

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Agrotis segetum (Dennis and Schiffmüller) (Lepidoptera: Noctuidae)
HEMOLENFİNDEKİ LEKTİN AKTİVİTESİ

76630

Nursel GÜL

76630

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 20.5/1998 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından

Oybirliği / Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

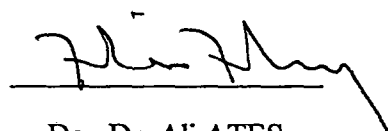


Prof.Dr. Cevat AYVALI

Danışman



Doç.Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ



Doç.Dr. Ali ATEŞ

Agrotis segetum (Dennis and Schiffmüller)
(Lepidoptera: Noctuidae) HEMOLENİNDEKİ
LEKTİN AKTİVİTESİ

Nursel GÜL

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

1998
ANKARA

ÖZET

Doktora Tezi

Agrotis segetum (Dennis ve Schiffmüller) (Lepidoptera: Noctuidae)
HEMOLENFİNDEKİ LEKTİN AKTİVİTESİ

Nursel GÜL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Cevat AYVALI
1998, Sayfa: 57

Jüri: Prof. Dr. Cevat AYVALI
Doç. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Doç. Dr. Ali ATEŞ

Agrotis segetum hemolenfinden çözünebilir lektin, Sepharose-4B kolonunda affinite kromatografisi ve Süperdex 200 kolonunda jel filtrasyonuyla saflaştırılmıştır. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi)'de, 2-Merkaptoetanollü ve merkaptoetanolsüz olarak yaklaşık 69.000Da molekül ağırlığında bir protein bandı halinde olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Süperdex-200 kolonunda jel filtrasyonu yöntemi, hemolenf lektininin aynı molekül ağırlığına sahip protein piki oluşturduğunu göstermiştir.

Bu araştırma, 94.25.00.14 No'lu Doktora Tez Projesi olarak A.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Sığır, at, tavşan, koyun, tavuk ve insan (A, B, O grubu) kanı eritrositleri kullanılmak suretiyle *A. segetum* beşinci evre larvalarından elde edilen hemolenf lektininin hemaglutinasyonu in vitro olarak araştırılmıştır. A grubu insan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonu yüksek titre (1:256) ile olmuştur.

Hemaglutinasyonun inhibisyonu deneylerinde bazı karbohidrat ve glikoproteinler kullanılmıştır. Hemaglutinasyon aktivitesinin en fazla D-laktoz olmak üzere, N-asetil galaktozamin, N-asetil glukozamin D-fruktoz, D-galaktoz, D-glukoz, D-maltoz, D-mannoz, D-rafinoz ve L-riboz ile inhibe olduğu belirlenmiştir.

Elektron mikroskopunda, saflaştırılan lektinin ağısı (retiküler) bir yapıda olduğu ve birbiri ardına dizilmiş küresel yapılardan meydana geldiği saptanmış ve lektinin eritrositlerin yüzeyine bağlanarak hemaglutinasyonu sağladığı da gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lektin, Hemaglutinasyon, İnhibisyon, Affinite kromatografi, Jel filtrasyonu, SDS-PAGE, Elektron mikroskobu

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

LECTIN ACTIVITY IN *Agrotis segetum* (Dennis and Schiffmüller)
(Lepidoptera: Noctuidae) HAEMOLYMPH

Nursel GÜL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Cevat AYVALI

1998, Page: 57

Jüri: Prof. Dr. Cevat AYVALI

Assoc. Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Assoc. Prof. Dr. Ali ATEŞ

A soluble hemagglutinin (lectin) was purified from the hemolymph of *Agrotis segetum* by affinity chromatography on Sepharose-4B and gel filtration on Süperdex-200. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) showed a single protein band with a molecular weight of 69.000Da in the presence and absence of 2-Mercaptoethanol. Similary, on Superdex-200 jel filtration showed a single protein peak with a molecular weight of hemolymph lectin.

This research which has the number 94.25.00.14 was supported by the Research found of Ankara University as Ph.D. Thesis project.

In vitro hemagglutination of hemolymph lectin obtained from fifth instar larvae of *A. segetum* was observed using the red blood cells from chicken, sheep, rabbit, bovine and human A, B, O group. The highest titre (1:256) was observed with human blood group A erythrocytes.

Inhibition tests of hemagglutination were done by some carbohydrates and glycoproteins. N-acetyl galactoseamine, N-acetyl glucoseamine, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-maltose, D-mannose, D-raffinose, L-ribose inhibited hemagglutination activity of hemolymph lectin, but inhibition of D-lactose was stronger than others.

Electron microscopic examination showed that the purified molecules of hemolymph lectin of *A. segetum* were reticular structure, that the molecules consists of tandemly aligned ring shaped basic units and that agglutination was resulted from bounding of lectin with surface of erythrocytes.

Key Words: Lectin, Hemagglutination, Inhibition, Affinity chromatography, Gel filtration, SDS-PAGE, Electron microscopy.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarını süresinde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bana yol gösteren sayın Hocam Prof. Dr. Cevat AYVALI'ya, çalışmalarım sırasında maddi ve manevi yardımlarını gördüğüm Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma en içten duygularla teşekkür ederim.

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Bölümü'nde araştırmanın bazı aşamaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarım sırasında çalışmamı yönlendiren, laboratuvarını kullanma olanağı veren, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Bölüm Başkanı Sayın Uzman Dr. Erkan ÖZCENGİZ'e maddi ve manevi yönden destek gördüğüm Aşı Müdürlüğü bölümündeki Yüksek Biyolog İsmail KUTLU, Yüksek Biyolog Gülnur TARHAN, Yüksek Biyolog Özlem KARDAŞ, Veteriner Hekim Meryem ŞAKAR ve Kimyager Mustafa HACIÖMEROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL ve METOD	16
2.1. Materyal	16
2.1.1. Böcek kültürü	16
2.1.2. Omurgalı kanları	16
2.1.3. Karbohidratlar	16
2.1.4. Glikoproteinler	16
2.1.5. Deneylede kullanılan tamponlar	17
2.1.5.a PBS (Phosphate Buffer Saline) pH: 7.3	17
2.1.5.b BIS (Buffered Insect Saline) pH: 7.9	17
2.1.6. Kromatografi jel maddeleri	17
2.1.7. Jel elektroforezde (SDS-PAGE) kullanılan marker proteinler ..	17
2.1.8. Deneylede kullanılan cihaz ve sistemler	18
2.2. Metodlar	18

2.2.1. Hemolenfin hazırlanması	18
2.2.2. Lektin saflaştırma çalışmaları.....	18
2.2.2.1. Affinite kromatografi.....	18
2.2.2.2. Jel filtrasyonu	19
2.2.3. Jel filtrasyonu ile moleküler kütle tayini.....	19
2.2.4. Jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	19
2.2.5. Omurgalı kanlarının hazırlanması	20
2.2.6. Hemaglutinasyon deneyleri.....	20
2.2.7. Hemaglutinasyonun inhibisyon deneyleri	20
2.2.8. Elektron mikroskobu gözlemleri.....	20
3. BULGULAR.....	21
3.1. Lektin Saflaştırılması.....	21
3.2. Moleküler Kütle Tayini	21
3.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	23
3.4. Hemaglutinasyon Deneyleri.....	25
3.5. Hemaglutinasyonun İnhibisyonu Deneyleri.....	25
3.6. Elektron Mikroskobu (TEM) Çalışmaları.....	32
4. TARTIŞMA	37
5. KAYNAKLAR.....	46
6. ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1.** Hücre yüzeyinde spesifik oligosakkarit zincirindeki şeker ünitelerine (spesifik reseptörler) lektinin çapraz bağlanmasıyla oluşan aglutinasyon 5
- Şekil 1.2.** Ortamda bulunabilen Monosakkaritlerin lektinin bağlanma bölgesine bağlanmasıyla aglutinasyonun inhibe edilmesi 6
- Şekil 3.1.** Sepharose-4B kolonundan affinite kromatografi yöntemiyle *A. segetum* hemolenf lektinin saflaştırılması..... 22
- Şekil 3.2.** Süperdex-200 kolonundan jel filtrasyonu yöntemiyle *A. segetum* hemolenf lektinin saflaştırılması 22
- Şekil 3.3.** Süperdex-200 kolonunda moleküler kütle tayini..... 23
- Şekil 3.4.** Sephanose 4B ve Süperdex-200 ile saflaştırılan lektin örneklerinin poliakrilamid jel elektroforezi 24
- Şekil 3.5.** Saflaştırılmış lektin örneğinin poliakrilamid jel elektroforezi 24
- Şekli 3.6.** A grubu insan kanı eritrositlerinin *A. segetum* hemolenf lektini ile hemaglutinasyonu 32
- Şekil 3.7a** 100 mM'lık karbohidratların (N-asetil galaktozamin'den laktoz'a kadar) horoz kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu inhibe etmesi..... 33
- Şekil 3.7b.** 100 mM'lık karbohidratlar (Rafinoz'dan Galaktoz'a kadar) ve Kondrotin Sülfat A, 1 mg/ml mucin ve 0,1 mg/ml mucin'in horoz kanı eritrositlerinin

Şekil 3.8. Saflaştırılan lektin.....	34
Şekil 3.9. Saflaştırılan lektinin birim yapıları.....	34
Şekil 3.10. Saflaştırılan lektinin 0 grubu insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunun TEM'deki görüntüsü.....	35
Şekil 3.11.Hemaglutine olmayan eritrositler	36



ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 3.1.** *A. segetum* hemolenfinin omurgalı ve insan kanı eritrositlerini
hemaglutinasyonu..... 32
- Çizelge 3.2.** *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini
hemaglutinasyonunu 100 mM'lık karbohidratların inhibisyonu..... 33
- Çizelge 3.3.** *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini
hemaglutinasyonunu 50 mM'lık karbohidratların inhibisyonu 34
- Çizelge 3.4.** *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini
hemaglutinasyonunu 25 mM'lık karbohidratların inhibisyonu 35
- Çizelge 3.5.** *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini
hemaglutinasyonunu 12.5 mM'lık karbohidratların inhibisyonu..... 36
- Çizelge 3.6.** *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini
hemaglutinasyonunu 6 mM'lık karbohidratların inhibisyonu 37
- Çizelge 3.7.** Glikoproteinlerin, *A. segetum* hemolenf lektininin çeşitli omurgalı ve
insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu inhibisyonu 38
- Çizelge 4.1.** Bazı omurgasız hayvan lektinleri ve alt üniteleri..... 48
-

KISALTMALAR

kDa Kilodalton

K.....Kilodalton

da Dalton

SDS Sodyum dodesilsülfat

PAGE Poliakrilamid jel elektroforez

HA..... Hemaglutinasyon Aktivitesi

H..... Hücre

E Eritrosit

L Lektin

M..... Monosakkarit

FPLC Hızlı performans likit kromatografisi (Fast Performance Liquid Chromatography)

DTT..... Dithiothreitol

TEM Transmission Electron Microscopy (Geçirmeli elektron mikroskobu)

EM..... Electron Microscopy (Elektron mikroskobu)

N-Ac Gal..... N-Asetilgalaktozamin

N-Ac Glu N- Asetilglukozamin

Gal Galaktoz

1. GİRİŞ

Zararlı bir böcek olan *Agrotis segetum* halk arasında bozkurt veya toprak kurdu olarak bilinmektedir. Dünyanın ve Türkiye'nin birçok yerinde yayılış göstermektedir. Polifag bir böcek olduğu için süs bitkilerine; tütün, pamuk, şeker pancarı, ayçiçeği gibi endüstri bitkilerine; patates, havuç, ıspanak, soğan fasulye, biber vs. gibi sebzelere oldukça fazla zarar vererek, ülke tarım ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. *A. segetum*, larva döneminin ilk evrelerinde bitkilerin fidelerine, son evrelerinde ise bitkilerin toprak altı yapılarına (kök, gövde) zarar vermektedir. Özellikle şeker pancarına, pamuk fidelerine ve patatese büyük ölçüde zarar verdiği için ürün kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Kaya, 1979; Erinç, 1996).

