5,7)-D-x(3)-C-V-x-R-M-N-x-A-P-T-x-G-x-E-x-D-V-G
	Motif S	L-x(0,1)-T-G-x-F-T-M-x(2)-A-x(3)-C-x(2)-I-x-V-x-G-M
	Motif III	H-Y-x-E
	Motif VS	H-R-F-I-T-E
ST6GalNAc V	Motif L	C-A-L-V-T-S-S-G-x(4)-S-x(2)-G-x(2)-I-D-x(2)-E-C-V-I-R-M-N-D-A-P-T-x(5)-D-V-G-x(2)-T
	Motif S	L-S-T-G-W-F-T-M-x(0,1)-T-x(0,1)-A-L-E-L-C-D-R-I-x(2)-Y-G-M
	Motif III	H-Y(2)-E
	Motif VS	H-R-F-I-T-E
ST6GalNAc VI	Motif L	C-x(4)-S-S-S-H-x(0,1)-L-x(4,5)-G-x(2)-I-x(3)-E-C-x-I-R-M-N-D-A-P-T-x(5)-D-V-G-x(2)-T
	Motif S	L-S-T-G-W-F-T-x(0,1)-V-x(0,1)-I-A-V-E-x-C-D-x(3)-V-Y-G-M
	Motif III	H-Y(2)-[EK]
	Motif VS	H-R-F-I-T-E

Hazırlanan düzenli ifade motiflerinin doğruluğu prosite veri tabanı kullanılarak bilinen dizilerde var olup olmadığı test edilmiştir (Şekil 4.1).



ScanProsite Results Viewer

Output format: Graphical view - this view shows ScanProsite results together with ProRule-based predicted intra-domain features [help].

Hits for USERPAT1(C-A-x-V-x-S-x-G-x(4)-S-x-L-G-x(2)-I-x(0,1)-D-x-H-x(2)-V-x-R-x-N-x-A-P-x(7)-V-G-x-K-T) motif on sequence AAH31476-1 :

found: 1 hit in 1 sequence

AAH31476-1 (406 aa)

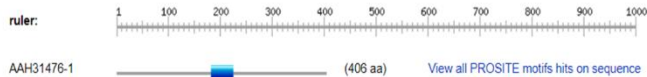
MIHTILKKKPSCCVLVFLFAVICVMEKKKSGSYDSFKLQTKFQVLSLGLKANGSDSQSVSS
STQDPHGRQTGLSLRLGAKAPEASFQWKNDSKHLIPRLQKTDKIVLSINIKYKVSYYGPGG
IKFSAEALRCHLRDHVNSVNEVDFFPNTSENEGYPKESIRTKAGPUGRCVVSSAGSLKSSQ
GREIDHDVLRFGAPTAIFQDVGKTITRLNWSQLVTEKFLKDSLVNIGILLVMDPSVYHS
DIPAHYQIPYHFMWIKYTKRLHPQPFYILKQHPHLELDLQETSPETIQHPSPSSGILGII
MYTLCDQDIEYFLPSKIRKTDVCYYQKFFDSACTHGAHPLLYEINLVHLLIQGTDEDYLLGKA
TLPGFRTIHC

Legend:

disulfide bridge active site other 'ranges' other sites

Please note that the graphical representations of domains displayed hereafter are for illustrative purposes only, and that their colors and shapes are not intended to indicate homology or shared function. For more information about how these graphical representations are constructed, go to <https://prosite.expasy.org/mydomains/>.

hits by patterns: [1 hit (by 1 pattern) on 1 sequence]



USERPAT1 :

Pattern: C-A-x-V-x-S-x-G-x(4)-S-x-L-G-x(2)-I-x(0,1)-D-x-H-x(2)-V-x-R-x-N-x-A-P-x(7)-V-G-x-K-T
Approximate number of expected random matches [Ref: PMID 11535175] in ~ 100'000 sequences (50'000'000 residues): 9.711268e-18

184 - 227: CAVVSAGSLKSSQLGREI.DdHdVLRFGAPTAIFQDVGKT

Şekil 4.1. *Homo sapiens* ST6Gal I dizisinde (AAH31476-1) motif L'nin gösterilmesi (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>).

Omurgalı sialiltransferaz amino asit dizilerinden oluşturulan motifler 27 farklı böcek türünün (Tablo 4. 16) protein dizilerinde aratılmıştır. Tabloda tür adı, referans genom erişim numarası ve protein dizi miktarı verilmiştir.

Tablo 4.16. Böcek türlerinin protein dizileri.

Tür	Referans Genom erişim numarası	Protein dizi miktarı
<i>Acromyrmex charruanus</i>	GCA_017607545.1	8986
<i>Acromyrmex echinatio</i>	GCA_000204515.1	20241
<i>Aedes aegypti</i>	GCF_002204515.2	28317
<i>Anopheles gambiae</i>	GCF_000005575.2	14102
<i>Apis cerana</i>	GCF_001442555.1	20933
<i>Apis dorsata</i>	GCF_000469605.1	20012
<i>Apis florea</i>	GCF_000184785.3	18628
<i>Apis mellifera</i>	GCF_003254395.2	23471
<i>Bactrocera dorsalis</i>	GCF_000789215.1	20833
<i>Bombyx mandarina</i>	GCF_003987935.1	19224
<i>Bombyx mori</i>	https://dbarchive.biosciencedbc.jp/en/kaiko/download.html	45719
<i>Drosophila ananassae</i>	GCF_017639315.1	25915
<i>Drosophila mauritiana</i>	GCF_004382145.1	23239
<i>Drosophila melanogaster</i>	GCF_000001215.4	30717
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	GCF_009870125.1	26574
<i>Drosophila sechellia</i>	GCF_004382195.1	24001
<i>Drosophila simulans</i>	GCF_016746395.2	26225
<i>Drosophila suzukii</i>	GCF_013340165.1	25540
<i>Drosophila virilis</i>	GCF_003285735.1	23429
<i>Drosophila yakuba</i>	GCF_016746365.2	25398
<i>Galleria mellonella</i>	GCF_003640425.2	20166
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	GCF_000500325.1	19038
<i>Locusta migratoria</i>	GCA_000516895.1	1573
<i>Manduca sexta</i>	GCF_014839805.1	24854
<i>Musca domestica</i>	GCF_000371365.1	21304
<i>Myzus persicae</i>	GCF_001856785.1	23910
<i>Tribolium castaneum</i>	GCF_000002335.3	22610

FIMO’da sialilmotifleri aratılırken her bir amino asiti ayrı incelenmektedir. Genomunda sialiltransferaz bulunan bir böcekte aratıldığında motifi bulunduğunda pozitif bir skor (Tablo 4.17) ve geri kalan olasılıklar için ise negatif skor vermektedir (Tablo 4.18-4.20). Tablolarda dizilerin Genbank erişim numaraları, eşleşen dizinin başlangıç ve bitiş amino asit sıraları, puanlamaları, p-değeri, q-değeri ve eşleşen motif dizisi verilmiştir.

Tablo 4.17. ST6Gal ailesi için olan böcek türlerinde puanlamaları.

Name	Sequ ce name	Start	Stop	Score	p- value	q- value	Matched sequence
<i>Aedes eagypitii</i>	XP_02 171214 4.1	190	233	70,60 19	1.3e-23	3.1e- 21	CAVIASAGSLK GSRLGDFIDDH DIVMRFNHAPT KGFEVDVGSKT
<i>Bombyx mori</i>	XP_00 492874 5.3	240	283	76,31 07	5.49e- 25	9.67e -18	CAVVSSAGALL GSRLGDFIDSHD MVLRFNNAPTD NYTDDVGSKT
<i>Drosophila Melanogas- ter</i>	NP_72 6474.1	218	261	78,42 72	1.05e- 25	3.99e -23	CAIVSSAGSLAG SKLGRFIDTHDI VMRFNHAPTQG HEVDVGSKT
<i>Galleria mellonella</i>	XP_02 676448 5.1	238	281	77,45 63	1.92e- 25	7.95e -23	CAVVTSAGALL GSRLGEFIDSHD MVLRFNNAPTI NFTDDVGAKT
<i>Leptinotarsa dececlineata</i>	XP_02 302710 8.1	211	254	76,90 29	2.79e- 25	9e-23	CAIVASAGALK DSNLGLLIDSHD LVMRFNNAPTQ GFEDDVGKKT
<i>Manduca sexta</i>	XP_03 002808 3.2	240	283	77,87 38	1.45e- 25	6.04e -23	CAVVTSAGALL GSRLGDFIDSHD MVLRFNNAPTE NYTEDVGTKT
<i>Musca domestica</i>	XP_01 129082 8.1	155	198	79,10 68	6.63e- 26	2.2e- 23	CAIVSSAGSMA GSKLGRFIDSHD IVMRFNHAPTR GFEVDVGSKT
<i>Tribulium castaneum</i>	XP_96 8750.1	212	255	75,58 25	9.62e- 25	3.76e -22	CAIVASSGALK DSNLGKKIDAH DLVLRFNHAPT KGFEVDVGRKT

Tablo 4.18. *Bombyx mori*'de STGal I için motif L araması. Fimo verilerine göre ilk sıra *Bombyx mori* protein dizisinde yer alan sialiltransferaz (XP_004928745.3) geri kalanlar ise benzer olabillite gösteren diziler.

Sequence name	Start	Stop	Score	p-value	q-value	Matched sequence
XP_004928745.3	240	283	76,3107	5.49e-25	9.67e-18	CAVVSSAGALLGSRLGDFID SHDMVLRFNNAPTDNYTDD VGSKT
XP_012547460.1	454	497	-3,87379	2.64e-07	0.925	SAIVSCGVIIAALCGAILVA AKGWRRENTAPHHAYVPH KGRIK
XP_004928624.1	117	160	-4,06796	2.83e-07	0.925	CAYGVPEQFPCTPGLVYDER SHSCNWPDLLQPFCNPEAV VGFKC
XP_037876842.1	1032	1075	-5,96117	5.47e-07	0.925	LANSKQATAKRPSNLGEKIK VHQLSTDNTADRFANYDV RGERL
XP_021204459.2	225	268	-6,03883	5.61e-07	0.925	ILIVSGWGSTHPSGYGHIPDR IRFVVPVMAQDKCQKSYNI YIT
XP_037871579.1	3094	3137	-6,46602	6.44e-07	0.925	DGKVYSWGEDEDGKLGHG NRLTLEVRLIDALSGERVV SVACGS
XP_037871579.1	3252	3295	-8,50485	1.25e-06	0.925	DGEVWTWGKGDYFRLGHG CDAHVRPRTLVEALRGRRV VHVAVGA
XP_012549691.1	282	325	-8,81553	1.38e-06	0.925	CKAIVSSIHGRQSQAQRKEA YHGFVEAQNGALFCTDVAA RGLDI
XP_037875981.1	260	303	-8,88350	1.42e-06	0.925	PCTHCEKRFNDRSKLQRHID THFGVKRYECEICHSCYTRR CYWK
XP_004922254.1	3	46	-9,15534	1.56e-06	0.925	RAFVLIWCLCFSISRCHIPN NYYDSAESVAPVAVLPGNV TKLT
XP_004923208.2	575	618	-9,49515	1.75e-06	0.925	AATGDPTPEISWKKDGGND FPAARERRMNVMPDDHLFFI VNVKT
XP_037868976.1	202	245	-9,75728	1.92e-06	0.925	VASQYGISPISAPQNGHVIHQ HIPVQPFNGIPTQQDLINSGA EG
XP_004926065.2	183	226	-12,5243	5.08e-06	0.925	IAAVFSPESPSFLVTKGRYDE CRKVFRWLRTDEDDDELET MIKT
XP_012553302.2	121	164	-12,8641	5.66e-06	0.925	VAIVIPKGINDCVMGYESVS DRVLSIRIKAAPINLDIIQVY APT
XP_037868721.1	593	636	-13,1068	6.11e-06	0.925	PEIVKTSAFCAPSILITFINMM LFKHDKNTRPQCDDFMFSG QMF

Tablo 4.19. *Manduca sexta* ST6GalNAc I için motif L araması. Motif için en uygun olan dizi XP_030035749.2 kırmızı gösterilmiştir.