Dünyada ve Türkiye'de zararlı böceklere karşı çeşitli mücadele yöntemleri uygulanmaktadır. Bunlardan en çok kullanılan yöntem, kimyasal insektisitlerle yapılan mücadeledir. Ancak günümüzde kimyasal insektisitlerin çevreye de zarar verdiği bilinmektedir. İnsektisitlerin böceklerden başka diğer canlı gruplarını da öldürdüğü, bitkilerin üzerindeki artıklar sebebiyle insanlara da zararlı olduğu bilinmektedir. Kimyasal insektisitlerin çevreye verdiği zarar göz önünde bulundurularak günümüzde biyolojik savaş yöntemleri geliştirilmektedir. Zararlı böceklere karşı mikrobiyal insektisitler ve antibiyotikler gibi çeşitli biyolojik ajanlar geliştirilmiş ve mücadelelere başlanmıştır (Erinç, 1996).

Bacillus cinsi mikrobiyal insektisitlerin Lepidoptera (Kelebekler) ve diğer böcek ordolarına etkileri konusunda birçok araştırma yapıldığı görülmektedir. *Bacillus cereus* serotiplerinin hamam böcekleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yapılan araştırmada *B. cereus* NCIB 3329 ve *B. cereus* B1'in *Leucophaea maderae* ve *Blaberus giganteus*'da patojenik etki oluşturduğu gözlenmiştir (Rahmet-Alla and Rowley, 1989). *L. maderae*'ye oral yolla ve hemosölüne enjeksiyonla *B. cereus* B1 verildikten 12 saat sonra, bakterinin böceğin orta bağırsak bölgesindeki prizmatik salgı hücrelerine hasar verdiği gözlenmiştir.

Lord ve Undeen (1990), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*'in *Aedes aegypti* larvalarına etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada *B. thuringiensis* var. *israelensis*'in larvalar üzerindeki öldürücü dozunun (LC₅₀) 140 ng/ml olduğunu

tesbit etmişlerdir. Ancak düşük konsantrasyondaki (0,25 mM) tannik asidin, *B. thuringiensis* var. *israelensis*'in *A. aegypti* larvalarını öldürme etkisini azalttığını gözlemişlerdir.

Kolombiya'da sivrisinek larvalarına toksik etki yapan yeni bir *B. thuringiensis* serotipi rapor edilmiştir (Orduz *et al.*, 1992). Araştırmacılara göre *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'de bulunan H30 antijeni birçok sivrisinek türüne toksik etki etmektedir. Bu H30 antijenine göre *B. thuringiensis*'in yeni bir serotipi olarak medellin alt türü önerilmiştir.

Heliothis armigera'ya karşı *B. thuringiensis* alttürlerinin (çoğunlukla *kurstaki*) insektisidal kristal proteini sentezledikleri rapor edilmiştir (Padidam, 1992). Tütün, pamuk, domates, fasulye gibi bitkilere zarar veren *Heliothis* türlerine karşı *B. thuringiensis*'in CryIA (c) adı verilen böcek öldürücü (insektisidal) kristal proteinin etki ettiği gözlenmiştir.

Tuncer ve Ecevit (1994), yayınladıkları bir derlemede *B. thuringiensis* ticari preparatlarının bitkilere zarar veren böceklere karşı biyolojik savaşta etkili olduğunu açıklamışlardır. Bu mikrobiyal insektisit kullanım oranının % 1 olduğunu, ancak 2000'li yıllarda % 50'ye çıkarılmasının hedeflendiği ifade edilmiştir. Ayrıca bakteri toksininin bazı zararlılara karşı etkili olduğu halde insanlara, faydalı böceklere ve diğer organizmalara toksik olmadığı belirtilmiştir.

B. thuringiensis var. *kurstaki* 1.85×10^{15} hücre/ml dozunun *A. segetum* larvalarının bağırsak (ileum bölgesi) epitel hücrelerinde çekirdek ve nükleoplazması ile mitokondri gibi organellerin şişmesine ve sitoplazmalarının erimesine neden olduğu gözlenmiştir (Kalender ve Kalender, 1995).

Ticari bir preparat olarak kullanılan *B. thuringiensis* (Dipel WP)'in *A. segetum* larvalarının bağırsak epitel hücrelerini parçaladığı ve hücrelerin apikallerinde vakuolleşmenin meydana gelmesine neden olduğu bildirilmiştir (Erinç, 1996). Yine aynı araştırmada *B. thuringiensis*'in *A. segetum* larvalarında renk koyulaşmasına, harekette uyuşukluğa, reflekslerin yavaşlamasına ve iştahsızlığa neden olduğu tesbit edilmiştir.

Omurgasız hayvanlar, yabancı objelere (bakteri, bira mayası, mantar, abiyotik partiküller vs.) karşı hücrel ve humoral bağışıklık göstermektedirler. Bu

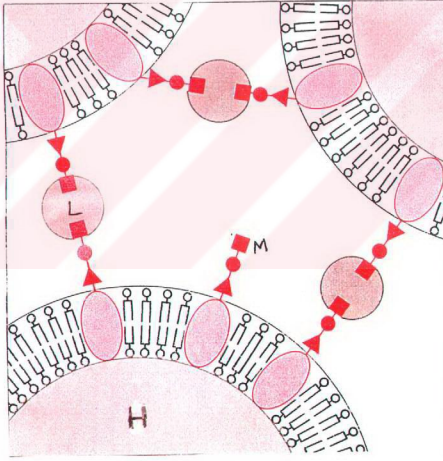
hayvanların bağışıklık reaksiyonları kan hücreleri tarafından yapılmaktadır. Omurgasız hayvan türüne göre çeşitli kan hücreleri hücrel bağışıklık reaksiyonu göstermektedir. Bunlardan plasmatositler, granüositler ve koagülositler (sistositler) bağışıklık reaksiyonunda görev alan hücrelerdir (Ratner and Vinson, 1983; Ratcliffe, 1986; Davies *et al.*, 1987, Mullett *et al.*, 1993; Wiesner and Götz, 1993). Bu hücreler hemolenf koagülasyonu, fagositoz, nodül oluşumu ve kapsülleşme denilen hücrel bağışıklık reaksiyonları göstermektedir. Fagositoz; tek hücreli savunma reaksiyonu olduğu halde nodül oluşumu ve kapsülleşme çok hücreli savunma reaksiyonlarıdır. Koagülasyonun, granüler hücreler ve/veya sistosit denilen hücrelerin yabancı objenin organizmaya girmesiyle granüllerini boşaltmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Ratcliffe, 1986). Fagositoz olayında organizmaya giren obje, sayıca ve hacimce küçük ise granüllü hücreler ve sistositlerin hücrel bağışıklık reaksiyonu gösterdiği tesbit edilmiştir (Ratcliffe and Rowley, 1979; Ratcliffe and Walter, 1983; Ratner and Vinson, 1983). Nodül oluşumu ve kapsülleşme tipi savunma reaksiyonunda, parazitlerin veya mikroorganizmaların çok sayıda ve büyük olmaları halinde kan hücrelerinin çoğunlukla plasmatositlerin üst üste gelerek yabancı obje etrafında çok hücreli bir kılıf meydana getirdiği birçok araştırmacı tarafından gözlenmiştir (Ratner and Vinson, 1983; Ratcliffe and Walters, 1983; Ratcliffe, 1986; Davies *et al.*, 1987; Guzo and Stoltz, 1987; Wiesner and Götz, 1993; Mullett *et al.*, 1993; Dunphy and Downer, 1994; Gül ve Ayvalı, 1995; Gillespie and Kanost, 1997).

Omurgasız hayvanların hücrel bağışıklığı kadar humoral bağışıklığı üzerinde de birçok araştırma yapılmıştır. Hücrel bağışıklığın öncesinde omurgalılarda olduğu gibi humoral bağışıklık reaksiyonları meydana gelmektedir. Humoral bağışıklıkta kan hücreleri ve yağ dokusu hücrelerinden sentezlenen humoral faktörlerin görev aldığı bilinmektedir (Ratcliffe and Rowley, 1979; Rowley and Ratcliffe, 1981; Coombe *et al.*, 1984; Ratcliffe, 1986; Kanost *et al.*, 1990). Humoral faktörlerin en önemlileri profenoloksidazlar, antibakteriyel enzimler ve lektinlerdir. Profenoloksidazlar, omurgasızlarda önemli bir humoral faktördür. Organizmaya giren yabancı objenin varlığında bir başka enzim veya lipopolisakkaritler tarafından uyarılan profenoloksidaz enzimi bağışıklık reaksiyonlarının başlamasına neden olmaktadır. Örneğin *Pasifastacus leniusculus*'daki lipopolisakkaritler ve β -1,3 Glukan Laminarin G'nin profenoloksidaz enzim sistemini uyarması sonucu

bağışıklık reaksiyonunun başladığı gözlenmiştir (Johansson and Söderhall, 1985). Brookman *et al.* (1988), *Galleria mellonella* larvalarında laminarin denilen β -1,3 glukoz enzim sisteminin profenoloksidaz enzim sistemini uyardığı ve hücrel bağışıklık reaksiyonunun başladığını rapor etmişlerdir. Ratcliffe (1986), profenoloksidaz sisteminin önositoid denilen kan hücrelerinde bulunduğunu ve bu enzim sisteminin hücrel bağışıklık reaksiyonunu ve melaninleşmeyi başlatabileceğini bildirmiştir. Brehelin *et al.* (1989), *Locusta migratoria*'daki profenoloksidaz enzim sisteminin lipopolisakkaritler ve laminarin'le aktive olduğunu belirtmişlerdir. *Blaberus craniifer*'in hemositlerinden izole edilen yeni bir proteinin profenoloksidaz enzim sistemini aktive ettiği böylece eksositozla hücrelerin degranülasyonunu başlattığı rapor edilmiştir (Rantamaki *et al.*, 1991).

Omurgasızların vücuduna giren bakterilere karşı bir savunma mekanizması olarak kan hücreleri tarafından antibakteriyel enzim salgılandığı bilinmektedir (Ratcliffe and Rowley, 1979; Rowley and Ratcliffe, 1981; Coombe *et al.*, 1984; Ratcliffe, 1986; Kanost *et al.*, 1990). Antibakteriyel enzimlerin ya da proteinlerin fonksiyonlarıyla ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Örneğin antibakteriyel bir enzim olan lizozimin böcek kan hücreleri tarafından sentezlenip, salgılanarak bakterileri etkisiz hale getirdiği tesbit edilmiştir (Zachary and Hoffmann, 1984). *Sarcophaga peregrina* larvalarına *Escherichia coli* bakterisi enjekte edildiğinde, larvaların bakteriyeye karşı sarkotoksin adı verilen antibakteriyel bir protein sentezledikleri gözlenmiştir (Natori, 1987). *Hyalophora cecropia*'dan izole edilen antibakteriyel proteine ise sekropin (cecropin) adı verilmiştir. Hatta bazı araştırmacılar, sekropinin A, B, D formlarını izole etmişlerdir (Kanost *et al.*, 1990). Yine *H. cecropia*'dan izole edilen antibakteriyel proteine attasin adı verilmiştir ve bunun iki formu (nötral attasin ve bazik attasin) bulunduğu bildirilmiştir (Kanost *et al.*, 1990). Shigenaga *et al.* (1990), *Tachyplesin tridentatus* (atnalı yengeci)'da bulunan antimikrobiyal proteine tachyplesin adını vermişler ve bu proteinin Arthropodların yeni bir antibiyotigi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Toh *et al.* (1991) ise *T. tridentatus*'un üzerinde yaptıkları bir başka araştırmada, dolaşan kandaki granüllü hücrelerin iki tip granül ihtiva ettiği bildirilmiştir. Bunlara D- ve L- granülleri adı verilmiştir. Granüllü hücrelerde bulunan L-granüllerinin sadece bir antimikrobiyal faktör ihtiva ettiği halde, D-granüllerinin bol miktarda antimikrobiyal faktör ihtiva ettiği gözlenmiştir.

Omurgasızların humoral bağışıklığında önemli rol oynayan moleküllerden birisi de lektinlerdir. Lektinlerin omurgasızlardan başka bitkiler, omurgalılar, bira mayası, bakteriler ve virüslerde bulunduğu bilinmektedir. İlk olarak bitkilerden izole edildikleri için fitohemaglutininler adı verilmiştir. Daha sonraları diğer canlı gruplarından da izole edildiklerinden genel olarak aglutininler adı verilmiştir. Lektinler, kan hücrelerini (omurgalı eritrositlerini), bakterileri, bira mayalarını, parazitleri ve virüsleri aglutine etmektedir. Aglutinasyon olayında yabancı hücre yüzeyinde bulunan lektin reseptörlerine organizmada bulunan lektinler çapraz bağlarla bağlanarak yabancı hücreleri çöktürmektedir (Şekil 1.1) ve böylece hücresel bağışıklık reaksiyonu başlamaktadır. Lektinlerin spesifik karbohidratlarla (mono, di ve oligosakkaritler) bağlanma yaptıkları bilinmektedir (Sharon, 1977; Lis and Sharon, 1986; Olafsen, 1986; Renwranz, 1986; Vierbüchen, 1991).

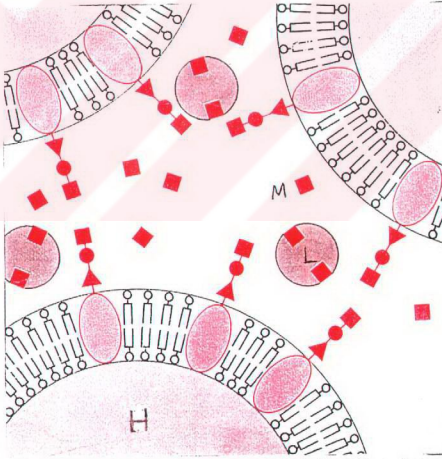


Şekil 1.1. Hücre yüzeyinde spesifik oligosakkarit zincirindeki şeker ünitelerine (spesifik reseptörler) lektinin çapraz bağlanmasıyla oluşan aglutinasyon (Sharon, 1977).

L: Lektin, H: Hücre, M: Monosakkarit.

Lektinlerin glikoprotein veya protein yapısındaki kendinden olanı veya olmayanı tanıma molekülü olduğu rapor edilmiştir. Meydana gelişleri, fonksiyonları ve fizikokimyasal özelliklerine göre iki ana gruba ayrılabilceği belirtilmiştir

(Vierbüchen, 1991). Bildiriye göre lektinler, soluble lektinler ve membran lektinleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Soluble lektinlerin, salgılanma aktivitesinde ve ekstrasellüler matriksin organizasyonunda rol oynayabileceği belirtilmiştir. Membran lektinlerinin ise önemli biyolojik aktivitelerde örneğin hücre-hücre interaksiyonunda, hücre-hücre tanınmasında ve hücre adhezyonunda rol alabileceği öne sürülmüştür. Lektinlerin şekerlerle olan bağlantısının antikor-antijen veya enzim-substrat bağlantısına benzediği belirtilmiştir Sharon, 1977; Nichols and Nakamura, 1986). Lektinlerin yabancı materyali aglutinasyonu, çeşitli karbohidratlarla özellikle monosakkaritlerle inhibe edildiği bilinmektedir (Şekil 1.2). İnhibisyon olayında karbohidratların lektin üzerindeki reseptörlere bağlandığı ve böylece lektinlerin yabancı materyalin yüzeyindeki lektin reseptörlerine bağlanmadığı yine aynı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Sharon, 1977; Pendland *et al.*, 1988; McKenzie and Preston, 1992 a, b).



Şekil 1.2. Ortamda bulunabilen monosakkaritlerin lektinin bağlanma bölgesine bağlanmasıyla aglutinasyonun inhibe edilmesi (Sharon, 1977).
L: Lektin, H: Hücre, M: Monosakkarit.

Bitkilerde bulunan lektinler, bitkiyi savunan humoral faktör olarak, önemli olduğu gibi birçok biyolojik fonksiyonunun anlaşılması için de önemli moleküllerdir. Bu konularda pekçok araştırma mevcuttur. Bitkilerin tohumlarında ve diğer

dokularında lektinler bulunmaktadır. Bitki tohumlarından elde edilen lektinlerin örneğin soya fasulyesi tohumu lektininin *Manduca sexta* larvalarının gelişmesini engellemesi gibi fitofaj böceklerle karşı larval gelişmeyi engelleyici faktör olarak kullanıldığı rapor edilmektedir (Shukle and Murdock, 1983; Murdock *et al.*, 1990). Bitki lektinlerinin, bitki hücre duvarlarına saldırıda bulunan zararlı mantar veya mikroplara karşı hidroliz enzimlerinin faaliyetini engelleyici bir etki yaptığı bilinmektedir (Sharon, 1977; Lis and Sharon, 1986). Bitkilerdeki lektinlerin şekerlerin taşınmasında ve depolanmasında rol oynayabileceği de açıklanmıştır (Lis and Sharon, 1986; McKenzie and Preston, 1992 a, b). Bitkilerin Leguminosae familyası türlerine ait bireylerin köklerinde bulunan lektinlerin topraktaki azotu fikse eden bakterileri bitkiye bağladığı bilinmektedir (Lis and Sharon, 1986). Böylece azotu tesbit eden bakterilerin bitkinin azot gazlarını kullanmasına yardımcı olduğu tesbit edilmiştir. Fitches *et al.* (1997), kardelen (*Galanthus nivalis*) bitkisinde bulunan lektinin (GNA), *Laconobia oleracea* larvalarının gelişmesini engellediğini bildirmişlerdir. Lektinlerin bitkiler için önemli olan bu fonksiyonlarından başka birçok biyolojik olayların anlaşılmasında da önemli olduğu anlaşılmıştır. Özellikle bitki tohumlarından izole edilen lektinler ticari olarak satılmaktadır. Ticari lektinlerin floresanslı boyalarla muamele edilerek kanser teşhisinde, epitel hücrelerinin farklılaşmasında, bakteri türlerinin teşhisinde (infeksiyonel hastalıklarda), *T lenfosit*lerinin olgunlaşmasında, mitoz bölünmenin uyarılmasında ve yumurta-sperm ilişkisinin anlaşılmasında kullanıldığı belirtilmiştir (Sharon, 1977; Lever *et al.*, 1984; Danguy and Genten, 1990; Vierbuchen, 1991; Anadolu vd., 1992; Miyazawa *et al.*, 1994).

Membran lektinleri, çeşitli hayvanların ve insanların hemen hemen bütün organlarında(karaciğer, mide, böbrek, beyin, dalak, timus, akciğer vs.) bulunmaktadır. Soluble lektinler, organların sulu extratlarından elde edilmiştir (Lis and Sharon, 1986; Vierbuchen, 1991). Soluble lektinler, β -galaktosidazlarla reaksiyona girmektedirler ve ortak olarak dimerik yapıya sahiptirler. Membran lektinlerinin ise fizikokimyasal özellikleri ve şekerlerle bağlantıları farklıdır. Örneğin memelilerde ve kuşlardaki lektinler, galaktoz ve mannoz/N-asetil glukozamin ile bağlantı kurarlar. Oysaki yavru hamster'in böbrek hücrelerindeki mikrozomal fraksiyonlardan izole edilen endojen orijinli lektinin tiyodigalaktosid ve N-asetil

galaktozamin ile bağlandığı gözlenmiştir (Lis and Sharon, 1986). Omurgalılardaki lektinlerin hücre-hücre haberleşmesinde ve hücre adhezyonunda önemli görev yaptığı bilinmektedir. Yapılan immünokimyasal ve immünohistokimyasal tekniklerle, saflaştırılmalarıyla, işaretli glikoproteinlere bağlanmalarıyla, aglutinasyon yetenekleriyle artan sayıdaki insan ve hayvan tümör hücrelerinin (tümör hücre lektinleri) normal dokulardaki endojen orijinli lektinlere benzediği kanıtlanmıştır. Hücre adhezyonu ve tanıma olayında endojen tümör hücre lektinlerinin, tümör hücreleri ve kırmızı kan hücreleri (heterotipik adhezyon veya heterotipik agregasyon) arasında roset formasyonu oluşturduğu ispat edilmiştir. (Vierbüchen, 1991). Çin Hamsteri ovaryum hücrelerinden zara bağlı kalneksin (calnexin) adı verilen ve endoplazmik retikulumda yeni sentezlenmiş glikoproteinleri bağlayan bir lektin izole edilmiştir. Bir transmembran protein olan kalneksinin çok sayıda farklı glikoproteinin olgunlaşmaları ve sarmalleşmeleri sırasında geçici olarak interaksiyona girdiği açıklanmıştır (Tatu and Helenius, 1997).

Bakteri yüzey lektinleri veya lektin benzeri maddeler ile enfeksiyonların başlatılmasında bakterilerin, epitel hücrelerine (örneğin boşaltım ve sindirim kanalı hücrelerine) yapışmasını sağlayabileceği rapor edilmiştir (Lis and Sharon, 1986; Vierbuchen, 1991). Son yıllarda mikrobiyal lektinlerin hedef hücre membranlarıyla interaksiyona girmesi başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. *Borrelia recurrentisspiroketine* ait lektinin, tavşan kanı eritrositlerini yüksek titre ile hemaglutine ettiği belirtilmiştir (Grubhoffer *et al.*, 1993).

Viral lektinlerin, kırmızı kan hücrelerini aglutine ettiği bilinmektedir (Vierbüchen, 1991; Blumenthal *et al.*, 1996). Kılıflı ve kılıfsız virüslerdeki saldırı proteinlerinin (VAP) kapsid komponenti olduğu bildirilmiştir (Vierbüchen, 1991). Çeşitli virüslerin belli organlardaki hücrelere lektinle bağlandığı gözlenmiştir (Vierbüchen, 1991). Bildiriye göre mikrovirüs (grip virüsü) solunum sistemindeki hücrelerin zarında bulunan mannoz'lara bağlanmaktadır. Influenza (grip virüsü) lektinlerinin por füzyonunun, hücre-hücre füzyonu olaylarının bireysel kinetikleri ile olduğu gözlenmiştir. Konakçı hücre membranları ile influenza lektinlerinin bağlanması, düşük pH ortamında endosomlarla başladığı işaretleme yoluyla floresanlı mikroskopta gözlenmiştir.