Sequence name	Start	Stop	Score	p-value	q-value	Matched sequence
XP_03729 6480.1	3212	3254	- 0.9805 83	2.17e- 08	0.153	CRDDCPSGEQLSSDGGCEPCPR GTWRANGAGAACMPCPPGTTT
XP_03004 1331.1	3236	3278	- 0.9805 83	2.17e- 08	0.153	CRDDCPSGEQLSSDGGCEPCPR GTWRANGAGAACMPCPPGTTT
XP_03729 4613.1	993	1035	- 8,1844 7	2.74e- 07	0.333	QVVIIQFGGMAFSTAGLSIDQW LWCLFFGAGTLVWGQLVTTVP
XP_03004 0711.1	1009	1051	- 8,1844 7	2.74e- 07	0.333	QVVIIQFGGMAFSTAGLSIDQW LWCLFFGAGTLVWGQLVTTVP
XP_03002 8083.2	241	283	- 11,553 40	9.36e- 07	0.662	AVVTSAGALLGSRLGDFIDSHD MVLRFNNAPTENYTEDVGTKT
XP_03729 4444.1	111	153	- 11,786 40	1.01e- 06	0.662	YGVIGLDGNVTRSSCYSQLHK GNWAPSIGQWALEHGLDVGLV T
XP_03002 7890.1	170	212	- 14,747 60	2.44e- 06	0.942	CPVVGCGNNLPVLKQHLISDDE LKFRLTLTQHSTMIQEPNIMD
XP_03729 7103.1	4173	4215	- 14,893 20	2.55e- 06	0.942	RGRWCAPGVCAHGGACEEGD WGPSCRCRGYYGPRCELDVDE CA
XP_03002 8467.1	314	356	- 16,815 50	4.82e- 06	0.946	QDPLGIQGRRYKHRGIEIWSRP ILPIQGQYYSYAVAFVNRRT
XP_03729 6798.1	54	96	- 17,165 00	5.46e- 06	0.946	LPVVGQKQIHNRIQQLNFRDCH AKISQVDAQATLNGVGVVQVT
XP_03729 8775.1	606	648	- 18,592 20	8.94e- 06	0.951	IPLVNLGGRFQFLPNGTLWIESA LPYDEGHYMCKSENGVGSPL
XP_03729 5453.1	1161	1203	- 19,213 60	1.09e- 05	0.951	CHVVGHNPICTCPENLPEGDPFI RCYRKSIIHQPPDPCLLSPC

XP_03003 5749.2	285	327	- 22,582 5	2.75e- 05	0.999	ECAVSSSGERRVFNHCEMDL NSCFYNVWVHRRPLSECVGGK K
XP_03729 9910.1	2204	2246	- 23,359 2	3.46e- 05	1	KQVDQAGLINHPPWILKIIQLYE TQVRHIGIMTLGPPGAGKTT
XP_03002 0040.1	310	352	- 24,068 0	4.32e- 05	1	FLVVAVGGTCIGVWVWFATGL VTRFTHEVRVIEPIFIVMAYL

Tablo 4.20. *Galleria mellonella* ST3Gal IV için motif L araması. En uygun dizi XP_031770363.1 kırmızı ile gösterilmiştir.

Sequence name	Start	Stop	Score	p-value	q-value	Matched sequence
XP_03176835 2.1	3210	3252	-2,5049	3.98e-08	0.066 7	CRDDCPSGEQLSSDGG CEPCPRGTWRANGAG AACAPCPPGTTT
XP_02676462 2.1	97	139	-10,6019	6.72e-07	0.966	AGVVIDSGPRFEVAYP NGICHFLEKLSFGATHK FATRDVMLRE
XP_02676448 5.1	239	281	-11,7379	9.94e-07	1	AVVTSAGALLGSRLGE FIDSHDMVLRFNNAPI NFTDDVGAKT
XP_02676448 5.1	238	280	-11,8932	1.05e-06	1	CAVVTSAGALLGSRLG EFIDSHDMVLRFNNA TINFTDDVGAK
XP_03176386 1.1	270	312	-13,5146	1.7e-06	1	MEATDEGGIQCCLGEG VEVLHSEWQNDNCIPIS VPEDDPFHRY
XP_02676408 0.1	161	203	-14,0971	2.01e-06	1	LAKSMQGIYCREVGIIY PEIKHSTHFRRLGLAME RPLVDLLHNN
XP_03176978 1.1	161	203	-14,0971	2.01e-06	1	LAKSMQGIYCREVGIIY PEIKHSTHFRRLGLAME RPLVDLLHNN
XP_03177036 3.1	105	147	-15,2718	2.86e-06	1	RCVVEINGERIVQTRGQ PGELFPDKPWKGQQNE PNPAVVGMGT

XP_03176826 2.1	74	116	-15,5922	3.17e-06	1	CKDIGPHFIAYYGRHG GPRDHIRHVGD LGNIK AEEGATVNVKI
XP_03176281 4.1	3	45	-16,3495	4.1e-06	1	SNCVYKLG IAYHFKQT CESADVRLRQYLGRQI PEKSSDVAVMT
XP_02675212 7.1	633	675	-18,8350	9.67e-06	1	CVVVGKDCPHMKELK GRKITPHLAFSLILKSSE VTSLDFVAPD
XP_03176532 3.1	974	1016	-20,3592	1.52e-05	1	QDVPLFAGIYSDLFPGV EIPQPDRAELLCCINKD LEKRN LQAT
XP_02676382 4.1	534	576	-26,6893	9.98e-05	1	PCIEGRNSCGPHSSCVV QGDTFTCECQSGFSNIF HEDSVACID

Böcek protein dizilerinin bazılarında ST6Gal I ve bazılarında ise ST6Gal II bulunmaktadır. Yapılan aramalarla da desteklenmektedir. Sadece iki böcek türünde ST6Gal I ve ST6Gal II dışında bir sialiltransferaz olabilecek diziler bulunmuştur. Bulunan diziler ise Clustal Omega ile bilinen omurgalı dizileriyle çoklu hizlama yapılmıştır. Sadece motif L kısımlarında benzerlik bulunmuştur. *M. sexta*'da ST6GalNAc I (Şekil 4.2), *Galleria mellonella*'da ise ST3Gal IV (Şekil 4.3) benzeri dizi bulunmuştur.

```

Manduca sexta -----MAAPYFL--FPAVLVPVLIINTRCHTANNSDVIVINSGHADVV---DQP---
Gallus gallus MGFLIRRLPKDSRIFRWLLILTTFSTIITSFSAIFGMEKSI-FRQLKIYQSIHMLQVNTQDQGSNYSANGRI
Homo sapiens MRSCLRWRCRHLSSQGVQWSLLLAVLVFLLFALPSPFIKEPQTKPSRHQRTENIKERSL----QSLAKPKSQAPTRA
Mus musculus ---MTRYCRGLSQRQAFLLLTLVA--LLFILLFVVKDPPRAKDSRCQFIWKNDASAQ-----ENQQAEPQVP---

Manduca sexta --QNIINEPKTTETENT---KLMIPETTTTAEIEATEDVVFVPN-----EKE-----
Gallus gallus SKVGL--ERDIAWLELNT---AVSTPSGEGKEEQKKTVPVAKVE-----EAKK--VTVKPFPEVV
Homo sapiens RRTTIYAEPVPENNALNTQTQPKAHTTGDGKEANQAPPEEQDKVPHTAQRAAWKSPEKEKTMVNTLSRPGQDA
Mus musculus -----IMTLPSPRVHMK

Manduca sexta -----V-----QRNFDDDKMKIGDILYR
Gallus gallus GITNTTASTASVVER-----TKERTTARFVPGVGEADGKRTTLALPSMKEDKEKATVK-----
Homo sapiens GMASGRTEAQSWKSQ---DTRTTQGGNGGQTRKLTASRTVSEKHQ--GKAATTAKTLPKSOHRMLAPTGAIVSTR
Mus musculus ETTSV--SSKDLKKQEREAVQGEQAEKKEKLEITIRPAPENPQ--SKAEPAAKTPVSEHLDKLPAPGALS--

Manduca sexta K-----TVGDIMNDRNVRIETAPNEDIVFISGKNNEVETSKTERNEANIQKKEPKKKFIDCANLDCNNTL
Gallus gallus -PSFGMKVAHANSTSKDKPKAEPPASVKAIRV-TQA--ATVTEKKLRAADFKEPQWDFDDEYILDSSS-P
Homo sapiens TRQKGVTTA-VIPPKKKPQATPPAP-----FQS--PTTQRNQLKAANFKSEPRWDFEEKYSFEIGG-L
Mus musculus TRKTFMATG-AVPAKKVQVQATKSPAS-----SPH--PTTRRRQLKASEPKSEPRWDFEEYSLDMSS-L

Manduca sexta NSVCGVKKDNGQLKYRLFNDYFRKVNCFKYEENRYKQIELERCNIASSHNTERPFSYNP---MPLPPPPR
Gallus gallus ASTCSSESRAK-AAKSDWLRLDLPNI--TLFIDKSYFNVSEWDRLEHFAPPYGFMELNYSLVVEVMSRLPPNP
Homo sapiens QTTCPDSVKIK-ASKSLWLQKLFPLNI--TLFLDSRHFNQSEWDRLEHFAPPYGFMELNYSLVQKVTRFPVPV
Mus musculus QTNCASAVKIK-ASKSPWLQNIPLNI--TLFLDSGRFTQSEWNRLEHFAPPYGFMELNYSLVQKVTRFPVPV

Manduca sexta SPMDKSRRLSSRLSLIGVDGRCYHSTCPISCPDNYDPCAVSSSGERRVFNHCEM--DLNSCFYNVWHRR
Gallus gallus H---QQLLLAN---SSN---VSTCI-----CAVVGNGGI---LNSGMGQEIDSHDYVF---R
Homo sapiens Q---QQLLLAS---LPAG---SLRCI-----CAVVGNGGI---LNSHMGQEIDSHDYVF---R
Mus musculus Q---QQLLLAS---LPTG---YSKCI-----CAVVGNGGI---LNSRVGQEIDSHDYVF---R

Manduca sexta PLSECVGGKKADMRQNRSFISW----MQRVGIVDKRGRVLVT-----
Gallus gallus VSGAVIRGYEKDVGTRTSFYGFTAYSLVSSQLNLGHKGFKKIPQGHIRYIHFLAEVRDYEWLKALLDLDKDIRK
Homo sapiens LSGALIKGYEQDVGTRTSFYGFTAFSLTQSLLLILGNRGFKNVPLGKDVRYLHFLEGRDYEWEALLMNQTVMS
Mus musculus LSGAVIRGYEQDVGTRTSFYGFTAFSLTQSILILGRRGFQHVPLGKDVRYLHFLEGRDYEWEALMFLNQTLAK

Manduca sexta -----
Gallus gallus GFLNYYGRRPRERFDEFTMNKYLVAHPDFLRYLKNRFLKSKNLQKPYWRLYRPTTGALLLTALHLCDRVSA
Homo sapiens KNLFWFRHRPQEAFFREALHMDRYLLHHPDFLRYMKNRFLRSKTLGDAHWRIRYRPTTGALLLTALQLCDQVSA
Mus musculus THLSWFRHRPQEAFFRNALDLDRLHHPDFLRYMKNRFLRSKTLTAHWRIRYRPTTGALLLTALHLCDKVSAY

Manduca sexta -----
Gallus gallus GYITEGHQKYSDDHYDKWKRLVFYVNHDFNLERQVWKRLEDENIMKLYQRS-----
Homo sapiens GFITEGHERFSDHYDTSWKRLIFYINHDFKLEREVWKRLEDGIIRLYQRPFGPGTAKAKN
Mus musculus GFITEGHQRFSDHYDTSWKRLIFYINHDFRLERMVWKRLEDGIIRLYQRPQSDKARN--

```

Şekil 4.2. *Manduca sexta* (XP_030035749.2), *Gallus gallus* ST6GalNAc I (NP_990571.2), *Homo sapiens* (sp|Q9NSC7.1) ve *Mus musculus* (NP_035501.2)'un Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)' da hizalanması. Kırmızı kutu içinde gösterilen yer hepsinde ortak görünen motif L kısmıdır.

Bulunan dizilerin 3 boyutlu yapıları insan sialiltransferaz dizilerinin 3 boyutlu yapılarıyla karşılaştırılmıştır. İnsan sialiltransferaz dizisinin 3 boyutlu yapısı Alphafold'dan alınmıştır (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). *Manduca sexta* ve *Galleria mellonella* dizilerinin 3 boyutlu yapılarını bulmak için internet tabanlı protein 3 boyutlu yapısını tahmin etme programı olan I-TASSER kullanılmıştır (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). Bulduğumuz dizilerin fasta formatları sisteme girilmiştir ve uygun olan 3 boyutlu yapı seçilmiştir.