Omurgasızların birçok filumunda ve bu filumların sınıf ve alt sınıflarındaki türlerinde kan dokusunda (hemolenf ve kan hücrelerinde), eşey organlarında (yumurta ve albumin üreten bezlerde), yağ dokusunda, tükürük bezlerinde epitel hücrelerinde lektinlerin bulunduğu birçok araştırmacı tarafından açıklanmıştır (Lis and Sharon, 1986; Olafsen, 1986; Perrone *et al.*, 1986; Ratcliffe, 1986; Renwrantz, 1986; Dunn, 1990; Kanost *et al.*, 1990; Grubhoffer *et al.*, 1994). Omurgasız lektinleri de, omurgalı lektinleri gibi ya membrana bağlı olarak ya da çözünebilir halde organizmada bulunmaktadır. Soluble lektinlerin mukusta, yumurtada, bez hücrelerinde ve hemolenfde (kan serumunda) bulunduğu tesbit edilmiştir (Renwrantz, 1986; Vierbüchen, 1991). Membrana bağlı lektinlerin dokularda bulunduğu ifade edilmektedir. Membrana bağlı lektinler, yabancı hücre yüzeyindeki spesifik karbohidratlara bağlanır. Omurgasızlardaki lektinler, glikoproteinler veya glikolipidlerle interaksiyona girerek glikokonjugantları çöktürür veya hücreleri aglutine eder ve bunlar immunoglobulin olmayan proteinlerdir. Karbohidratlara spesifik şekilde bağlanmasına rağmen bağlanma tam olarak yapılamaz. Araştırmacılar, bu zayıf bağlanmanın multivalent bağlanmalar, su molekülünü bağlamama ve yük interaksyonu gibi ikincil kuvvetlerden dolayı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. (Lis and Sharon, 1986; Olafsen, 1986)

Lektinlerin yabancı hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasını iki değerlikli kationların (Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Cu^{2+}) aktive ettiği bildirilmektedir (Kubo and Natori, 1987; Mullainadhan and Renwrantz, 1986; Renwrantz, 1986; Richards *et al.*, 1988. Ingram and Malyneux, 1990; Theopold and Schmidt, 1997). Ancak Pb^{2+} ve Fe^{2+} gibi ağır metal iyonlarının tamponlardaki aglutinin (lektin) seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir (Ingram and Molyneux, 1990). Membrana bağlı lektinlerin, farklı tipteki çözünebilir yabancı moleküllerin sakkaritlerini tanıyabildiği ve bazı maddelerin salgılanmasını sağlayabildiği öne sürülmüştür (Renwrantz, 1986). Örneğin yumuşakçalar ve böceklerdeki lektinlerin, granüllü hücrelerde fenolksidaz öncülerini ihtiva eden granüllerin salgı faaliyetini uyardığı belirtilmiştir.

Çözünebilir haldeki lektinlerden mucus lektinlerinin Cephalopoda türlerindeki epidermal bez hücrelerinden salgılandığı bildirilmiştir (Renwrantz, 1986). Yumurta ve bez lektinlerinin açık dolaşım sistemine sahip omurgasızların vücut sıvılarıyla doğrudan ilişkili olduğu bilinmekte ve bunların Pulmonatların hemolenflerinde zayıf

aglutinasyonu sebeb olduğu gözlenmiştir. Hemolenf lektinlerinin sadece Gastropoda türlerinde bulunmadığı rapor edilmiştir. Ancak bunlardan *Helix pomatia* hemolenf lektininin diğer bazı mollüsklerdekinden daha yüksek aglutinasyon aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir (Renwartz, 1986). Yine *Helix pomatia* lektininin siyalik asitler ile bağlanma gösterdiği belirtilmiştir (Lis and Sharon, 1986).

İlkel metazoa'lardan süngerlerin lektinleriyle ilgili yapılan araştırmalarda, bunların düşük moleköl ağırlığına sahip oldukları belirtilmiştir (Olafsen, 1986). Örneğin, *Aaptos papillata* lektinlerinin üç farklı tipte olduğu belirtilmiştir. Bunlardan Aaptos II ve Aaptos III lektinlerinin, moleköl ağırlığı 16.000 Da olan tek bir alt ünitesi; Aaptos I lektininin ise moleköl ağırlığı 21.000 ve 12.000 Da olan iki alt ünitesinin bulunduğu tesbit edilmiştir. *Halichondria panicea* lektininin 78.000 Da ağırlığında olduğu ve dört alt ünitesinin (21.000 Da) bulunduğu açıklanmıştır. Araştırmaya göre bu lektin sünger ile bir bakterinin arasındaki simbiyotik ilişkiyi geliştirmektedir. Kawagishi *et al.* (1994), okyanus süngeri olan *Halichondria okadae* ile yaptıkları bir araştırmada, iki lektin (HOL-I ve HOL-II) izole etmişlerdir. Bu lektinlerden HOL-I'in şekerlerden özellikle N-asetil grubu olanlarını tanıdığı, HOL-II'nin ise basit Gal $\beta_1 \rightarrow 4$ Glc Nac ünitesini tanıdığı ileri sürülmüştür.

Omurgasızlardan Mollüsk organizmalarına ait lektin çalışmaları da mevcuttur. Örneğin deniz midyesi *Mytilus edulis* hemositlerinin insan kanı eritrositlerini fagositözünde lektinin etkili olduğu bildirilmiştir (Mullainadhan and Renwartz, 1986). Deniz istiridyelerinden *Crassostrea virginica*'nın düşük moleköl ağırlığına (34.000 Da) sahip olan serum lektininin, omurgalı eritrositlerini aglutine ettiği rapor edilmiştir (Vasta *et al.*, 1984).

Olafsen *et al.* (1992), pasifik istiridyesi *Crassostrea gigas*'ın iki tip hemolenf lektini ihtiva ettiğini gözlemişlerdir. Bunların insan eritrositlerini aglutine eden Gigalin H lektini ve at eritrositlerini aglutine eden Gigalin E lektini olduğunu ve aynı zamanda bakterileri aglutine ederek immün savunmada rol oynadıkları bildirilmiştir.

Kopacek *et al.* (1993), kerevit'in (*Pacifastacus leniusculus*) kan plazmasında bulunan lektinin lipopolisakkaritlere affinitesi olduğu ve tripsinle muamele edilmiş tavşan eritrositlerini aglutine ettiğini tesbit etmişlerdir. Deniz omurgasızlarından deniz yıldızı *Asterina pectinifera*'nın hemolenfinde bulunan lektinin tavşan

eritrositlerini ve aynı zamanda deniz bakterilerini aglutine ettiği gözlenmiştir (Kamiya *et al.*, 1992).

Tek hücreli parazitlerden *Tritrichomonas* cinsi türlerinin insan, domuz, tavşan, sığır ve *tavuk* eritrositlerini çeşitli hemaglutinasyon aktivitesi titrelerinde aglutine ettiği gözlenmiştir (Pakandl and Grubhoffer, 1994).

Yine omurgasızlardan biri olan kene cinslerinin lektinleriyle ilgili bir çalışmada, kan plasması lektinlerinin biyokimyasal karakterleri, kendinden olanı ve olmayanı tanıması ve savunması, organ farklılaşmasındaki fizyolojik önemleri tesbit edilmeye çalışılmıştır (Grubhoffer and Matha, 1991). Yapılan çalışmada *Ixodes*, *Ornithodoros* ve *Argas* cinsi kene plasma lektinlerinin, pronaze ile muamele edilmiş fare eritrositlerini aglutine ettikleri gözlenmiştir.

Omurgasızların büyük bir bölümünü oluşturan böceklerin lektinleri ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Böceklerdeki lektinlerin, kan ve yağ dokusu hücrelerinden sentezlendikleri bildirilmiştir (Myers *et al.*, 1986; Pendland *et al.*, 1988; Ratcliffe, 1986; Ratcliffe and Götz, 1990; Richards *et al.*, 1988; Stiles *et al.*, 1988; Kawagishi *et al.*, 1994). Böceklerdeki kan hücrelerinden plasmatositler ve granüllü hücrelerin yüzeylerinde lektinlerin bulunduğu ileri sürülmüştür (Boucias and Pendland, 1993; Bradley *et al.*, 1989; Pendland and Boucias, 1996; Ratcliffe 1986; Richards *et al.*, 1989). Ayrıca omurgasız hayvanlardaki diğer hücrelerde de lektin bulunduğu gözlenmiştir. Sivrisineklerin tükrük bezleri hücrelerinin membran yüzeylerinde lektin bulunduğu gözlenmiştir (Perrone *et al.*, 1986; Mohamed *et al.*, 1991). Örneğin floresanslı boya ile işaretli lektin kullanılarak *Anopheles stephensi* ve *A. albimanus* türlerini tükrük bezlerine işaretli lektinin bağlanıp, bağlanmamasına göre teşhis etmişlerdir (Mohamed *et al.*, 1991). Böcek bağırsak hücrelerinde de lektin bulunduğu çeşitli araştırmacılar tarafından tesbit edilmiştir (Ingram and Molyneux, 1988; Grubhoffer *et al.*, 1994; Mihok *et al.*, 1993). Böceklerdeki yumurta hücrelerinin lektin ürettiği, ancak sperm hücrelerinin üretmediği gözlenmiştir (Amanai *et al.*, 1991). Ancak *Melanoplus differentialis* ovaryumu ve testisinde lektin bulunmuştur (Stiles *et al.*, 1988).

Böceklerin hemolenf lektinlerinin yapısı, molekül ağırlığının tesbiti, hemaglutinasyon yeteneği, karbohidratlara bağlanma özelliği ile ilgili çalışmalar

bulunmaktadır. Böceklerdeki hemolenf lektinlerinin molekül ağırlığı 70-1500 kDa arasında değiştiği ve 30 ila 40 kDa arasında değişen alt ünitelere sahip oldukları bildirilmektedir (Gillespie and Kanost, 1997).

Hamam böceklerinin hemolenf lektinleri hakkında bazı araştırmalar yapılmıştır. Komano *et al.* (1980), *Sarcophaga peregrina* larvalarındaki hemolenf lektininin 190.000 Da ağırlığında olduğunu ve dört α alt ünitesi ve iki β alt ünitesi (32.000 ve 30.000 Da) bulunduğunu tesbit etmişlerdir. Kubo ve Natori (1987), *P. americana* hemolenf lektininin A grubu insan kanı eritrositlerini hemaglutine ettiğini, 1500 kDa ağırlığına sahip olduğunu ve 30 kDa ağırlığında bir alt üniteye sahip olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca saflaştırılan lektinin geçirmeli elektron mikroskopunda (TEM) resmini çekmişlerdir. Kubo *et al.* (1990), *P. americana* hemolenfinden yeni bir lektin saflaştırmışlar ve bu lektine **regenectin** adını vermişlerdir. Lektinin böceğin bacak regenerasyonunda sükröz ile bağlandığı ve buna bağlı olarak regenerasyon işlemlerinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. *Leptinotarsa decemlineata* hemolenf lektininin çeşitli omurgalı eritrositlerini değişik titrelerde agglutine ettiği ifade edilmiştir (Stylen *et al.*, 1982).

Böceklerden çekirge türlerinin hemolenf lektinleriyle ilgili çalışmalar mevcuttur. *Melanoplus femurrubrum* hemolenfinden *Bacillus poncei* Glaser'e karşı sentezlenen lektinin varlığı tesbit edilmiştir (Stephens, 1963). *M. bivittatus* ve *M. sanguinipes* türlerinin hemolenf lektinlerinin insan (A, B, O kan grubu) ve hayvan (kobay, domuz, fare, tavşan, dana, kedi, tavuk, koyun) kanı eritrositlerini aglutinasyonu incelenmiştir (Jurenka *et al.*, 1982). Hapner (1983), *Melanoplus* türlerinin hemolenf lektininin insan (A, B, O) ve hayvan (dana, at, tavşan, koyun, piliç) kanı eritrositlerini aglutine ettiğini gözlemiştir. Araştırmacı, hemolenf lektinininin insan kanı A, B, O grubu ve tavşan kanı eritrositlerini yüksek titre ile aglutine ettiğini ve hemaglutinasyonların şekerlerle olan inhibisyonunu gözlemiştir. Stebbins ve Hapner (1985), *M. sanguinipes* hemolenfinden 600-700 kDa ağırlığında lektin izole etmişlerdir. Bu lektinin hemaglutinasyonunu ve hemaglutinasyonun şekerlerle olan inhibisyonunu gözlenmişlerdir. Stiles *et al.* (1988), *Melanoplus* türleri hemolenf lektininin yabancı hücre membranlarına D-glukosidik ve D-galaktosidik bağlarla bağlandığını gözlemişlerdir. *M. sanguinipes* ve *M. differentialis* hemolenfindeki lektinin, granüllü hücrelerde lokalize olduğu halde plasmatisitlerde

lokalize olmadığı gözlenmiştir (Bradley *et al.*, 1989). Wheeler *et al.* (1993), *M. differentialis*'den izole edilen lektinin *Beauvaria bassiana* blastosporlarının etrafında opsonin gibi davrandığını ve kan hücreleri (hemositler) ile mantar hücreleri arasında köprü görevi üstlendiğini bildirmişlerdir. *Locusta migratoria*'nın 5. evre larvalarının hemolenfnde bulunan lektinin insan (A, B, O) ve hayvan (tavuk, koyun, siçan, kobay) kanı eritrositlerini çeşitli titrelerde aglutine ettiği gözlenmiştir (Drif and Brehelin, 1989). Hemolenf lektininin tavşan eritrositlerini yüksek titre ile hemaglutine ettiği de gözlenmiştir. Lackie (1981), *Schistocerca gregaria* (çekirge) ve *Periplaneta americana* (hamam böceği) hemolenf lektinlerinin, omurgalı eritrositlerini hemaglutinasyonu aktivitesini incelemiş ve çeşitli karbohidratların lektin hemaglutinasyonunu inhibe ettiğini gözlemiştir. Ingram *et al.* (1984), *S. gregaria* ve *P. americana* lektinlerinin, *Trypanosoma brucei* ve *Leishmania hertigi* parazitlerinin varlığında sentezlendiğini rapor etmişlerdir.