Manduca sexta ST6GalNAc I dizisinin 3 boyutlu yapısı, *Homo sapiens* ST6GalNAc I dizisinin 3 boyutlu yapısı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4). Burada dizileme yapıldığında motif L kısımlarında benzerlik görülmüştür. Benzer alanlar kırmızı renk ile gösterilmiştir.

```

Galleria mellonella -----MGASGTRMYLFVLIYVSYLVAIPAFAEDVSYQACVDKYSRKGYPQWQWSDHYTCHRYRCE-----
Gallus gallus      MPALLIKMINKSRGKILGVLA-LFLVMVWYSIYRED-----S----FYFPVQENK--TVCPIGEVERKAAQLIG
Homo sapiens       -----MVSKSRWKLALMLALVLVVMVWYSISRED-----RYIELFYFPIPEKK--EPCLOGEAESKASKLFG
Mus musculus       -----MTSKSHWKLALALVLVVMVWYSISRED-----RYIEFFYPPISEKK--EPCFQGEAERQASKIFG

Galleria mellonella --IRDG-----KYFIAA-----VGCGRK-PKIPENALECHEYIEDENVEFFTCCARIRCVVEINGERIVQTRG
Gallus gallus      NYTRDRPLFLQLKDYFWVRTPSLYELPYGKIGSEDVLLRLSVTSYSLPESIQSL--KCRRCVVVGNHRLRNSSM
Homo sapiens       NYSRDQPIFLRLLEDYFWVKTPSAYELPYGTGSEDLLRLVLAITSSSIPKNIQSL--RCRCVVVGNHRLRNSSL
Mus musculus       NRSRDQPIFLQLKDYFWVKTPSTYELPFGTGSSEDLLRLVLAITSYIPEISIKSL--ECRCVVVGNHRLRNSSL

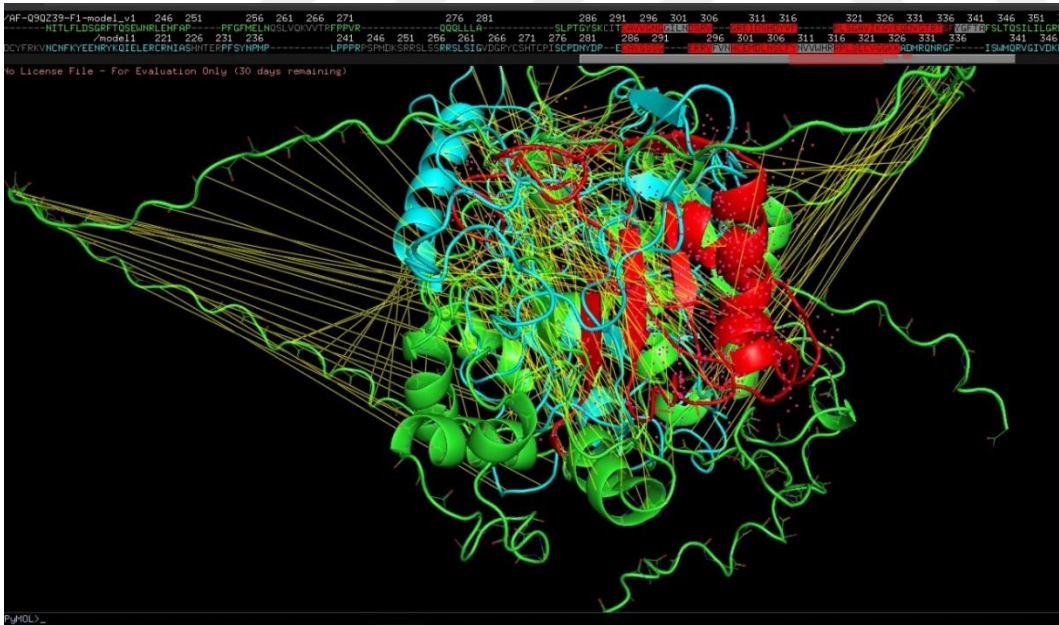
Galleria mellonella Q-----PG-----ELFPDKPWKGQQNEPNPAVVG---MGTIQQ---NTISNEPQGQF
Gallus gallus      GDTINTYDVVIRLNNAPVHGYEQDVGSKTTIRLFYPESAHFDPQAENNPNTLLVLVPFKFVDFQWMEAILSD-RKRV
Homo sapiens       GDAINKYDVVIRLNNAPVAGYEGDVGSKTTIRLFYPESAHFDPKVENNPDLLVLVAFKAMDFHWIETILSD-RKRV
Mus musculus       GGVINKYDVVIRLNNAPVAGYEGDVGSKTTIRLFYPESAHFDPKIENNPDLLVLVAFKAMDFHWIETILSD-RKRV

Galleria mellonella ASGMFNNRGAGKQAKPTIFPTADGSDINGRRYVDPYPTQQMQ-----DSPRK-KRATVYSLFDRRLARERGSYQ
Gallus gallus      RKGFWK-----QPPLIWDV---NPKQVIRILNPFYMKVTAARKLLSLPMQPRKVKQKPTTGLLAITLALHF----
Homo sapiens       RKGFWK-----QPPLIWDV---NPKQIRILNPFPMETIADKLLSLPMQPRKIKQKPTTGLLAITLALHL----
Mus musculus       RKGFWK-----QPPLIWDV---NPKQVIRILNPFPMETIADKLLSLPIQQPRKIKQKPTTGLLAITLALHL----

Galleria mellonella PHQIKIHG--YTPE---KYTSYFSN-NVK-----GVSNPKLLFNSS-----
Gallus gallus      CDLVHIAGFGYPDSANKKQTIHYEYQITLKSMAASEHNISHEAVAIRKMLELGLVKNLTYF
Homo sapiens       CDLVHIAGFGYPDAYNKKQTIHYEYQITLKSMAAGSHNVSQEALAIKRMLEMGAIRKNTSF
Mus musculus       CDLVHIAGFGYPDASNKKQTIHYEYQITLKSMAAGSHNVSQEALAIKRMLEMGAIRKNTSF

```

Şekil 4.3. *Galleria mellonella* (XP_031770363.1), *Gallus gallus* ST3Gal IV (AFN40450.1), *Homo sapiens* ST3Gal IV (AAH10645.1) ve *Mus musculus* ST3Gal IV (AAH11121.1)'un Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)' da hizalanması. Kırmızı kutu içinde gösterilen yer hepsinde ortak görünen motif L kısmıdır.



Şekil 4.4. *Manduca sexta* ve *Homo sapiens* ST6GalNac I 3 boyutlu yapı karşılaştırması. Yeşil; *H. sapiens*, mavi; *M. sexta* ve kırmızı; ikisinde de ortak olan kısım.

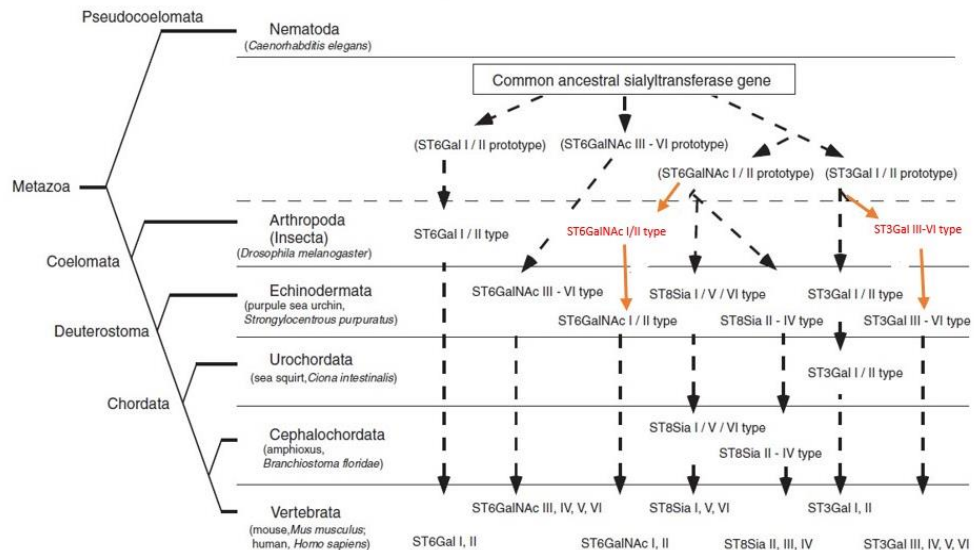
Galleria mellonella ST3Gal IV dizisi 3 boyutlu yapısı ile *Homo sapiens* ST3Gal IV dizisi 3 boyutlu yapısı karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5). Burada dizileme

yapıldığında motif L kısımlarında küçük bir benzerlik görülmüştür. Benzer kısımlar kırmızı renk ile gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *Galleria mellonella* ile *Homo sapiens* ST3Gal IV 3 boyutlu karşılaştırması. Yeşil; *H. sapiens*, pembe; *G. mellonella* ve kırmızı; ikisinde de ortak olan yerler.

M. sexta ve *G. mellonella*'da bulunan bu sialiltransferaz dizileri evrimsel açıdan da gelecek çalışmalara yön göstermektedir (Şekil 4.6). Takasima'nın (2008) yaptığı sialiltransferaz genlerinin varsayımsal evrimsel sürecine ekleme yapılmıştır.



Şekil 4.6. Sialiltransferaz genlerinin varsayımsal evrimsel süreci. Hayvan sialiltransferaz genlerinin varsayımsal evrimsel süreci gösterilmiştir. ST6Gal ailesine ait sialiltransferaz genleri ilk olarak böceklerde tespit edilmiştir. Buna ek olarak çalışmamızda ST3Gal ve ST6GalNac ailelerine ait sialiltransferaz genleri de ilk böceklerde olduğu kırmızı renk ile gösterilmiştir (Takashima, 2008).

4.2. ST6Gal I Geninin mRNA Ekspresyon Seviyeleri

RNA izolasyonları yapılan yağ dokusu, orta bağırsak, hemosit, ovaryum ve testis dokularının RNA miktar ölçümleri nanodrop kullanılarak belirlenmiştir. Nanodroptan elde edilen sonuçlar tablolarda verilmiştir (Tablo 4.21-4.25). A260/A280 absorbans oranlarına bakıldığında kontrol grupları orta bağırsak kontrol 1. gün (KOb-1), 4. gün (KOb-4) ve 7. gün (KOb-7), hemosit kontrol 1. gün (KH-1), 4. gün (KH-4), 7. gün (KH-7), yağ dokusu kontrol 1. gün (KY-1), 4. gün (KY-4) ve 7. gün (KY-7), testis kontrol 1. gün (KT-1), 4. gün (KT-4) ve 7. gün (KT-7) ve ovaryum kontrol 1. gün (KOv-1), 4. gün (KOv-4), 7. gün (KOv-7) ve uygulama grupları; orta bağırsak uygulama 1. gün (SOB-1), 4. gün (SOB-4) ve 7. gün (SOB-7), hemosit uygulama 1. gün (SH-1), 4. gün (SH-4), 7. gün (SH-7), yağ dokusu uygulama 1. gün (SY-1), 4. gün (SY-4) ve 7. gün (SY-7), testis uygulama 1. gün (ST-1), 4. gün (ST-4) ve 7. gün (ST-7) ve ovaryum uygulama 1.gün (SOv-1), 4. gün (SOv-4), 7. gün (SOv-7) için RNA miktarları genel olarak ideal saflıkta çıkmıştır (Tablo 4.26).

Tablo 4.21. 5. instar ipek böceği hemositlerinin kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları.

HEMOSİT	1. gün	4. gün	7. gün
Kontrol	249 ng/μl	350,3 ng/μl	48,6 ng/μl
0,1 M sialik asit uyg.	416,7 ng/μl	370,1 ng/μl	51,0 ng/μl

Tablo 4.22. 5. instar ipek böceği orta bağırsaklarının kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları.

ORTA BAĞIRSAK	1. gün	4. gün	7. gün
Kontrol	270,8 ng/μl	963,2 ng/μl	325,9 ng/μl
0,1 M sialik asit uyg.	182,5 ng/μl	261,8 ng/μl	1237,6 ng/μl

Tablo 4.23. 5. instar ipek böceği yağ dokularının kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları.

YAĞ DOKU	1. gün	4. gün	7. gün
Kontrol	135,3 ng/μl	341,0 ng/μl	2964,8 ng/μl
0,1 M sialik asit uyg.	242,8 ng/μl	308,2 ng/μl	1533,4 ng/μl

Tablo 4.24. 5. instar ipek böceği ovaryumlarının kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları.

OVARYUM	1. gün	4. gün	7. gün
Kontrol	86,3 ng/μl	348,5 ng/μl	328,3 ng/μl
0,1 M sialik asit uyg.	88,4 ng/μl	353,0 ng/μl	993,7 ng/μl

Tablo 4.25. 5. instar ipek böceği testislerinin kontrol ve uygulama sonrası 1, 4 ve 7. günlerdeki RNA miktarları.

TESTİS	1. gün	4. gün	7. gün
Kontrol	140,8 ng/μl	219,2 ng/μl	1003,8 ng/μl
0,1 M sialik asit uyg.	266,9 ng/μl	1489,4 ng/μl	348,8 ng/μl

Tablo 4.26. 260 nm/280 nm'de RNA saflığı değerleri.

Gruplar	A260/A280
KOb-1	1,91
KH-1	2,05
KY-1	1,80
KT-1	1,88
KOv-1	1,62
SOb-1	1,83
SH-1	2,03
SY-1	1,81
ST-1	1,87
SOv-1	1,99
KOb-4	2,04
KH-4	1,94
KY-4	1,83
KT-4	1,75
KOv-4	1,77
SOb-4	1,85
SH-4	1,89
SY-4	1,83
ST-4	1,94
SOv-4	1,92
KOb-7	1,90
KH-7	1,99
KY-7	1,56
KT-7	2,02
KOv-7	1,94
SOb-7	1,95
SH-7	2,00
SY-7	1,95
ST-7	1,97
SOv-7	2,01

RNA izolasyonu sonucu çıkan miktarlar 20 µl toplam hacimde 100 nanogram olacak şekilde RNAase free water ile seyreltilmiştir. Real-time PCR analizinde target gen ve referans genler için elde edilen CT değerleri Tablo 4.27 ve Tablo 4.28'de, DeltaCT değerleri ise Tablo 4.29'da verilmiştir.

Tablo 4.27. Real-time PCR target gen CT değerleri.

Gruplar	Target CT	Target Duplike CT	Target Ortama CT
KOb-1	29,53	29,88	29,705
KH-1	23,62	24,5	24,06
KY-1	27,65	28,1	27,875
KT-1	26,32	26,73	26,525
KOv-1	29,07	30,24	29,655
SOb-1	27,96	27,83	27,895
SH-1	28,84	29,13	28,985
SY-1	24,2	24,36	24,28
ST-1	28,52	29,85	29,185
SOv-1	28,13	28,48	28,305
KOb-4	28,02	28,67	28,345
KH-4	24,52	24,77	24,645
KY-4	29,07	29,66	29,365
KT-4	24,5	23,98	24,24
KOv-4	27,48	28,81	28,145
SOb-4	26,84	26,92	26,88
SH-4	23,85	24,07	23,96
SY-4	22,99	23,35	23,17
ST-4	24,57	24,37	24,47
SOv-4	21,8	21,48	21,64
KOb-7	24,85	23,74	24,295
KH-7	27,49	28,21	27,85
KY-7	28,58	28,47	28,525
KT-7	26,96	27,11	27,035
KOv-7	21,59	21,82	21,705
SOb-7	27,18	21,77	24,475
SH-7	27,89	28,6	28,245
SY-7	23,63	23,75	23,69
ST-7	28,26	28,68	28,47
SOv-7	24,03	24,6	24,315

Tablo 4.28. Real-time PCR referans gen CT değerleri.

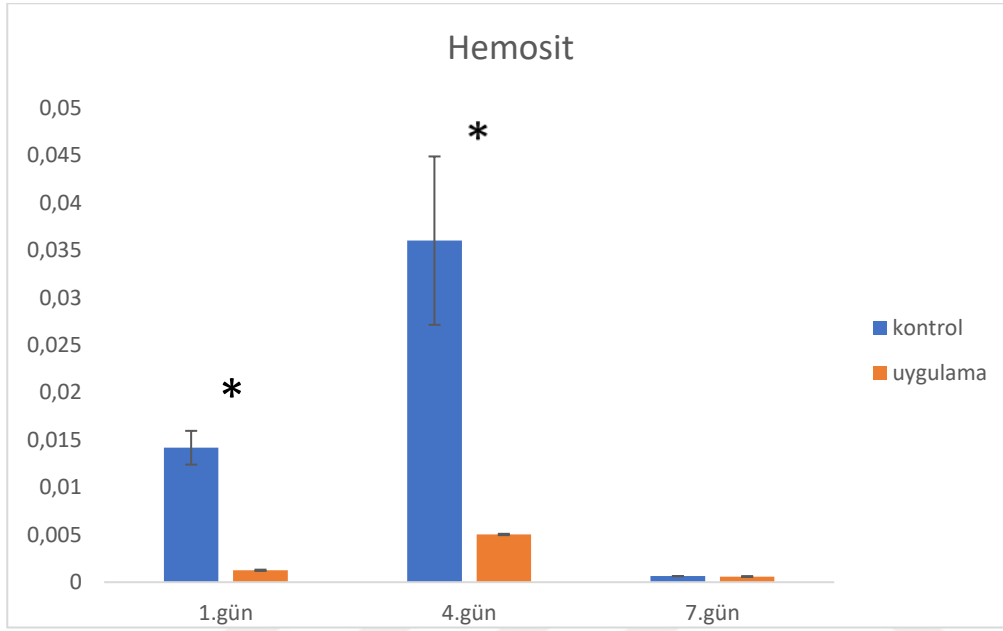
Gruplar	Referans CT	Referans Duplike CT	Referans Ortalama
KOb-1	19,82	20,23	20,025
KH-1	17,79	18,05	17,92
KY-1	18,62	18,65	18,635
KT-1	16,04	16,3	16,17
KOv-1	18,79	20,55	19,67
SOB-1	16,09	16,99	16,54
SH-1	19,33	19,36	19,345
SY-1	17,32	18,36	17,84
ST-1	15,81	16,89	16,35
SOv-1	14,8	15,34	15,07
KOb-4	15,83	16,18	16,005
KH-4	19,13	20,57	19,85
KY-4	18,99	20,72	19,855
KT-4	17,58	17,46	17,52
KOv-4	19,2	21,52	20,36
SOB-4	16,76	17,68	17,22
SH-4	16,18	16,47	16,325
SY-4	15,78	16,91	16,345
ST-4	17,85	19,28	18,565
SOv-4	15,93	16,97	16,45
KOb-7	18,6	18,35	18,475
KH-7	16,89	17,59	17,24
KY-7	21,88	19,25	20,565
KT-7	16,64	16,94	16,79
KOv-7	21,73	22,45	22,09
SOB-7	16,63	16,94	16,785
SH-7	17,27	17,79	17,53
SY-7	16,35	17,75	17,05
ST-7	17,54	19,95	18,745
SOv-7	17,44	20,07	18,755

Tablo 4.29. Delta CT sonuçları.

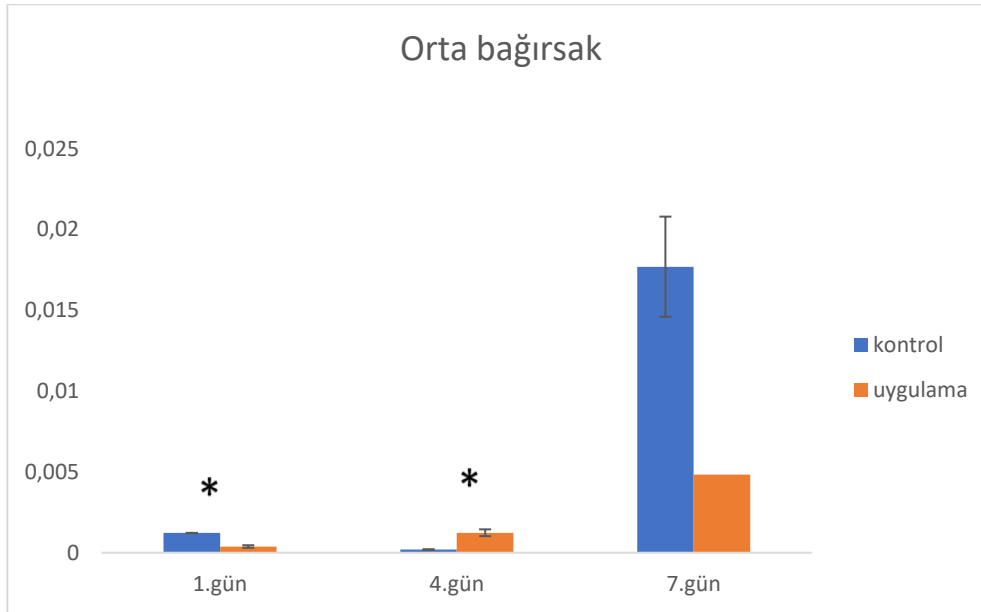
Gruplar	Delta CT
KOb-1	0,00122
KH-1	0,01418
KY-1	0,00165
KT-1	0,00076
KOv-1	0,00099
SOb-1	0,00038
SH-1	0,00125
SY-1	0,01152
ST-1	0,00014
SOv-1	0,00010
KOb-4	0,00019
KH-4	0,03602
KY-4	0,00137
KT-4	0,00949
KOv-4	0,00453
SOb-4	0,00124
SH-4	0,00503
SY-4	0,00882
ST-4	0,01669
SOv-4	0,02739
KOb-7	0,01770
KH-7	0,00064
KY-7	0,00402
KT-7	0,00082
KOv-7	1,30586
SOb-7	0,00484
SH-7	0,00059
SY-7	0,01003
ST-7	0,00118
SOv-7	0,02120

Real-time PCR sonuçlarına bakıldığında ipek böceğinin farklı gün ve farklı dokuların ekspresyon seviyeleri hepsinde değişiktir. Normal beslenen kontrol grubu ile sialik asit uygulaması yapıldıktan sonra ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. Sialik asit uygulaması yapılan dokular arasında ekspresyon seviyesi en yüksek yağ dokusu de görülmüştür. Hemosit dokusuna uygulamada kontrol ve uygulama arasında 1. ve 4. günlerinde farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlanmıştır ama 7. gündeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamsızdır (Şekil 4.7). Orta bağırsak dokusunda kontrol ve uygulama için 1. ve 4. günlerdeki farklılıklar anlamlı bulunmuşken 7. gündeki farklılıklar anlamsız bulunmuştur (Şekil 4.8). İpek böceğinin yağ dokusuna bakıldığında yine 1. ve 4. günlerde

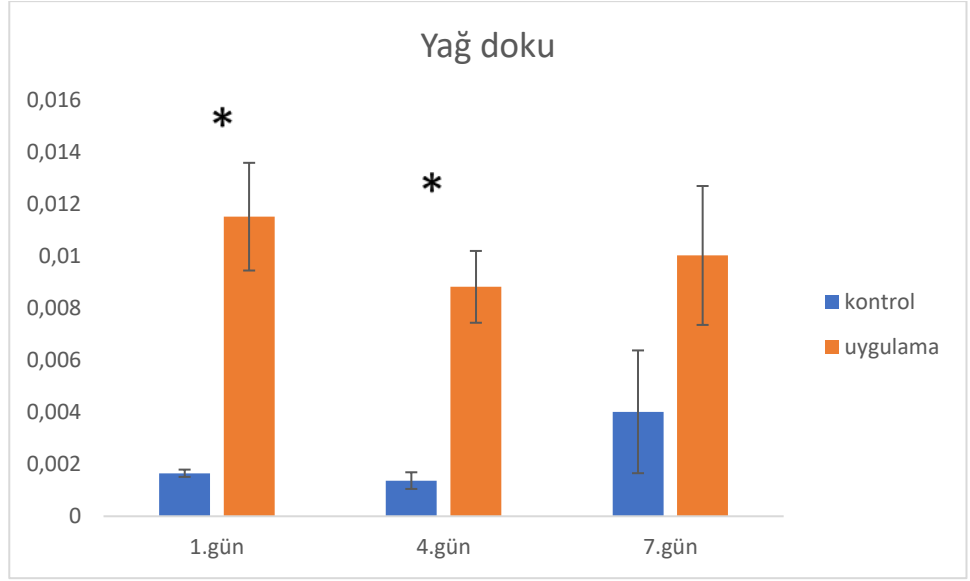
anamlı bir farklılık ortaya çıkmıştır (Şekil 4.9). Testis dokusunda yapılan uygulamada sadece 1. günde kontrol ile uygulama arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (Şekil 4.10). Ovaryum dokusunda ise 3 günde de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür (Şekil 4.11). Ekspresyon seviyelerinde farklılıklar olsa da sialik asit verilen grupların dokularının hepsinde gen ekspresyon aktivitesi gözlemlenmiştir.