Hemiptera takımından *Panstrongylus megistus* türünün hemolenfinden saflaştırılan lektinin isoform 1 (64 kDa) ve isoform 2 (iki alt ünitesi 64 kDa ve 33 kDa) denilen iki moleküler formu bulunduğu gözlenmiştir (Gomes *et al.*, 1991).

Kelebeklerden (Lepidoptera takımı) *Bombyx mori* hemolenf lektinin 260.000 Da ağırlığında olduğu tesbit edilmiştir (Suzuki and Natori, 1983). Ayrıca bu lektinin glutaraldehit ile fikse edilmiş ve tripsin ile muamele edilmiş tavşan eritrositlerini aglutine ettiği gözlenmiştir. Castro *et al.* (1987), *Hyalophora cecropia* hemolenfinden Galaktoz / N-asetil galaktozamine spesifik olan bir grup izolektin saflaştırmışlardır. Lektinin yaklaşık 160.000 Da ağırlığında olduğu, A alt ünitesi (41 kDa) ve B alt ünitesi (38 kDa) bulunduğu tesbit edilmiştir. Qu *et al.* (1987), *Antheraea pernyi* hemolenfndeki galaktoza spesifik olan lektini saflaştırmışlardır. Oligomerik yapıdaki lektinin 380.000 Da ağırlığında ve 38.000 Da ağırlığında bir alt üniteye sahip olduğu gözlenmiştir. Hemolenfteki lektin aktivitesinin, *Escherichia coli* ile immunizasyonundan sonra arttığı da gözlenmiştir. Richards *et al.* (1989), *Blaberus craniifer* (Dictyoptera) ve *Extatosoma tiaratum* (Phasmida) hemositlerindeki karbohidratların lektin bağlama özelliklerini araştırmışlardır. Hemositlerden granüllü hücrelerin, peroksidazla işaretlenmiş lektinleri bağladığı bildirilmiştir. Richards *et al.* (1988), *E. tiaratum* serumunda heteroaglutininlerin bulunduğunu tesbit etmişlerdir. D-galaktoza spesifik lektinin 72-76 kDa ağırlığında

olduğu ve 12-14 kDa ağırlığındaki alt ünitelerin altı non-kovalent bağla bağlandığını gözlemişlerdir.

Richards ve Ratcliffe (1990), *Extatosoma tiaratum* lektininin, Ca^{2+} iyonlarının varlığında tavşan eritrositlerini agglutine ettiğini gözlemişlerdir. Araştırmacılar, böceğin hemositlerinden granüllü hücrelerin (% 58'i) ve plasmatisitlerin (% 11'i), tavşan kanı eritrositlerinin etrafında roset şekli oluşturduklarını gözlemişlerdir. Pendland ve Boucias (1985), üç Lepidoptera türünün (*Anticarsia gemmatalis*, *Trichoplusia ni* ve *Spodoptera frugiperda*) insan (0 kan grubu), koyun ve tavşan kanı eritrositlerini aglutinasyonunu gözlemişlerdir. *Anticarsia gemmatalis* larvalarının hemolenf lektininin O grubu insan kanı eritrositlerini yüksek oranda titre ile hemaglutine ettiği gözlenmiştir.

Boucias ve Pendland (1993), *Spodoptera exigua* hemolenfindeki galaktoz bağlayan lektinin 100-700 kDa ağırlığında olduğu ve iki alt ünitesinin (33.2 ve 34.4 kDa) bulunduğunu tesbit etmişlerdir. Lektin granüllerinin, granüllü hücrelerde bulunduğunu anti-mouse IgG-gold ile elektron mikroskopunda (TEM) gözlemişlerdir. Mc Kenzie ve Preston (1992, a), *Calliphora vomitoria* larvalarının hemolenfindeki lektinin galaktoza spesifik olduğunu gözlemişlerdir. Çeşitli omurgalı eritrositlerini lektinin hemaglutine ettiği ve bu hemaglutinasyonun D-galaktoz ve fetuin ile güçlü bir şekilde inhibe edildiği tesbit edilmiştir. Yine aynı araştırmacıların (1992, b), *C. vomitoria* larvalarındaki lektinin yaralanma ile veya tuz enjeksiyonu nedeni ile hemaglutinasyon aktivitesi gösterdiğini tesbit etmişlerdir. Lektinin birçok bakteri türünü hemaglutine ettiği ve bu nedenle opsonin gibi hareket ettiği ileri sürülmüştür. Scapigliati and arkadaşları (1997), *Bacillus rossius* hemolenfinde savunma proteininin (BrH1) bulunduğunu ve bira mayaları, bakteriler ile polystrene latex partiküllerini tanıdığı bildirilmiştir.

Lektinlerle yapılan bu araştırmaların doğrultusunda memleketimizin ekonomik zararlıları arasında bulunan *Agrotis segetum* larvalarında ilk defa çalışılan hemolenf lektininin önce belirlenmesi sonra saflaştırılması, molekül ağırlığının tesbit edilmesi, hemaglutinasyonu ve karbohidratlarla hemaglutinasyon inhibisyonu gibi önemli biyolojik özelliklerinin neler olacağı konuları incelenmiştir. Böylece böceğin

humoral başışıklığı konusunda lektinin yeri ve yabancıyı tanıma özelliği belirlenerek biyolojik mücadelede dikkate alınacağı tahmin edilmektedir.



2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Böcek kültürü

Çalışmada kullanılan *A. segetum* bireyleri Etimesgut Şeker Fabrikası'ndan elde edilmiştir. Laboratuvarında *A. segetum* larvaları şeker pancarının (*Beta vulgaris* var. *rapa*) taze yaprakları ile kelebekleri ise %10'luk bal çözeltisi ile beslenmiştir. *A. segetum* bireyleri $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, % 60-65 nem ve 16 saat (uzun gün) fotoperiyot uygulaması yapılan laboratuvar şartlarında beslenmiştir.

2.1.2. Omurgalı kanları

Lektinin hemaglutinasyonu çalışmalarında A (Rh+), B (Rh+), O (Rh+) grubu insan ve tavşan, koyun, at, sığır, tavuk kanları kullanılmıştır. Hayvan kanları Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Bölümünden elde edilmiştir.

2.1.3. Karbohidratlar

Hemaglutinasyonun inhibisyonu deneylerinde, D(+)Fruktoz, D(+)Galaktoz, D(+)Glukoz, D(+)Glukozamin, D(+)Ksiloz, D(+)Laktoz, D(+)Maltoz, D(+)Mannoz, L(+)Riboz, D(+)Rafinoz, D(+)Sükroz, N-Asetil galaktozamin ve N-Asetil glukozamin (Sigma Firmasından alınan) kullanılmıştır.

2.1.4. Glikoproteinler

Hemaglutinasyonun inhibisyonu deneylerinde, Kondroitin Sülfat A, Mucin Type II ve Ovalbumin (Sigma) kullanılmıştır.

2.1.5. Deneylerde kullanılan tamponlar

2.1.5.a PBS (Phosphate Buffer Saline) pH: 7.3

Omurgalı ve insan kanı eritrositlerinin hazırlanmasında, hemaglutinasyon ve hemaglutinasyonun inhibisyonu deneylerinde PBS kullanılmıştır (Lackie, 1981).

8,0 gr	NaCl
0,2 gr	KCl
1,43 gr	Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O
0,2 gr	KH ₂ PO ₄
0,1 gr	Thiomersal
1000 ml	D. su

2.1.5.b BIS (Buffered Insect Saline) pH: 7.9

Affinite kromatografi ve jel filtrasyonu deneylerinde BIS kullanılmıştır (Komano *et al.*, 1980).

130 mM	NaCl
5 mM	KCl
1 mM	CaCl ₂
0,01 mM	Tris- HCl
1000 ml	D. su

2.1.6. Kromatografi jel maddeleri

Affinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Sepharose 4B (Sigma) ve jel filtrasyonunda ise Süperdex 200 (Pharmacia) kullanılmıştır. Kolon dolgu maddelerinden sepharose 4B 16x2,5 cm ve Süperdex 200 26/60 mm boyutlarında cam kolonlara konulmuştur.

2.1.7. Jel elektroforezde (SDS-PAGE) kullanılan marker proteinler

Proteinler MW-SDS-200 koduyla Sigma Firmasından alınmıştır. Proteinlerin adı ve molekül ağırlıkları aşağıda verilmiştir.

Karbonik Anhidraz	29.000 Da
Yumurta Albumini	45.000 Da
Sığır Albumini	66.000 Da
Fosforilaz-b	97.400 Da
β-Galaktosidaz	116.000 Da
Miyozin	205.000 Da

2.1.8. Deneyleerde kullanılan cihaz ve sistemler

Affinite kromatografi çalışmalarında LKB 7000 Ultrorac Fraction Collector cihazı kullanılmıştır. Jel filtrasyonu çalışmalarında Pharmacia Bio Pilot kromatografi sistemi kullanılmıştır. Elektroforez için Pharmacia EPS 500/400 güç kaynağı ve tankı kullanılmıştır. Protein miktarı tayininde Shimadzu UV-1201 Spektrofotometre aleti kullanılmıştır.

Elektron Mikroskobu alışmalarında Jeol 100 CX-II Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılmıştır.

2.2. Metodlar

2.2.1. Hemolenfin hazırlanması

A. segetum'un 5. evre larvalarından hemolenf alınmıştır (Amanai *et al.*, 1991; Drif and Brehelin, 1989; Gomes *et al.*, 1991; Suzuki and Natori, 1983). Hemolenf larvaların 1. abdomen bacağından steril bir toplu iğne ile delinerek alınmıştır. Larvalardan toplanan kan bir miktar 1-phenyl-2-thiourea bulunan santrif tüplerine konulmuş ve 1800 devirde 15 dakika santrifüjlenmiştir (Ingram and Molyneux, 1988). Tüpteki süpernatantlar 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine konularak, daha sonra kullanmak amacıyla -20 C'de saklanmıştır.