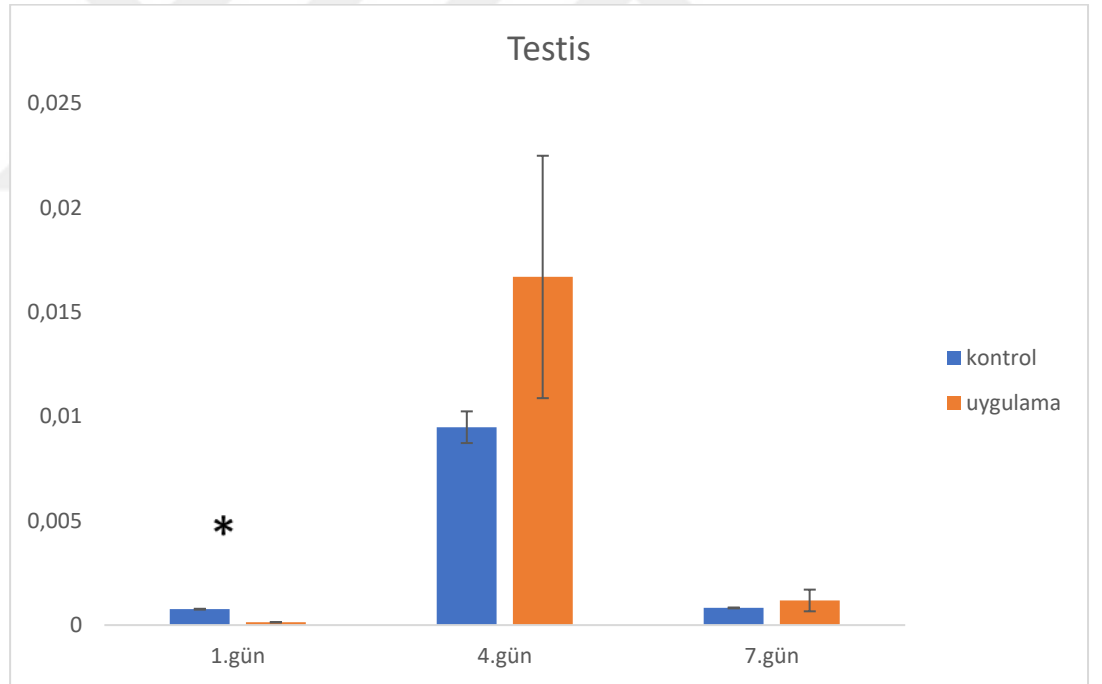
Şekil 4.7. Hemositlerde kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması (*; $p<0,05$).



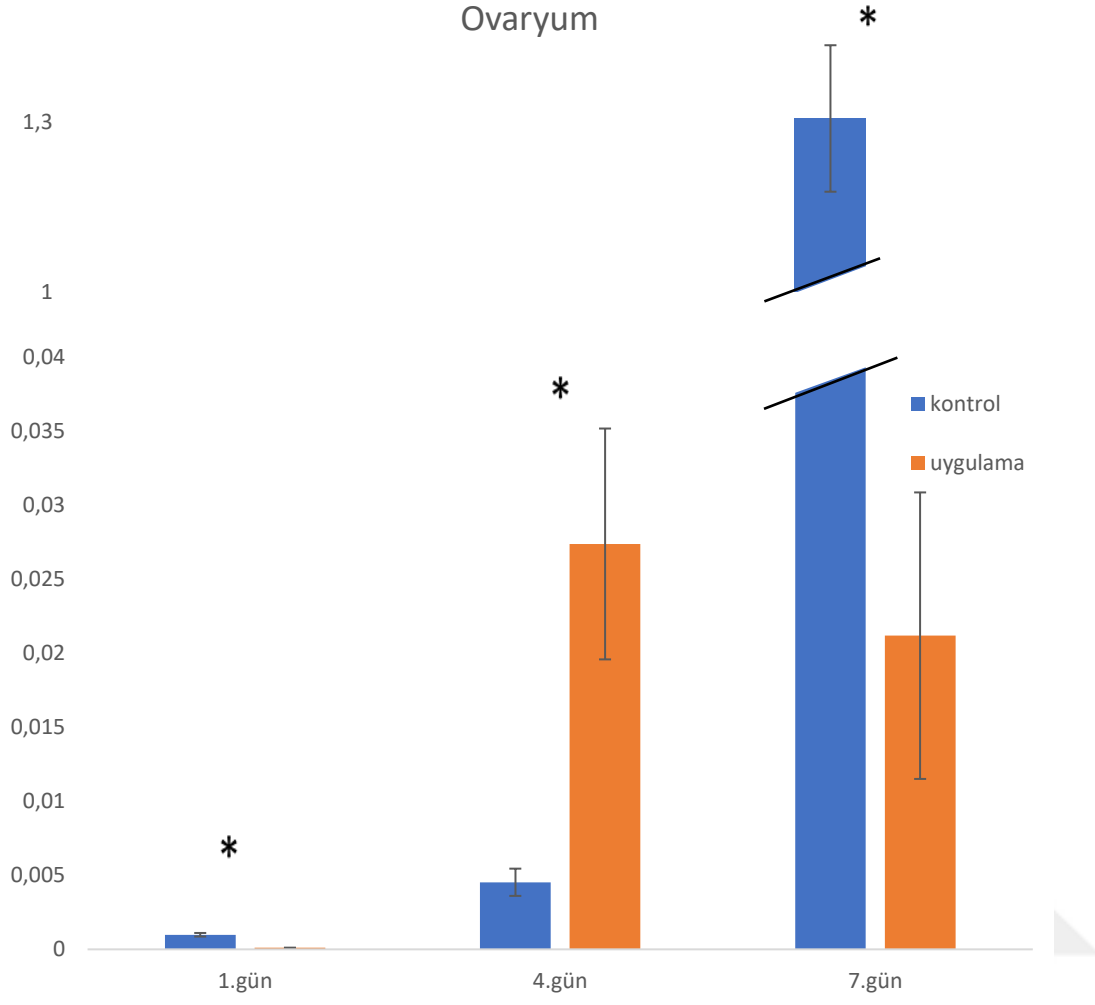
Şekil 4.8. Orta bağırsakta kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması (*; $p<0,05$).



Şekil 4.9. Yağ dokuda kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması (*; $p < 0,05$).



Şekil 4.10. Testislerde kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması (*; $p < 0,05$).



Şekil 4.11. Ovaryumlarda kontrol ve uygulamalı grupların sialiltransferaz gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması (*; $p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Sialik asit varlığı ve fonksiyonları ile ilgili Deuterostom (omurgalılar, tulumlular, derisi dikenliler)'da çok fazla araştırma olmasına rağmen Protostom (halkalı solucanlar, eklem bacaklılar, yumuşakçalar)'da oldukça az bilgi bulunmaktadır. Geçmişte yapılan bazı çalışmalarda hiçbir veriye ulaşılamazken az da olsa birkaç çalışmada böceklerde sialik asit varlığı ve glikokonjugatlarda sialilasyon gerçekleştiği belirlenmiştir (Koles *et al.*, 2004).

Karmaşık organizmaların evrimi, başlangıçtaki nispeten küçük bir atasal gen dizisinin ardışık kopyaları ile gen ailelerinin türetilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Sialik asit kalıntıları esas olarak Deuterostom soyunda saptanmasına rağmen, sialiltransferaz enzimatik aktiviteleri yalnızca kemikli balıklarda, amfibilerde, kuşlarda, memelilerde ve bazı böcek türlerinde de belirlenmiştir. Bitkilerde ve Protostomlarda sialilasyon ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Bilinen tüm hayvan sialiltransferazları, ortak bir atadan gelen genin ardışık kopyaları ve ardından farklı yollarla evrimleştikleri düşünülen dört sialilmotife sahiptir (Halduin-Lepers *et al.*, 2005).

Nematodların (*Caenorhabditis elegans*) genomlarında Neu5Ac ve sialiltransferaz benzeri diziler bulunmamış, bu da hayvan sialiltransferaz serisinin ilk öncü geninin böceklerden gelen ST6Gal olabileceği ve diğer omurgasızlarda başka hiçbir ST6Gal geninin bulunmadığını düşündürmüştür (Halduin-Lepers *et al.*, 2005). Metazoada sialiltransferaz süper ailesi evrimsel olarak atasaldır. Bu görüşün sebebi ise *Oscarella carmela* (balçık süngeri)'da eşsiz α 2-6 sialiltransferaz dizisi bulunmuştur (Petit *et al.*, 2010; Petit *et al.*, 2013). Benzer şekilde, ST6GalNAc ailesinin ilk öncü geni, *Strongylocentrotus purpuratus* (mor deniz kestanesi)'ta bulunmuştur ve diğer omurgasızlarda başka bir ST6GalNAc geni belirlenememiştir. ST3Gal ailesinin ilk öncü geni *Ciona*'da bulunmuş ama diğer omurgasızlarda başka hiçbir ST3Gal geni bulunamamıştır. ST8Sia familyasının ilk öncü geni *Branchiostoma floridae* (amphioksus)'de bulunmuş ve diğer omurgasızlarda ST8Sia familyasına ait başka bir gen belirtilmemiştir (Halduin-Lepers *et al.*, 2005).

Evrimsel süreç açısından sialilmotiflere sahip hayvanlardan gelen sialiltransferazlar ve sialilmotif içermeyen bakteri sialiltransferazları olmak üzere iki tip sialiltransferaz vardır. Tanımlanan tüm hayvan sialiltransferazları sialilmotiflere sahip olduğu için en atasal hayvan sialiltransferazında da bulunması gerekir. *C. elegans*'ın dahil olduğu nematodların başka üyelerinde

sialik asit ve sialiltransferazlara rastlanmamıştır. Bu da hayvan sialiltransferaz ailesinin en uzak atasal genin nematodlardan böceklere evrimsel süreçte ortaya çıkması anlamına gelmektedir. *Strongylocentrotus purpuratus*'ta ST3Gal, ST6GalNAc ve ST8Sia aileleri ile ilişkili genler bulunmuştur. Bu sialiltransferaz genlerinde çeşitliliğin kanıtıdır. Evrimleşmeyle birlikte bu genler yok olmuş ve memelilerde bulunmamaktadır (Takashima, 2008).

Bazı böcek genomlarında ST6Gal ailesi ile ilişkili bir sialiltransferaz geni tanımlanmıştır. Bu gen omurgalı ST6Gal alt ailelerine ait değildir. ST6GalI/II olarak tanımlanan Protostomların sialiltransferazları, omurgalı ST6Gal I ve ST6Gal II'nin ortak atasına ortologtur (Halduin-Lepers, 2010). ST6GalI/II geni için artopodalardan sonra gelen evrimsel adımlarda Cnidaria, Lophotrochozoa (yumuşakçalar ve annelidler), Hymenopterlerden *Apis mellifera* ve *Nasonia vitripennis*, Nematodlardan *C. elegans*, deniz kestanesi *S. purpuratus* ve tuniklerden *C. intestinalis*'ta bu genin yok olduğu bildirilmiştir (Petit *et al.*, 2010).

Sialiltransferazlar ST6Gal I-II, ST6GalNAc I-VI, ST3Gal I-VI ve ST8Sia I-VI olmak üzere dört aileye ayrılır. Her bir sialiltransferaz dizisinde ortak sialilmotifler bulunmaktadır (Lehmann *et al.*, 2008). Bilinen tüm hayvan sialiltransferazları ortak bir atadan gelen genden ardaşık duplikasyonlar ve divergent yolla evrimleşmiştir (Oriol *et al.*, 1999, Halduin-Lepers *et al.*, 2005). Tüm hayvan sialiltransferaz enzimleri sialilmotiflerden karakterize olduğuna göre en atasal sialiltransferaz da bu motifleri içermelidir.

Sialiltransferazlarda yer alan korunmuş bölgeler yani sialilmotifler, farklı hayvan türlerinde meydana gelen evrimsel olaylar ve işlevsel değişiklikler hakkında önemli ipuçları vermektedir (Petit *et al.*, 2010). Böcek genomlarında bulunan sialiltransferaz amino asit dizileriyle omurgalı sialiltransferaz amino asit dizileri arasında sialilmotiflerde benzerlik bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmada biyoinformatik yöntemlerden yararlanarak böcek dizilerinde sialilmotif olup olmadığına bakılmıştır.

ST6Gal ailesi ile ST6GalNAc III-VI alt ailesi ortak atadan gelmekte ama bağımsız evrimleşmişlerdir. ST8Sia alt aileleri ile ST3Gal III-VI alt ailesi intronlar tarafından sialilmotif L için korunmuş kodlama dizisi paylaşmaktadır (Takashima, 2008). Dört sialiltransferaz ailesi de hem omurgalılar hem de omurgasızlarda tespit edilmiştir. Cephalochordatlarda tanımlanmış sialiltransferaz genleri birkaç omurgalı sialiltransferaz alt ailesinin son ortak atalarına ortologtur

(Abi-Rached *et al.*, 2002; Guérardel *et al.*, 2012). Sialik asit ve sialiltransferaz benzeri diziler Nematod genomunda bulunamamıştır. Bu da ST6Gal sialiltransferaz için ilk öncü genlerin böceklerden geldiğini göstermektedir (Halduin-Lepers *et al.*, 2005).

Tüm sialiltransferaz aileleri arasındaki evrimsel ilişkiler henüz belirlenmemiş olsa da st3gal ve st6gal gen aileleri, Metazoan evriminde büyük rolü olan hayvanlarda tanımlanan en eski sialiltransferaz ailelerini temsil etmektedirler (Petit *et al.*, 2010, Petit *et al.*, 2015). Çalışmamızda Artropoda grubunda yer alan böceklerdeki sialiltransferazlar incelenmiştir. Bulunan sialiltransferazlar sayesinde evrimsel açıdan bu genlerin omurgasızlar sınıfında yer alan başka canlılarda olabileceği belirlenmiştir.

Omurgasız sialiltransferaz genleri omurgalı sialiltransferaz alt ailelerinin ortak atasına ortologtur ve buna göre adlandırılmaktadır. Buna örnek olarak *D. melanogaster* st6galII/II geni ve *C. intestinalis* st3galII/II geni verilebilmektedir (Teppa *et al.*, 2016). *Oscarella carmella*'da mRNA tanımlanması en eski metazoanlarda atalardan kalma bir st6galII/II geni olduğunu göstermektedir (Petit *et al.*, 2010). Bu gen de omurgalıdakine ortologtur. Bazı taksonlarda bu genin yok olduğu görülmektedir. St6gal geni birçok böcek türünde tanımlanmıştır. Bu çalışmada *B. mori*'de st6gal gen ekspresyon aktivitesi belirlenmiştir. Diğer birçok böcek türünde olduğu gibi *B. mori*'de de ST6Gal sialiltransferazın olduğunu ama genomunu incelediğimizde diğer sialiltransferazların bulunmadığı tespit edilmiştir. Diğer böcek türlerinin protein dizilerinde ST6Gal ailesi sialilmotifleri web tabanlı motif programlarında aratıldığında böceklerde ST6Gal sialiltransferaz enziminin bulunduğunu gözlemlenmiştir.

ST3gal-benzeri diziler omurgasızlar üzerinde çok az çalışma bulunmaktadır. ST3Gal ailesi için ilk öncü genler *Ciona*'da bulunmuştur. İncelenen böcek genomları sonucu ST3Gal ailesi için ortak atasal öncü genlerin böceklere kadar uzandığı öngörülmektedir. ST3GalII/II cDNA'sı *C. intestinalis* ve *Branchiostoma belcheri*'den kopyalanmıştır. *C. intestinalis*'de bulunan ST-benzeri gen memeli ST3Gal I ve ST3Gal II'ye çok benzerlik gösterir ve ST3Gal alt ailesi için ortak ataya ortologtur (Lehmann, 2008). Bu da tuniklerde ve Cephalochordata (kafatasızlar)'da ST3Gal ailesinin bulunduğunu gösterir (Harduin-Lepers *et al.*, 2005; Petit *et al.*, 2015). St3gal geni ile bağlantılı dizilerde tüm canlılarda sialilmotif kısımları korunmuştur. Buradan yola çıkarak omurgalı ST3Gal sialiltransferaz ailesi protein dizilerinden oluşturulan sialilmotifler böcek

proteinleriyle karşılaştırıldığında sadece *G. mellonella* türünde ST3Gal IV benzeri proteinin olabileceği belirlenmiştir. ST3Gal III/IV/V ve VI aynı alt aileye ait olduğu için bulunan bu dizinin alt ailesine ortolog olabileceği ileri sürülebilmektedir. Burada korunmuş 4 motiften sadece motif L'nin olduğu görülmüştür.

Halduin-Lepers'in (2005) çalışmasında bilinen hayvan sialiltransferazlarının hepsinin 4 sialilmotifi de içerdiği ve bunların ortak atadan duplikasyon ile evrimleştikleri bildirilmiştir. Aynı zamanda bitkilerde yapılan araştırmalarda *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa*'da sialiltransferaz aktivitesi bulunmuşken, *B. mori*'ye benzer şekilde tüm motifler bulunmayıp sadece sialilmotif L ve S belirlenmiştir. Protein dizileri bilinen böcekler incelendiğinde bazı türlerde ST6Gal sialiltransferaz enzimi görülmüştür ama *Leptinotarsa decemlineata*'da ST6Gal II dizisinde sadece sialilmotif L, *Tribolium castaneum*'da ise ST6Gal I izoform X1 dizisinde sialilmotif L, VS ve III bulunmuştur.

ST6GalNAc sialiltransferaz ailesi, α 2-6 bağlarını kullanarak sialik asitleri glikokonjugantların N-asetilgalaktozamin uçlarına bağlar. Amino asit dizi benzerlikleri, substrat seçicilikleri ve gen yapılarına göre 2 alt aileye ayrılırlar. ST6GalNAc I ve II bir alt ailede, ST6GalNAc III, IV, V ve VI diğer alt ailede yer alırlar. ST6GalNAc I ve II'nin genleri çok benzerdir. ST6GalNAc III, IV, V ve VI amino asit dizileri benzerdir ama gen ekspresyonları farklıdır. Farede ST6GalNAc III, IV ve VI birkaç dokuda, ST6GalNAc V ise sadece beyinde gözlemlenmiştir (Takashima, 2008). Evrimsel açıdan incelendiğinde öncü genlerinin *S. purpuratus*'ta bulunduğu belirtilmiştir (Halduin-Lepers *et al.*, 2005). Yaptığımız çalışmada Artropodlarda yer alan *Manduca sexta* genomunda ST6GalNAc I benzeri bir dizi bulunmuştur. Bu da ST6GalNAc sialiltransferaz enziminin Artropodlarda da olabileceğini ve omurgasızlar sınıfında bulunan başka canlılarda da ST6GalNAc olabileceğini göstermektedir. Bulduğumuz dizinin ise ST6GalNAc I/II alt ailesine ortolog bir gen olabileceğini düşünülmektedir.

ST8Sia ailesi Neu5Ac şekerlerini α 2,8 bağlarıyla glikoprotein ve glikolipidlere transferini sağlamaktadır. Halduin-Lepers ve arkadaşlarının (2008), çalışmalarında ST8Sia sialiltransferaz ailesi için omurgasızlardan *S. purpuratus* ve *B. floridae*'de divergent genler olduğunu belirlemiştir. Tandem duplikasyonu sonucu bu atasal genin omurgalılarda yok olduğunu göstermişlerdir. Balıklardan insanlara ST8Sia III ve ST8Sia V aynı kromozomda yer almaktadır (insanda kromozom 18q). Tandem duplikasyonunun kemikli balıklara kadar uzandığının ve

ortak antik tandem duplikasyonundan orijinlendiğinin göstergesidir. ST8Sia genleri bu zamana kadar *C. elegans* ve böceklerde tanımlanmamıştır. Çenesiz balıklarda ST8Sia I ve V alt ailelerine ait dizilerin bulunması bu genlerin 596 ve 563 milyon yıl önce ortaya çıktığını göstermektedir (Venuto *et al.*, 2020). ST8Sia ailesi böcek türlerinde incelenmemiştir, çünkü ST8Sia üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. İleriki çalışmalarda bu konu üzerine de çalışılacaktır.

Böceklerde yaptığımız çalışmada sadece iki türde sialiltransferaz benzeri dizi bulunmuştur. *Manduca sexta*'da ST6GalNAc I ve *Galleria mellonella*'da ST3Gal IV belirlenmiştir. Diğer sialiltransferazlarla ilgili başka hiçbir veriye ulaşılamamıştır. Buradan hareketle ST6GalNAc alt ailelerinden biri olan ST6GalNAc III, IV, V ve VI ailelerine ve ST3Gal I/II alt ailesine ortolog bir böcek geni bulunmamaktadır.

Önceki sialiltransferaz evrimsel çalışmalarında omurgasızlarda bu genlerin olduğu bildirilmiş ama böceklerde belirlenememiştir. Bu çalışmamızda bazı sialiltransferaz enzimlerinin böceklerde de olabileceği ilk defa gösterilmiştir. Yine de 20 sialiltransferaz ailesinden sadece iki tanesi bulunabilmiştir. Diğer sialiltransferaz ulaşılamamıştır. Böceklerde ST6Gal sialiltransferaz ailesinin bulunduğu bildirilmiştir. ST6Gal sialiltransferazların bulunduğu böceklerde genellikle başka sialiltransferaza ait motifler bulunamamıştır. Sadece *Manduca sexta* ve *Galleria mellonella*'da farklı sialiltransferazlara ulaşılmıştır. Sialiltransferazlar türe ve dokuya özgüdür. Bu sebeple bakılan böceklerde başka sialiltransferaza ulaşılamamış olunabilir. Bu bilgiler ışığında mevcut çalışma veri tabanlarından alınan böcek genomlarında gerçekleştirildiği için ulaşılan bilginin yetersiz olma olasılığı yüksektir. Eğer ulaşılabilen bilgiler tam ise böcek genomlarında bazı sialiltransferazlar bulunurken bazılarının bulunmadığı söylenebilmektedir.

Memeli hücrelerinde gerçekleşen glikozilasyon modifikasyonu aynı zamanda böceklerde de gerçekleşmektedir. Memeli N-glikozilasyon yolu ile böceğinki arasındaki fark; böceklerde Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc oluşumunun gerçekleşmemesidir. Bunun yerine böceklerde, bir paucimannoz tipi N-glikan üreten Golgi ile ilişkili bir N-asetilglukosaminidaz tarafından GlcNAc ayrılır. Böcek hücrelerinde N-glikozilasyon yolu yanında N-asetilglukozamin, galaktozil, sialil kısımlar içeren glikoproteinlerin de yolları vardır. Birçok Lepidopteran hücresinde O-glikozilasyon yolları GalNAc α -O-Ser/Thr içeren glikoproteinler üretmektedirler (Marchal *et al.*, 2001).

Sialik asitleri glikonjugatlara ekleyen enzim, sialiltransferazlar, böceklerde çalışılan yeni bir konudur. Böcek hücre hattı *Spodoptera frugiperda*'da (Sf9) genetik olarak tasarlanmış enzimlere dayanan araştırmaların çoğu, sialilasyon sürecinin çalışılmasını ve dolayısıyla böceklerde sialillenmiş ürünlerin üretilmesini sağlamıştır. Böcek bazlı ekspresyon sistemleri tarafından üretilen rekombinant glikoproteinlere bağlı başlıca işlenmiş N-glikanlar Man3GlcNAc2'dir. Bu glikanın yapısı, tipik olarak rekombinant glikoproteinler üretmek için kullanılan Sf9 gibi böcek hücre dizilerindeki baskın N-glikozilasyon yolunu yansıtır. Bu hücre dizilerinden olan Sf β 4GalT/ST6 ve Tn5 β 4GalT/ST6 (Hollister *et al.*, 2003; Tomiya, 2009), memeli β 1,4-galaktosiltransferaz ve α 2,6-sialiltransferaz genlerini yapısal olarak eksprese edecek şekilde tasarlanmıştır. CMP-sialik asit yokluğunda glikokonjugantları sialillendiği gözlemlenmiştir. Bu hücreler tarafından üretilen bir rekombinant glikoproteinden izole edilen N-glikanların yapısal karakterizasyonu trimannosilin α 1-3 kolunun N-asetilglukozamin, galaktoz ve sialik asit eklenmesiyle uzadığı ortaya çıkarılmıştır (Hollister *et al.*, 2003).

Sialilasyon ve sialiltransferazlar *B. mori* (Bm), *D. melanogaster* (Dm), *A. aegypti*, *G. mellonella*, *P. spumarius* larvalarının Malpigi tüplerinin vakuollerinde (Malykh *et al.*, 1999), *Bactrocera dorsalis* (Ghosh, 2018) vb. birçok böcek türünde tanımlanmıştır. Sialik asitlerin böceklerde bulunması filogenetik ve evrimsel açıdan önemlidir. *Drosophila*'nın genomik bilgilerinin tamamen bulunması, böcek glikozilasyon yollarının biyokimyasal bileşenlerini aydınlatmak için *Drosophila*'yı güçlü bir model sistem haline getirmiştir. *Drosophila* genom veri tabanının aramaları, Neu5Ac fosfat sentaz, CMP-Neu5Ac sentaz, CMP-Neu5Ac/CMP antiporter ve sialiltransferaz dahil olmak üzere sialik asit biyosentetik yolunun omurgalı enzimlerinin varsayılan ortologlarını kodlayan birkaç genin varlığını ortaya çıkarılmıştır (Koles *et al.* 2004). Kim ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada *Drosophila*'nın, insan ortoloğuyla önemli homolojiye sahip fonksiyonel bir Neu5Ac fosfat sentazına sahip olduğunu doğrulamışlardır. Bu durum, *Drosophila*'da CMP-sialik asit biyosentezi için omurgalılarla benzerlik olduğunu düşündürmektedir. Koles ve arkadaşları (2004) tarafından *D. melanogaster*'de omurgalı tip sialiltransferaz geni tanımlanmıştır. Bu genin omurgalılarıdaki ST6Gal ailesi ile ilişkili olduğu bulunmuş ve merkezi sinir sistemi ile doğal gelişimde etkili olduğu belirtilmiştir. *Aedes aegypti*'de ise sialiltransferazlar dang enfeksiyonuna (kırık kemik humması) aracılık etme ve bulaşıcılığı üzerine rol oynamaktadır (Malykh *et al.*, 1999).