2.2.2. Lektin saflaştırma alışmaları

2.2.2.1. Affinite kromatografi

Sepharose 4B kolon dolgu maddesi önce damıtık su ile yıkanarak, kolona konulmuştur. Kolon BIS ile (pH: 8.2) dengelendikten sonra 6 ml hemolenf (BIS'e karşı diyaliz edilmiş) kolona uygulanmıştır. Hemolenf uygulanmadan önce tavuk kanı eritrositlerini hemaglutinasyon aktivitesine bakılmış ve 1:32 titre ile hemaglutinasyon gözlenmiştir. Hemolenf, kolona uygulanmış ve kısımlar +4C'de 0,2 ml/dakikada toplanmıştır. Kolona bağlanmayan proteinler BIS (pH: 8.2) ile yıkanarak kolondan uzaklaştırılmıştır. Kolona bağlanan lektin, 0.2 M Galaktoz + BIS (pH: 8.2) ile kolondan indirilmıştir. Sonra kolona 1 M NaCl ilave edilmiştir. Toplanan kısımların 280 nm'de absorbans değerleri alınmıştır. Absorbans değerleri yüksek olan kısımlar toplanmış ve bunun hemaglutinasyon aktivitesi göstermediği anlaşılmıştır. Bunun zerine lektin rneği bir gece +4C'de BIS ile diyaliz edilerek,

Galaktozdan arındırılmıştır. Diyaliz sonrasında lektin örneğinin tekrar hemaglutinasyon aktivitesi (1:16 titre) gösterdiği tesbit edilmiştir. Aktivite gösteren lektin örneğin -20°C'de daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır (Komano *et al.*, 1980).

2.2.2.2. Jel filtrasyonu

Jel filtrasyonu, hızlı performans likit kromatografisi (FPLC) yöntemine göre yapılmıştır. Süperdex-200 kolon dolgu maddesi önce 1 N NaOH ile yıkanmıştır. Sonra BIS (pH: 8.2) ile dengelenmiş ve kolona 3 ml hemolenf uygulanmıştır. Uygulamadan önce hemolenfin tavuk kanı eritrositlerini hemaglutinasyon aktivitesi 1:32 titre ile gözlenmiştir. Örnekler 2.6 ml/dakika akış hızında tüplerde toplanmıştır. Toplanan örneklerdeki protein miktarı spektrofotometrede 280 nm'de ölçülmüştür. Protein piklerinin hemaglutinasyon aktiviteleri belirlenmiş ve aktif pik örnekleri -20°C'de saklanmıştır (Stebbins and Hapner, 1985).

2.2.3. Jel filtrasyonu ile moleküler kütle tayini

Süperdex-200 kolonu kullanılarak jel filtrasyonu yapılmıştır. Kolon BIS (pH: 8.2) ile dengelendikten sonra, yumurta albumini (45.000 Da), sığır albumini (66.000 Da), karbonik anhidraz (29.000 Da), ve fosforilaz b (97.400 Da) karışımından oluşan marker proteinler 2 ml olarak kolona uygulanmıştır. Sonra kolon BIS ile tekrar dengelenip, Süperdex-200'den saflaştırılan lektin örneği (3 ml) kolona konulmuştur ve bütün kısımlar 2.6 ml/dakika akış hızında toplanmıştır. Toplanan kısımların hacimleri belirlenerek, 280 nm'de absorbans değerlerine bakılmıştır ve buna göre standart grafik elde edilmiştir (Qu *et al.*, 1987).

2.2.4. Jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat-polyakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970)'ye göre yapılmıştır. Proteinler, 2-Merkaptoetanol'lü ve Merkapto-etanol'süz örnek tamponlarında hazırlanıp, on dakika 95°C'de kaynatılarak, denatüre edilmiştir. Örnekler, 1:2 (örnek:tampon) oranında hazırlanıp jele 40 µl hacimde konulmuştur. Sıkıştırma jeli % 4,5 akrilamid, ayırma jeli ise % 12,5'luk akrilamid ihtiva edecek şekilde hazırlanmıştır. Yığma jeline 20 mA, ayırma jeline ise 30 mA elektrik akımı uygulanmıştır (Stebbins and Hapner, 1985).

Jeller gümüş nitrat'la boyanmıştır (Vari and Bell, 1996).

2.2.5. Omurgalı kanlarının hazırlanması

Omurgalı kanları % 0,5'lik sitratlı tüplere steril enjektörle aktarılmıştır. Kanlar, 3 kez PBS ile 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra omurgalı eritrositlerinin PBS ile % 5'lik solusyonu hazırlanmıştır (Lackie, 1981).

2.2.6. Hemaglutinasyon deneyleri

Deneylerde U-tabanlı mikro-titrasyon kablari kullanılmıştır. 25 µl PBS ile 25 µl hemolenf, 1:2'den 1:4096'ya kadar seri olarak sulandırılmış, üzerine 25 µl %5'lik omurgalı eritrositi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında iki saat sonra sonuçlar aglutinasyon titresi olarak kaydedilmiştir (Castro *et al.*, 1987; Lackie, 1981).

2.2.7. Hemaglutinasyonun inhibisyonu deneyleri

Deneylerde kullanılan karbohidratlar 100 mM, 50 mM, 25 mM, 12,5 mM ve 6 mM konsantrasyonda olacak şekilde PBS (pH: 7.9) ile hazırlanmıştır (Lackie, 1981). Glikoproteinlerden Kondroitin Sülfat A %5'lik (Stynen *et al.*, 1982), Yumurta Albumini ve Mucin Type II iki ayrı konsantrasyonda PBS ile hazırlanmıştır (Lackie, 1981). Yumurta Albumini ve Mucin Type II konsantrasyonları 1 mg/ml ve 0,1 mg/ml olarak PBS ile hazırlanmıştır.

İnhibisyon deneyleri, 25 µl hemolenf 25 µl PBS ile 1/2'den 1/4096'ya kadar seri olarak sulandırılmıştır. Sonra 25 µl karbohidrat veya glikoprotein ilave edilerek 37°C'de bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra % 5'lik omurgalı eritrosit süspansiyonu ilave edilerek oda sıcaklığında iki saat bekletilmiş ve inhibisyon sonuçları titre olarak kaydedilmiştir.

2.2.8. Elektron mikroskobu gözlemleri

Elektron mikroskobunda saflaştırılan lektin örnekleri ve hemaglutinasyon örnekleri incelenmiştir. Örnekler, %3'lük Uranil asetat'la boyanan örnekler (Kubo and Natori, 1987), grid üzerinde ve 80 kV'de TEM'de incelenmiştir.

3. BULGULAR

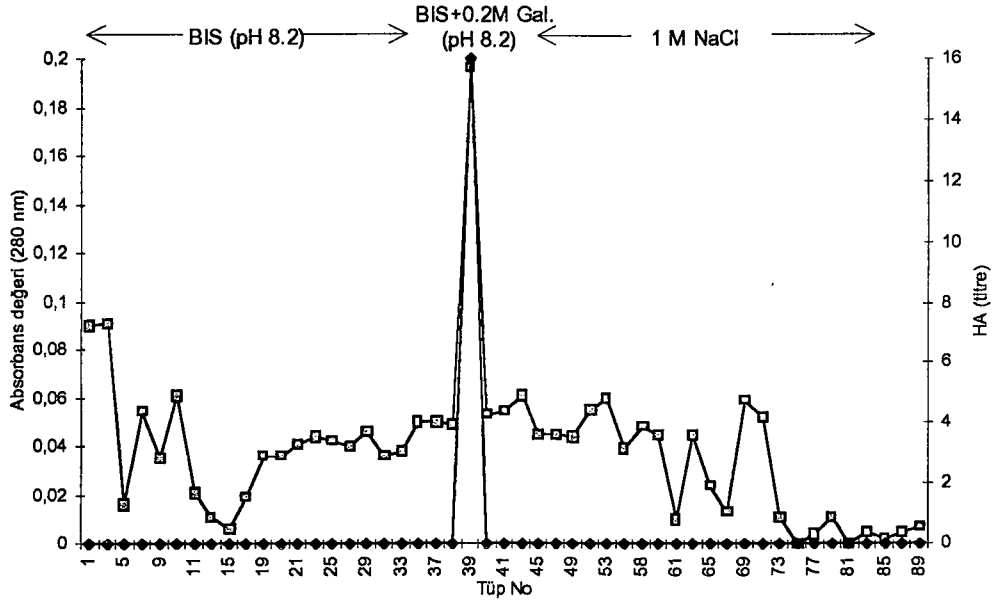
3.1. Lektin Saflaştırılması

Böceğin hemolenfindeki lektin, sepharose-4B kolonu kullanılarak affinite kromatografi ile saflaştırılmıştır. Sepharose 4B kolonuna uygulanan hemolenfe ait önemli bir miktar proteinin bağlanmadan geçtiği, jele bağlanan lektin ise 0,2 M Galaktoz ile elde edilmiştir. Elde edilen proteinin (lektin) hemaglutinasyon aktivitesi, ancak galaktozun BIS tamponunda diyalizle (bir gece) uzaklaştırılması sonucu 1/16 titre ile gözlenmiştir (Şekil 3.1). Saflaştırılan lektinin absorbans değeri (0,196), kolona bağlanmadan ayrılan diğer proteinlerin absorbans değerlerinden daha yüksek olduğu ve kolondan ayrılan proteinlerin hemaglutinasyon aktivitesi olmadığı halde lektinin 1/16 titre ile hemaglutinasyon aktivitesi bulunduğu Şekil 3.1'de görülmektedir.

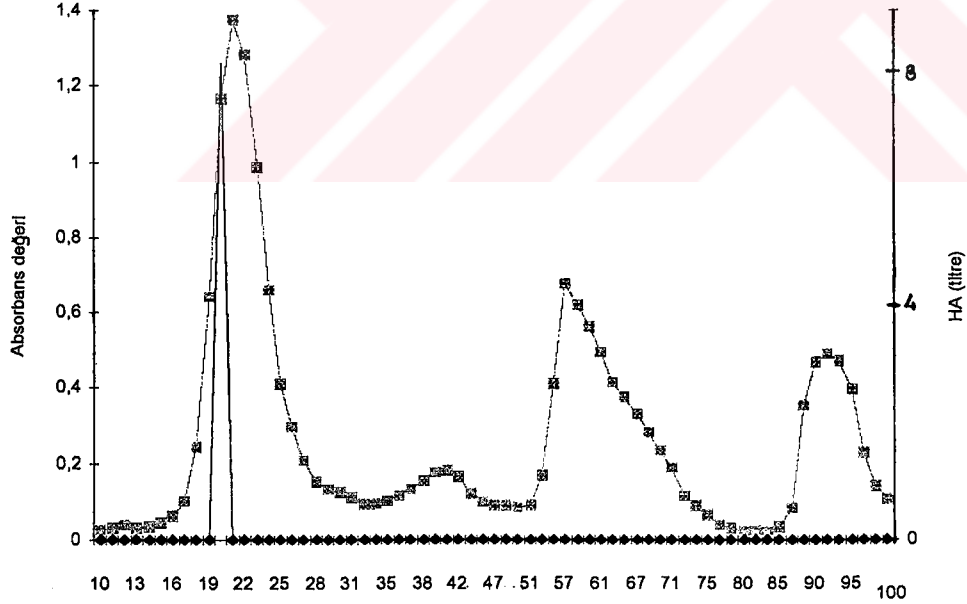
Süperdex-200 kolonunda yapılan jel filtrasyon kromatografi çalışmasında yüksek basınç altında dört büyük protein piki elde edilmiş ve birinci pikte hemaglutinasyon aktivitesi (1/8 titre) gözlenmiştir (Şekil 3.2) ve birinci protein pikinin absorbans değeri 1,373 olarak spektrofotometrede belirlenmiştir.