Kajiura ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada *B. mori*'deki omurgalı ST6Gal I benzeri Golgide yer alan bir sialiltransferaz tanımlamışlardır. İnsan α 2,6-sialiltransferazından farklı olarak BmST, tam aktivitesi için translayon sonrası modifikasyonu, özellikle N-glikozilasyonu gerektirmiştir. *Drosophila*'nın α 2,6- sialiltransferaz (DmST) genom dizisi *B. mori* genom dizisiyle karşılaştırıldığında çok az bir benzerlik bulunmuştur. *Drosophila* α 2,6-sialiltransferaz, insan α 2,6- sialiltransferaz ve *B. mori* α 2,6- sialiltransferaz (BmST) transkriptleri karşılaştırıldıklarında, çok az benzerlikler belirlenmişken, korunmuş bölgeler olan sialilmotiflerde yüksek oranda benzerlik görülmüştür (Kajiura *et al.*, 2015).

Böcekler ve kültüre edilmiş hücreleri, esas olarak, 2-9 mannoz şekeri içeren ve kısmen α 1-3 ve α 1-6 bağlarıyla fukozile edilmiş, yüksek mannoz tipi ve paucimannoz tipi N-glikanlar üretmektedir (Kajiura *et al.*, 2015; Miyazaki *et al.*, 2019). Böcek hücreleri, N-glikozilasyon dahil olmak üzere uygun translayon sonrası modifikasyonların yüksek üretkenliği ve kapasitesi nedeniyle rekombinant proteinler üretmek için yaygın olarak kullanılır, ancak böcek ve memeli hücreleri N-glikanları arasındaki yapısal farklılıklar, rekombinant glikoproteinlerin biyolojik aktivitesini etkilemektedir (Miyazaki *et al.*, 2019). *D. melanogaster* embriyolarında sialillenmiş N-glikanlar bulunmuştur (Koles *et al.* 2007). Bu zamana kadar böceklerde β -1,2-N-asetilgalaktozamintransferaz II, β -1,4-N-asetilgalaktozamintransferaz ve sialiltransferazlar tanımlanmıştır. *B. mori*'de varsayılan β -1,4-N-asetilgalaktozamintransferazın (BmGalNacT) insandaki β 4GalT I ve böceklerdeki β -1,4-N-asetilgalaktozamintransferaza benzerliği ile varsayılan α -2,6 sialiltransferazın (BmST) ise insandaki ST6Gal I ve *D. melanogaster*'deki DmST ile motif kısımlarındaki benzerliği göstermiştir (Kajiura *et al.*, 2015; Miyazaki *et al.*, 2019).

Kajiura *et al.* (2015), çalışmalarında BmST genini tanımlamış ve yöntem olarak 5. instar dokularında Real-time PCR analizi yapmışlardır. Bu çalışmada direkt olarak *B. mori* dokularındaki potansiyel sialiltransferaz gen ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Ekspresyon seviyelerinin çalıştıkları gün ve dokularda farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise *B. mori*'ye sialik asit verilerek sialiltransferaz geni ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Kajiura ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde belirlenilen gün ve dokularda farklı ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir.

Sialiltransferaz aktivitesi memelilerde ve bitkilerde karakterize edilmiş, ancak böceklerde ilk kez *D. melanogaster*'de tanımlanmıştır (Koles *et al.*, 2004). Sialillenmiş N-glikanlar *Drosophila* embriyolarında ve gelişimin her evresine ait sinir sistemlerinde tespit edilmiştir. Sialillenmiş glikanlar nöral düzenlemede rol oynar. Cime-Castillo ve arkadaşları (2015), *A. aegypti* dokularında sialik asit ve sialiltransferazları belirlemişlerdir. Sialioglikokonjugatların sivrisinek dokuları üzerinde, dang virüsünün viral bulaşmasında rol oynadığı belirtilmiştir.

B. mori'de belirlenen gen ekspresyon seviyeleri kontrol ve uygulama gruplarında her dokuda farklılık göstermektedir. Bu nedenle sialik asit verilince gen ekspresyonu artmakta veya azalmakta diye yorum yapılamamaktadır. Sadece yağ dokuda uygulama sonrası kesin bir artış görülmüştür ve en yüksek ekspresyon seviyelerinin bu dokuda olduğu tespit edilmiştir. Yağ dokusu, bütün böcek türlerinde olduğu gibi *B. mori* için de çok önemli bir yapıdır. Bağışıklık, endokrin ve detoksifikasyon süreçlerinde temel rol oynar (Turgay-İzzetoğlu and Gülmez, 2019; Zülfikaroğlu *et al.*, 2022). Bu bilgilere göre sialiltransferazın *B. mori*'de diğer dokulardan daha yüksek ifade edilmesi, enzimin yağ dokusu fonksiyonlarında önemli bir yeri olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sialiltransferazları evrimsel açıdan incelerken protein yapılarından yararlanılmıştır. Amino asit dizilerinde yer alan korunmuş bölgeler bu enzimin en atasal genlerinde bile bulunduğunu göstermektedir. Bu sebeple de böcek genomlarına bakıldığında da yine bu motiflerin yer alması gerekmektedir. Yapılan biyoinformatik araştırmalar sonucunda sadece *Manduca sexta* ve *Galleria mellonella* türlerinde bu motifler bulunabilmiştir. Yine de bunun olabilesi gelecek çalışmalar ve evrimsel açıdan çok önemlidir. *M. sexta*'da omurgalılarıdaki ST6GalNAc I ile benzerlik göstermiştir. Evrimsel açıdan bakıldığında bu enzimin Nematodlar ile Artropodlar arasında ortolog yapısı oluşturduğu düşünülebilir. *G. mellonella*'da ise omurgalılarıdaki ST3Gal IV ile benzerlik göstermektedir. ST3Gal III/IV/V/VI aynı alt ailede yer alırlar. *G. mellonella*'da bulunan bu dizinin, omurgalılarıdaki ST3Gal III-VI enzimlerine ortolog gen olduğunu belirtmektedir.

Bu bilgiler omurgasızlarda sialiltransferazlar üzerine çalışmalara devam edilmesi için yol gösterici özellik taşımaktadır. Genomu belirlenen böceklerde çalışıldıkça sialiltransferaz enzimi için yeni diziler ortaya çıkacaktır. Bu da evrimsel açıdan da bu konu üzerine yeni çalışmalar yapılmasının göstergesidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abi-Rached, L., Gilles, A., Shiina, T., Pontarotti, P., Inoko, H., 2002, Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes, *Nat Genet*, 31: 100–105 p.

Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., Li, W. W., 2006, MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, *Nucleic Acids Research*, 34: 369-373 p.

Bayro, İ. and Deveci, R., 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın gelişen testislerinde sialik asidin rolü, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Projesi (yayımlanmamış).

Brooks, S. A., Dwek, M. V., and Schumacher, U., 2002, Functional and Molecular Glycobiology, Oxford, GBR: BIOS Scientific Publishers Ltd.

Buschiazzo, A., and Alzari, P. M., 2008, Structural Insights into Sialic Acid Enzymology, *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, France, 565-572 p.

Cime-Castillo, J., Delannoy, P., Mendoza-Hernández, G., Monroy-Martínez, V., Harduin-Lepers, A., Lanz-Mendoza, H., de la Cruz Hernández-Hernández, F., Zenteno, E., Cabello-Gutiérrez, C., and Ruiz-Ordaz, B. H., 2014, Sialic Acid Expression in the Mosquito *Aedes aegypti* and Its Possible Role in Dengue Virus-Vector Interactions, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, 2015, Mexico, 16 p.

Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., & Henrissat, B., 2003, An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases, *Journal of Molecular Biology*, 328(2): 307-317 p.

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

D'amico, P. and Jacobs J. R., 1995, Lectin histochemistry of the *Drosophila* embryo, *Tissue Cell*, 27: 23-30 p.

Datta, A. K., 2009, Comparative Sequence Analysis in the Sialyltransferase Protein Family: Analysis of Motifs, *Current Drug Targets*, 10, USA, 483-498 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Deveci R., 1997, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın gelişen testislerinde testis duvarı, folikülleri, kan-germ hücre bariyerlerinin ince yapısı ve glikokonjugatların histokimyasal, sitokimyasal, biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi, Doktora tezi, Ege Üniv. Fen Bilimleri Enst. Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova –İZMİR (yayımlanmamış).

Drickamer, K., 1993, A Conserved Disulphide Bond in Sialyltransferases, Letters to the Glyco-Forum, USA.

Dutkowski, A. B., 1977, The ultrastructure and ultracytochemistry of the basement membrane of the *Galleria mellonella* fat body, *Cell Tissue Res*, 176(3): 417-29 p.

Dybowska, H. E. and Dutkowski, A. B., 1977, Ruthenium red staining of the neural lamella of the brain of *Galleria mellonella*, *Cell Tissue Res*, 176(2): 275-84 p.

Ellies, L. G., Sperandio, M., Underhill, G. H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J. J., and Marth, J. D., 2002, Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(10): 3618-3625 p.

Eratak B. ve Karaçalı S., 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da metamorfoz geçiren corpus cardiacum corpus allatum (CC-CA) kompleksinde sialik asidin rolü, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Projesi (yayımlanmamış).

Foster, J., D., Getchell, M. L., and Getchell, T., V., 1992, Ultrastructural localization of sialylated glycoconjugates in cells of the salamander olfactory mucosa using lectin cytochemistry, *Cell Tissue Res*, 267(1): 113-24 p.

Geremia R., A., Harduin-Lepers A., Delannoy P., 1997, Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action, *Glycobiology*, 7(2): v–vii p.

Ghosh, S., 2018, Sialylation and Sialyltransferase in Insects, *Glycoconjugate Journal*, 35: 433-441 p. (Mini- Review)

Grant, C. E., Bailey, T. L. and Noble, W., S., 2011, FIMO: scanning for occurrences of a given motif, *Bioinformatics*, 27(7): 1017-1018 p.

Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T., and Zettlmeissl, G., 1990, Complete cDNA, Sequence Encoding Human β -Galactoside α -2,6-Sialyltransferase, *Nucleic Acids Research*, 18, Marburg, 667 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Guérardel, Y., Chang, L. Y., Fujita, A., Coddeville, B., Maes, E., Sato, C., ... & Kitajima, K., 2012, Sialome analysis of the cephalochordate *Branchiostoma belcheri*, a key organism for vertebrate evolution, *Glycobiology*, 22(4): 479-491 p.

Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P., 2001, The human sialyltransferase family, *Biochimie*, 83(8): 727-737 p.

Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P., and Oriol, R., 2005, The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach, *Glycobiology*, 15, France, 805-817 p.

Harduin-Lepers, A., Petit, D., Mollicone, R., Delannoy, P., Petit, J. M., & Oriol, R., 2008, Evolutionary history of the α 2, 8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes, *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 1-18 p.

Harduin-Leper, A., 2010, Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genome, *Glycobiology Insights*, 2, France, 29-61 p. (Review)

Hollister, J., Conradt, H., & Jarvis, D. L., 2003, Evidence for a sialic acid salvaging pathway in lepidopteran insect cells, *Glycobiology*, 13(6), 487-495 p.

İpekböcekçiliği ve Dutçuluk Seminer Notları, 1985, İpekböceği Araştırma Enstitüsü Yayınları, 82, Bursa.

Jeanneau, C., Chazalet, V., Augé, C., Soumpasis, D. M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., and Breton, C., 2004, Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of N-glycosylation and a novel conserved sialylmotif, *Journal of Biological Chemistry*, 279(14): 13461-13468 p.

Kajiura, H., Hamaguchi, Y., Mizushima, H., Misaki, R., & Fujiyama, K., 2015, Sialylation potentials of the silkworm, *Bombyx mori*; *B. mori* possesses an active α 2, 6-sialyltransferase, *Glycobiology*, 25(12): 1441-1453 p.

Karaçalı, S., Deveci, Ö., Deveci, R., Onat, T. and Gürcü, B., 1995a, Spectrophotometrical determination of sialic acid in several tissues of isolated and crowded *Locusta migratoria* (Orthoptera), *İstanbul Üniv Fen Fak Biyoloji Derg*, 58: 47-57 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Karaçalı, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü, B., 1995b, Spectrophotometrical determination of sialic acid in the tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *İstanbul Üniv Fen Fak Biyoloji Derg*, 58: 59-67 p.

Karaçalı, S., Kırmızıgül, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü, B., 1997, Presence of sialic acid in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Tissue and Cell*, 29: 315-321 p.

Karaçalı, S., Kırmızıgül, S. and Deveci, R., 1999, Sialic acids in developing testis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Invertebr Reprod Dev*, 35(3): 225-229 p.

Karaçalı, S., Deveci, R., Pehlivan, S. and Özcan, A., 2000, Adhesion of hemocytes to desialylated prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in larval stage, *Invertebr Reprod Dev*, 37(2): 167-170 p.

Karaçalı, S., Kırmızıgül, S., Deveci, R. and Deveci, Ö., 2003, Presence of sialic acid in the hemolymph of *Dociostaurus maroccanus* Thun. (Orthoptera: Acrididae), *Invertebr Reprod Dev*, 43(2): 91-94 p.

Kelm, S. and Schauer, R., 1997, Sialic acids in molecular and cellular interactions, *Int Rev Cytol*, 175: 137-240 p.

Kim, K., Lawrence, S. M., Park, J., Pitts, L., Vann, W. F., Betenbaugh, M. J., and Palter, K. B., 2002, Expression of a functional *Drosophila melanogaster* N acetylneuraminic acid (Neu5Ac) phosphate synthase gene: evidence for endogenous sialic acid biosynthetic ability in insects, *Glycobiology*, 12, USA, 73-83 p.

Koles, K., Irvine, K. D., and Panin, V. M., 2004, Functional Characterization of *Drosophila* Sialyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, 6, USA, 4346-4357 p.

Koles, K., Lim, J. M., Aoki, K., Porterfield, M., Tiemeyer, M., Wells, L., & Panin, V., 2007, Identification of N-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster*, *Glycobiology*, 17(12): 1388-1403 p.

Lehmann, F., Kelm, S., Dietz, F., von Itzstein, M., and Tiralongo, J., 2008, The evolution of galactose α 2, 3-sialyltransferase: Cionaintestinalis ST3GAL I/II and Takifugu rubripes ST3GAL II sialylate Gal β 1, 3GalNAc structures on glycoproteins but not glycolipids, *Glycoconjugate Journal*, 25(4): 323-334 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Livingston, B. D., & Paulson, J. C., 1993, Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family, *Journal of Biological Chemistry*, 268(16): 11504-11507 p.

Malykh, Y. N., Krisch, B., Gerardy-Schahn, R., Lapina, E. B., Shaw, L., & Schauer, R., 1999, The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*, *Glycoconjugate Journal*, 16(11): 731-739 p.

Marchal, I., Jarvis, D. L., Cacan, R., and Verbert, A., 2001, Glycoproteins from Insect Cells: Sialylated or Not?, *Biol. Chem.*, 382, USA, 151-159 p.

Miyazaki, T., Miyashita, R., Nakamura, S., Ikegaya, M., Kato, T., and Park, E., Y., 2019, Biochemical characterization and mutational analysis of silkworm *Bombyx mori* β -1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase and insight into the substrate specificity of β -1, 4-galactosyltransferase family enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 115: 103254.

Omura, S., 1967, Intduction to Silkworm Rearing, The Japan Silk Association, Inc., Tokyo.

Oriol, R., Mollicone, R., Cailleau, A., Balanzino, L., and Breton, C., 1999, Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria, *Glycobiology*, 9: 323–334 p.

Özkan, M. ve Karaçali, S., 2006, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da metamorfoz geçiren sinir sisteminde sialik asidin rolü, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Projesi (yayımlanmamış).

Parlak, O., 2001, İpekböceği Biyolojisi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 171, İzmir, Türkiye, 127 s.

Paulson, J. C., & Rademacher, C., 2009, Glycan terminator. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(11): 1121-1122 p.

Petit, D., Mir, A. M., Petit, J. M., Thisse, C., Delannoy, P., Oriol, R., ... & Harduin-Lepers, A., 2010, Molecular phylogeny and functional genomics of β -galactoside α 2, 6-sialyltransferases that explain ubiquitous expression of st6gal1 gene in amniotes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(49): 38399-38414 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Petit, D., Teppa, R. E., Petit, J. M., & Harduin-Lepers, A., 2013, A practical approach to reconstruct evolutionary history of animal sialyltransferases and gain insights into the sequence–function relationships of Golgi-glycosyltransferases, In *Glycosyltransferases*, 73-97 p., Humana Press, Totowa, NJ.

Petit, D., Teppa, E., Mir, A. M., Vicogne, D., Thisse, C., Thisse, B., ... and Harduin-Lepers, A., 2015, Integrative view of α 2, 3-sialyltransferases (ST3Gal) molecular and functional evolution in deuterostomes: significance of lineage-specific losses. *Molecular Biology and Evolution*, 32(4): 906-927 p.

Przelecka, A. and Dutkowski, A. B., 1973, The structure of the ovariole wall in *Galleria mellonella*, *Folia Histochem Cytochem (Krakow)*, 11(3): 269-73 p.

Roth, J., Kempf A., Reuter, G., Schauer, R. and Gehring, W. J., 1992, Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*, *Science*, 256 (5057): 673-5 p.

Schauer R., 2001, The occurrence and significance of sialic acids in insects, *Trends Glycosci Glyc*, 13: 507-17 p.

Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P., and Shaw L., 1995, Biochemistry and role of sialic acids, In: *Biology of Sialic acids*, Chapter 2, 7-67 p., Rosenberg A. (ed.), Plenum Press, New York.

Sigrist, C. J., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., ... and Xenarios, I., 2012, New and continuing developments at PROSITE, *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 344-347 p.

Takashima, S., Tsuji, S., and Tsujimoto, M., 2003, Comparison of the Enzymatic Properties of Mouse β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferases, ST6Gal I and II, *Journal of Biochemistry*, 134(2): 287–296 p.

Takashima, S., 2008, Characterization of Mouse Sialyltransferase Genes: Their Evolution and Diversity, *Biosci. Biotechno. Biochem.*, 72: 1155- 1167 p. (Review)

Tanner, M. E., 2005, The enzymes of sialic acid biosynthesis, *Bioorganic Chemistry*, 33(3): 216-228 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Teppa, R. E., Petit, D., Plechakova, O., Cogez, V., & Harduin-Lepers, A., 2016, Phylogenetic-derived insights into the evolution of sialylation in eukaryotes: Comprehensive analysis of vertebrate β -Galactoside α 2, 3/6-Sialyltransferases (ST3Gal and ST6Gal). *International journal of Molecular Sciences*, 17(8): 1286.

Tomiya, N., 2009, Humanization of recombinant glycoproteins expressed in insect cells, *Trends Glycosci Glyc*, 21: 71-86 p.

Turgay-İzzetoğlu, G., and Gülmez, M., 2019, Characterization of fat body cells at different developmental stages of *Culex pipiens*, *Acta histochemica*, 121(4): 460-471 p.

Venuto, M. T., Decloquement, M., Martorell Ribera, J., Noel, M., Rebl, A., Cogez, V., ... & Harduin-Lepers, A., 2020, Vertebrate Alpha2, 8-Sialyltransferases (ST8Sia): A Teleost Perspective, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2): 513.

Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H., & Paulson, J. C., 1987, Primary structure of beta-galactoside alpha 2, 6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH2-terminal signal anchor, *Journal of Biological Chemistry*, 262(36): 17735-17743 p.

Yokoi, K., Tsubota, T., Jouraku, A., Sezutsu, H., and Bono, H., 2021, Reference transcriptome data in silkworm *Bombyx mori*, *Insects*, 12(6): 519.

Zülfikaroğlu, T., Turgay-İzzetoğlu, G., Yikilmaz, M. S., & İzzetoğlu, S., 2022, Demonstrating the general structure and cell types of the fat body in *Blatta orientalis* (Oriental Cockroach), *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 51(1): 23-35 p.

<https://www.takshilalearning.com/how-many-stages-are-there-in-the-life-cycle-of-a-silkworm/> (Erişim tarihi: 10.12.2021).

TEŞEKKÜR

Bölümümüzün tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Ferah SAYIM'a ve Zooloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Dinçer AYAZ'a ve FYL-2021-23087 nolu projeye maddi desteği için EÜ. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatıma başlamadan başka bir bölümden gelmeme rağmen beni geri çevirmeyen, eksik olduğum yerlerde bana yardımcı olan, yüksek lisans eğitimim boyunca benden hiçbir yardımı esirgemeyen, her türlü desteği veren, bazen öğretmen bazen bir abla olarak yaklaşan, beni her zaman destekleyen ve bu iyiliklerine karşı ona her zaman minnettar kalacağım çok sevgili danışman hocam Doç. Dr. Gamze TURGAY İZZETOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Tez konum konusunda bana fikir veren hiçbir desteğini eksik etmeyen, her türlü olumsuzlukta bir şekilde çözüm üreten, fikirlerine çok saygı duyduğum ve beni yüksek enerjisiyle sürekli motive tutan sayın Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Benim her zaman yanımda olan, geleceğimle ilgili başka bir yöne yöneldiğimi söylediğimde asla karşı çıkmayan ve beni destekleyen, maddi ve manevi açıdan her zaman arkada olan, ne olursa olsun onların varlığıyla güven dolduğum çok sevdiğim aileme çok teşekkür ederim.

Tez aşamamda beni yönlendiren, yardımlarını esirgemeyen düşüncelerine çok saygı duyduğum sayın Doç. Dr. Gökhan KARAKÜLAH hocama teşekkür ederim.

Böcek Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarındaki cihazları kullanmama izin veren ve benimle bilgilerini paylaşan Prof. Dr. Nesrin Ebru GÖNCÜ'ye ve laboratuvar çalışmalarında ve istatistiksel analizlerime yardımcı olan doktora öğrencisi Büşra GÜNAY' a teşekkür ederim. Böcek yetiştirme döneminde beraber çalıştığımız Celal Bayar Üniversitesi Araş Gör. Dr. Esen POYRAZ TINARTAŞ'a, bölümümüz doktora öğrencisi Tuğçe ERGİN'e, lisans öğrencisi Doğukan YÖRÜKOĞLU'na ve zaman geçirmekten keyif aldığım, beraber çok eğlendiğim arkadaşım bölümümüz yüksek lisans öğrencisi Seçkin ŞENKAYA'ya ve yine böcek döneminde yardıma gelen tanıştığımı çok sevdiğim artık yüksek lisans öğrencimiz Sadiye OYLUM'a teşekkür ederim.

Lisans, ERASMUS ve yüksek lisans süresince her zaman yanımda olan ayrılmaz dostum, beni her zaman destekleyen, birlikte çok eğlendiğimiz, yeri geldiğinde mutlulukları yeri geldiğinde üzüntülerimizi beraber paylaştığımız, çok sevdiğim biricik arkadaşım Gıda Yüksek Mühendisi Zülal AKSOY'a çok teşekkür ederim.

Yine benim için çok önemli olan, beni anlayan, mutluluğumda üzüntümde yanımda olan, birlikte olmaktan çok mutlu olduğum, bana bu dönemde her türlü desteği veren, her eve lazım uçak mühendisi, çok sevdiğim Ertuğrul ÇİNAR'a çok teşekkür ederim.

08 / 02 / 2022

Ceren ERSOY

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim Bilgileri

<u>Okul adı</u>	<u>Eğitim yılı</u>
İlkokul;	Kadir Has İlköğretim Okulu, İstanbul 2009
Lise;	50. Yıl Tahran Anadolu Lisesi, İstanbul 2013
Üniversite;	Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği 2014-2019
Yüksek lisans;	Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı 2019-2022

Sertifikalar-Eğitimler

- 23 Mart 2021 Türkiye Biyologlar Derneği-Online PCR Laboratuvar Eğitimi
- 15 February-5 March 2021 Bioinformatics For Biologists: An Introduction To Linux, Bash Scripting, And R
- 17 Kasım,1 Aralık 2018 Fırat Özel – FSSC 22000
- 15 Aralık, 29 Aralık 2018 Fırat Özel - BRC Food 8.Versiyon
- 19 Ocak 2019 Fırat Özel - IFS
- 23 Şubat 2019 Fırat Özel - İç Denetçi Eğitimi

Bilimsel Aktiviteler

- ERSOY, C., Bioinformatik Motif Programları Kullanılarak Protein Yapılarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Seminer Sunumu, 31 Aralık 2021, EÜ Fen Fak. Biyoloji Bölümü, İzmir.
- ERSOY C., İZZETOĞLU S., TURGAY-İZZETOĞLU G., Demonstration of Sialyltransferase Gene Expression in *Bombyx mori*, Oral presentation, 5th International Congress on Zoology and Technology (ICZAT-2021), 19 December 2021, Online, p: 21.
- 2021 Bioinforange - Biyoenformatik ve Disiplinlerarası Yaklaşımlar Konferansı
- 2017 Metin Yurdağül (MÜMSAD başkanı), Ebru Akdağ (MÜMSAD genel koordinatörü), ‘Bilimin Işığında Gıdada Kirletilen Bilgiler’
- 2015 Fırat Özel, ‘Etik ve Sosyal Sorumluluk Eğitimi’