3.2. Moleküler Kütle Tayini

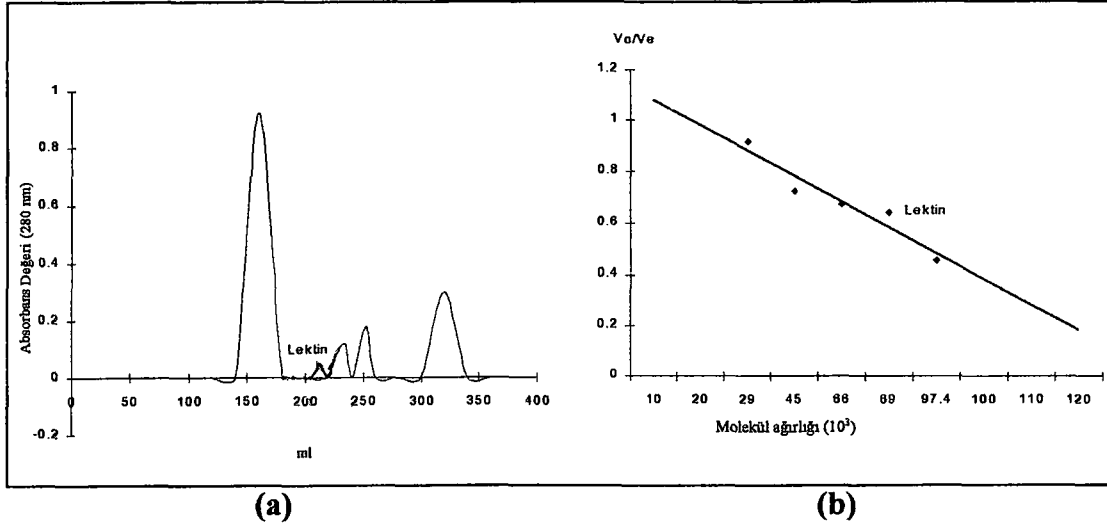
A. segetum hemolenfinden saflaştırılan lektinin moleküler kütleini tesbit etmek amacıyla, Süperdex-200 kolonu BIS (pH: 8.2) ile dengelendikten sonra marker proteinlerin karışımı (fosforilaz b, sığır albumini, yumurta albumini ve karbonik anhidraz) 2 ml hacimde kolona uygulanmıştır. Marker proteinlerin geldiği hacimler kaydedilmiş ve kolon tekrar BIS tamponu ile yıkandıktan sonra, 1 ml saflaştırılmış lektin kolondan geçirilmiştir. Marker proteinlerin çözeltideki konsantrasyonlarına göre 160 ml'de fosforilaz b ($A_{280}:0,910$), 234,6 ml'de sığır albumini ($A_{280}:0,118$), yumurta albumini 252,4 ml'de ($A_{280}:0,180$), karbonik anhidraz 320 ml'de ($A_{280}:0,300$) ve saflaştırılan lektin 224,4 ml'de ($A_{280}:0,060$) kolondan gelmiştir. Marker proteinlerin ve lektinin absorbans değerleri ve hacimlerine göre grafiği elde edilmiştir (Şekil 3.3a). Elde edilen sonuca göre lektinin molekül ağırlığı 69.000 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3b).



Şekil 3.1. Sepharose-4B kolonundan affinite kromatografi yöntemiyle *A. segetum* hemolenf lektinin saflaştırılması.
HA (Hemaglutinasyon Aktivitesi) —●—●—●—
Absorbans Değeri —■—■—■—



Şekil 3.2. Süperdex-200 kolonundan jel filtrasyonu yöntemiyle *A. segetum* hemolenf lektinin saflaştırılması.
HA (Hemaglutinasyon Aktivitesi) —●—●—●—
Absorbans Değeri —■—■—■—

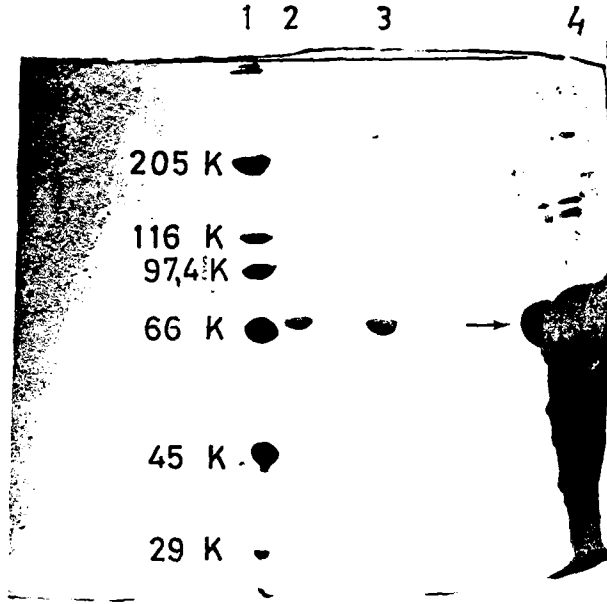


Şekil 3.3 a ve b. Süperdex-200 kolonunda moleküler kütle tayini
Grafik b`de gösterilen V_e kolondan inen marker proteinin hacmi, V_0 ise elusyon tamponunun (B1S) hacmidir.

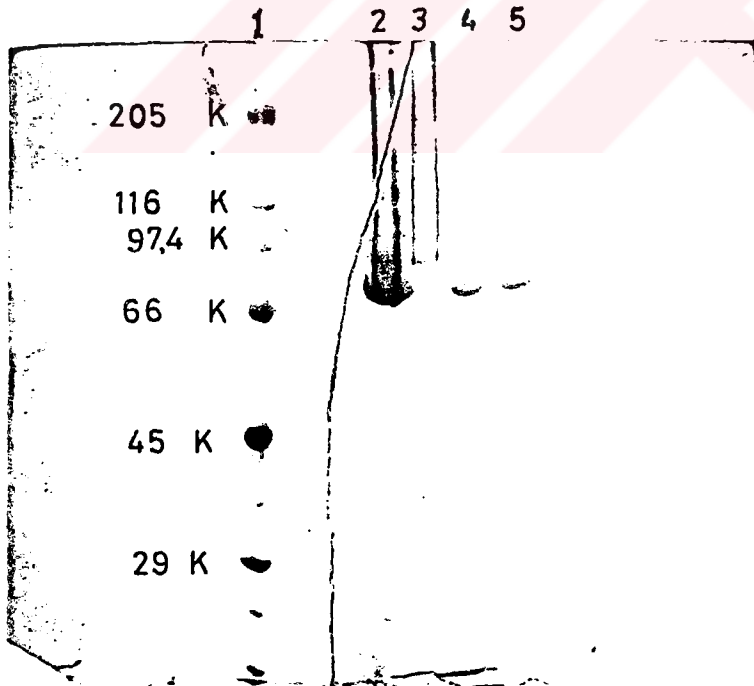
3.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

Saflaştırılan lektin örneğinin moleküler ağırlığını tesbit etmek için, moleküler kütle tayininden başka jel elektrofrezisi yöntemi de denemeye alınmıştır. Süperdex 200 ve Sepharose 4B kolonları ile saflaştırılan lektin örnekleri 2-Merkaptoetanol ile örnek tamponunda hazırlanmıştır. Lektinin poliakrilamid jelde tek band halinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.4). Jel fotoğrafından alınan ölçülerle yapılan hesaplar sonucunda lektinin 69.000 Da moleküler ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 4. sıraya konulan hemolenfde lektinin büyük protein bandı halinde olduğu Şekil 3.4`de görülmektedir.

Lektin örneğinin alt ünitelerinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, saflaştırılan lektin 2-Merkaptoetanol ihtiva eden örnek tamponu ve Merkaptoetanol bulunmayan örnek tamponunda hazırlanarak SDS-poliakrilamid jeline uygulanmıştır. Uygulama sonunda, lektinin alt ünitelerinin olmadığı, sadece tek band halinde jelde yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Sepharose 4B ve Süperdex-200 ile saflaştırılan lektin örneklerinin poliakrilamid jel elektroforezi.
 1. sıra Marker proteinler [Miyozin (205 K), β -Galaktosidaz (116 K), Fosforilaz b (97.4 K), Sığır albumini (66 K), Yumurta albumini (45 K), Karbonik anhidraz (29 K)]
 2. sıra Sepharose-4B ile saflaştırılan lektin örneği
 3. sıra Süperdex-200 ile saflaştırılan lektin örneği
 4. sıra Hemolenf
 → Hemolenfdeki lektin bandı



Şekil 3.5. Saflaştırılmış lektin örneğinin poliakrilamid jel elektroforezi.
 1. sıra Marker proteinler [Miyozin (205K), β -Galaktosidaz (116 K), Fosforilaz b (97.4 K), Sığır albumini (66 K), Yumurta albumini (45 K), Karbonik anhidraz (29 K)]
 2. sıra Sepharose-4B'den saflaştırılan Merkптоetanollu lektin örneği
 3. sıra Sepharose-4B ile saflaştırılan Merkптоetanolsuz lektin örneği
 4. sıra Süperdex-200 ile saflaştırılan Merkптоetanollu lektin örneği
 5. sıra Süperdex-200 ile saflaştırılan Merkптоetanolsuz lektin örneği.

3.4. Hemaglutinasyon Deneyleleri

Çalışmada *A. segetum* larvalarından toplanan hemolenfin in vitro olarak omurgalı ve insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonu araştırılmıştır. *A. segetum*'un hemolenfinde bulunan lektin, omurgalı ve insan kanı eritrositlerini çeşitli titrelerde aglutine etmiştir (Çizelge 3.1). Elde edilen sonuçlara göre, hemaglutinasyon aktivitesi (HA) en yüksek seviyede A (Rh +) grubu insan kanı eritrositlerinin (1/256 titre), düşük seviyede sığır ve at kanı eritrositlerinin (1/4 titre) aglutinasyonunda yaptığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.1. *A. segetum* hemolenfinin omurgalı ve insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonu

Omurgalı ve İnsan Kanı	HA (titre)
Tavuk	32
Tavşan	64
Sığır	4
At	4
Koyun	32
İnsan A (Rh +).....	256
B (Rh +).....	64
O (Rh +).....	16

3.5. Hemaglutinasyonun İnhibisyonu Deneyleleri

Çeşitli karbohidrat ve glikoproteinlerin *A. segetum* hemolenfindeki lektinin omurgalı ve insan eritrositlerini hemaglutinasyonunu inhibisyonu denemeleri in vitro olarak yapılmıştır. Karbohidratlar ve glikoproteinler değişik konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. İnhibitör olarak kullanılan karbohidrat birimlerinin 100 mM, 50 mM, 25 mM, 12,5 mM ve 6 mM, glikoproteinlerin ise % 5'lik, 1 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarının çeşitli omurgalı eritrositlerinin hemolenf lektini tarafından aglutinasyonunun inhibisyonları verilmiştir (Çizelge 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7).

Çizelge 3.2. *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini hem aglutinasyonunu 100 mM'lık karbohidratların inhibisyonu.

İnhibitör Karbohidratlar	ERİTROSİT TİPLERİ							
	100 mM	İnsan (A)	İnsan (B)	İnsan (O)	At	Tavşan	Sığır	Koyun
N- Asetil galaktozamin	128	2*	64	2	16	4	0*	16
N- Asetil glukozamin	512	4	128	2	4	2	32	32
D- Fruktoz	256	16	256	4	16	4	64	8
D- Galaktoz	32*	4	8	0*	2*	2	32	0*
D- Glukoz	128	64	512	4	8	4	32	2
D- Glukozamin	1024	16	64	4	8	2	8	32
D- Ksiloz	4096	8	32	2	4	2	16	2
D- Laktoz	64	2*	4*	2	4	0*	4	0*
D- Maltoz	256	16	128	0*	4	0*	16	2
D- Mannoz	512	16	256	2	4	2	8	2
D- Rafinoz	256	32	256	4	64	0*	16	0*
L- Riboz	128	32	512	2	4	2	8	2
D- Sükroz	2048	32	256	4	32	4	32	8

* işareti: Etkili karbohidrat.

Çizelge 3.2'de verilen değerlere (titre olarak) göre *A. segetum* hemolenfinin A grubu insan kanı hemaglutinasyonunu D-galaktoz; B grubu insan kanı hemaglutinasyonunu N-asetil galaktozamin ve D-laktoz; O grubu insan kanı hemaglutinasyonunu D-laktoz; at kanı hemaglutinasyonunu D-galaktoz ve D-maltoz; tavşan kanı hemaglutinasyonunu D-galaktoz; sığır kanı hemaglutinasyonunu D-laktoz, D-maltoz ve D-rafinoz; koyun kanı hemaglutinasyonunu N-asetil galaktozamin; tavuk kanı hemaglutinasyonunu D-galaktoz, D-laktoz ve D-rafinoz inhibe etmiştir. *A. segetum* hemolenfindeki lektinin omurgalı eritrositlerini hemaglutinasyonunu en çok D-galaktoz ve D-laktoz inhibe etmektedir. Buna karşılık bazı karbohidratların inhibisyonda etkili olmadığı gözlenmiştir. Örneğin A grubu

insan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu D-glukozamin, D-ksiloz ve D-sükroz; B grubu insan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu D-glukoz; O kan grubu eritrositlerinin hemaglutinasyonunu D-glukoz ve L-riboz; tavşan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu D-rafinoz; koyun kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu D-fruktozun etkili bir şekilde inhibe etmediği gözlenmiştir.

Çizelge 3.3. *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini hem aglutinasyonunu 50 mM'lık karbohidratların inhibisyonu.

İnhibitör Karbohidratlar	ERİTROSİT TİPLERİ								
	50 mM	İnsan (A)	İnsan (B)	İnsan (O)	At	Tavşan	Sığır	Koyun	Tavuk
N- Asetil galaktozamin	16	128	128	128	0*	8	4	0*	8
N- Asetil glukozamin	8	256	128	128	0*	8	4	8	8
D- Fruktoz	64	128	128	128	4	8	2	64	32
D- Galaktoz	32	32	64	64	4	4	0*	32	2
D- Glukoz	64	64	64	64	2	8	2	64	4
D- Glukozamin	2	64	32	32	0*	4	4	4	8
D- Ksiloz	32	64	32	32	2	4	2	8	4
D- Laktoz	4*	0*	4*	4*	2	2*	2	4	0*
D- Maltoz	16	32	32	32	2	8	2	4	0*
D- Mannoza	8	32	32	32	0*	16	2	8	4
D- Rafinoz	128	256	256	256	2	32	0*	16	4
L- Riboz	32	32	64	64	2	4	2	4	4
D- Sükroz	256	512	64	64	2	16	2	32	16

* işareti: Etkili karbohidrat.

50 mM'lık karbohidrat inhibisyonunda yine D-laktozun çeşitli omurgalı eritrositlerini 0'dan 4'e kadar değişik titrelerde en çok inhibe ettiği göze çarpmaktadır (Çizelge 3.3). Bazı omurgalı eritrositlerinin örneğin at ve koyun eritrositlerinin *A. segetum* hemolenf lektinin aglutinasyonunu N-asetil galaktozamin; yine at kanı aglutinasyonunu N-asetil glukozamin, D-glukozamin, D-mannoza; tavuk kanı aglutinasyonunu D-maltoz; sığır kanı aglutinasyonunu D-rafinoz, D-galaktoz'un inhibe ettiği dikkati çekmektedir (Çizelge 3.3). Çizelgede görüldüğü gibi bazı karbohidratlar hemaglutinasyonu inhibe edememiştir. Örneğin, D-fruktoz, D-glukoz, D-ksiloz, D-sükroz ve L-riboz hemaglutinasyonun inhibisyonunda etkili olamamıştır.

Çizelge 3.4. *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini hem aglutinasyonunu 25 mM'lık karbohidratların inhibisyonu.

İnhibitör Karbohidratlar	ERİTROSİT TİPLERİ							
	25 mM	İnsan (A)	İnsan (B)	İnsan (O)	At	Tavşan	Sığır	Koyun
N- Asetil galaktozamin	16	8	256	8	32	0*	0*	16
N- Asetil glukozamin	32	8	128	8	64	2	32	16
D- Fruktoz	4*	64	16	2	8	2	64	16
D- Galaktoz	32	8	16	2	4	0*	64	8
D- Glukoz	64	64	64	2	8	2	32	8
D- Glukozamin	32	32	64	2	16	2	32	16
D- Ksiloz	32	64	32	4	8	2	16	8
D- Laktoz	4	2*	4*	0*	8	0*	64	2*
D- Maltoz	8	16	128	4	16	2	16	8
D- Mannoza	8	256	64	0*	8	2	16	4
D- Rafinoz	128	32	32	4	8	0*	256	2*
L- Riboz	32	512	256	0*	4	2	16	4
D- Sükroz	16	128	32	4	2	2	64	32

* işareti: Etkili karbohidrat.

25 mM'lık karbohidratların *A. segetum* hemolenf lektininin çeşitli omurgalı eritrositlerini hemaglutinasyonunu inhibisyonu Çizelge 3.4'de verilmiştir. Çizelgeye göre D-laktoz etkili bir biçimde hemaglutinasyonu inhibe etmektedir. Bunun yanısıra N-asetil galaktozamin sığır ve koyun kanı eritrositlerinin, L-riboz at kanı eritrositlerinin, D-mannoza at kanı eritrositlerinin, D-rafinoz sığır ve tavuk kanı eritrositlerinin, D-fruktoz A grubu insan kanı eritrositlerinin, D-galaktoz ise sığır kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonlarını inhibe ettiği gözlenmiştir. Çizelgede yer alan karbohidratlardan D-glukoz, D-glukozamin, D-ksiloz, D-maltoz ve D-sükroz'un omurgalı kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu inhibe etmediği tesbit edilmiştir.

Çizelge 3.5. *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini hem aglutinasyonunu 12.5 mM'lık karbohidratların inhibisyonu.

İnhibitör Karbohidratlar	ERİTROSİT TIPLERİ							
	İnsan (A)	İnsan (B)	İnsan (O)	At	Tavşan	Sığır	Koyun	Tavuk
12.5 mM								
N- Asetil galaktozamin	16	128	512	4	2	2	0*	16
N- Asetil glukozamin	4*	256	256	4	4	2	16	16
D- Fruktoz	256	128	64	2	8	2	16	32
D- Galaktoz	64	32	32	2	2	2	32	8
D- Glukoz	64	64	128	2	2	2	16	16
D- Glukozamin	16	64	256	8	2	2	16	16
D- Ksiloz	32	64	256	4	2	2	8	8
D- Laktoz	8	0*	8*	4	0*	0*	8	0*
D- Maltoz	16	32	256	4	2	2	16	8
D- Mannoz	16	32	64	4	2	2	8	2
D- Rafinoz	1024	256	64	2	4	2	32	2
L- Riboz	16	32	256	4	2	2	8	8
D- Sükroz	256	512	32	2	4	2	16	32

* işareti: Etkili karbohidrat.

12.5 mM'lık karbohidratların inhibisyonunda yine D-laktoz'un etkili olduğu, bunun yanı sıra N-asetil galaktozamin'in (0 titre ile) koyun kanı, N-asetil glukozamin'in (1:4 titre ile) A grubu insan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Çizelge 3.5). Diğer karbohidratların inhibisyonunda etkili olmadığı Çizelge 3.5'de görülmektedir. Özellikle A grubu insan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunda D-rafinoz'un (1:1024 titre) en az seviyede etkili olduğu gözlenmektedir.

Çizelge 3.6. *A. segetum* hemolenfinin çeşitli omurgalı eritrositlerini hem aglutinasyonunu 6 mM'lık karbohidratların inhibisyonu.

İnhibitör Karbohidratlar	ERİTROSİT TIPLERİ							
	İnsan (A)	İnsan (B)	İnsan (O)	At	Tavşan	Sığır	Koyun	Tavuk
6 mM								
N- Asetil galaktozamin	8	128	64	2	2	2	0*	16
N- Asetil glukozamin	8	256	64	4	2	2	16	16
D- Fruktoz	64	32	8	2	2	2	16	32
D- Galaktoz	64	32	4*	2	4	2	32	8
D- Glukoz	64	32	8	0*	4	4	16	16
D- Glukozamin	8	32	32	2	2	2	8	8
D- Ksiloz	8	64	16	4	4	2	8	8
D- Laktoz	4*	64	256	2	0*	0*	4	0*
D- Maltoz	16	64	64	2	2	2	8	8
D- Mannoz	8	32	32	2	2	2	8	4
D- Rafinoz	128	32	16	2	4	2	16	2
L- Riboz	16	32	32	2	2	2	8	4
D- Sükroz	64	16*	8	2	4	2	16	64

* işareti: Etkili karbohidrat.

A. segetum hemolenf lektininin omurgalı kanı eritrositlerini hemaglutinasyonu inhibisyonunda 6 mM'lık karbohidrat birimlerinden başta D-laktoz olmak üzere N-asetil galaktozamin (koyun kanında), D-sükroz (B grubu insan kanında), D-glukoz (at kanında) ve D-galaktoz (O grubu insan kanında) ile etkili olmuştur (Çizelge 3.6). Çizelgede görüldüğü gibi bazı karbohidratlar (D-fruktoz, D-glukozamin, D-ksiloz, D-mannoz, D-rafinoz, D-riboz, N-asetil glukozamin)inhibisyonunda etkili olamamıştır.

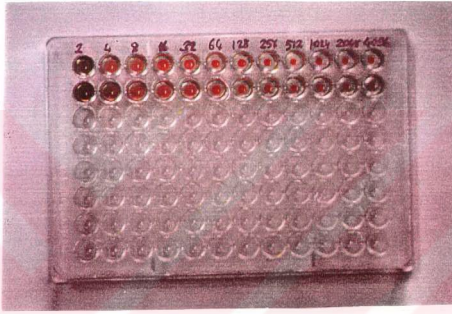
Çizelge 3.7. Glikoproteinlerin, *A. segetum* hemolenf lektininin çeşitli omurgalı ve insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu inhibisyonu.

Glikoproteinler	A	B	O	At	Tavşan	Koyun	Sığır	Tavuk
% 15'lik Kondroitin Sülfat A	4096	4096	256	32	16	32	0*	2
1 mg/ml Mucin	0*	0*	0*	4	2	8	0*	4096
0,1 mg/ml Mucin	4	4	0*	16	4	8	0*	0*
1 mg/ml Ovalbumin	32	4	32	4	2	4096	4096	2
0,1 mg/ml Ovalbumin	32	4	64	8	2	4096	4096	4

Glikoproteinlerin omurgalı ve insan kanı eritrositlerinin *A. segetum* hemolenfi tarafından hemaglutinasyonu Çizelge 3.7'de görülmektedir. Sonuçlar dikkate alındığında 1 mg/ml sığır mucin'inin A, B ve O grubu insan ve sığır kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu inhibe ettiği gözlenmektedir. 0,1 mg/ml sığır mucin'in O grubu insan, sığır ve tavuk kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu 0 titre ile inhibisyonu gözlenmiştir. Kondroitin Sülfat A'nın sadece sığır kanı eritrositleri hemaglutinasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Yumurta albuminin *A. segetum* hemolenf lektininin omurgalı (koyun ve sığır kanında 1/4096 inhibisyon titresiyile) ve insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu inhibe etmediği gözlenmiştir.

İnhibisyon sonuçlarını genel olarak ele aldığımız zaman (Çizelgelere göre) karbohidratlardan öncelikle D-laktoz (en etkili olanı) olmak üzere D-fruktoz, D-galaktoz, D-glukoz, D-maltoz, D-mannoz, D-rafinoz, L-riboz, N-asetil galaktozamin ve N-asetil glukozamin'in insan ve omurgalı kanı eritrositlerini *A. segetum* hemolenf lektininin hemaglutinasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Glikoproteinlerden Kondroitin Sülfat A ve mucinin *A. segetum*'un hemaglutinasyonunu inhibe etmiştir. Yapılan hemaglutinasyon deneylerinden A grubu insan kanı eritrositlerinin 1/256 titre ile hemaglutinasyonunun (Şekil 3.6) ve inhibisyon deneylerinden 100 mM'lık karbohidrat birimleri ve glikoproteinlerin (Kondroitin Sülfat A ve Mucin'in) tavuk

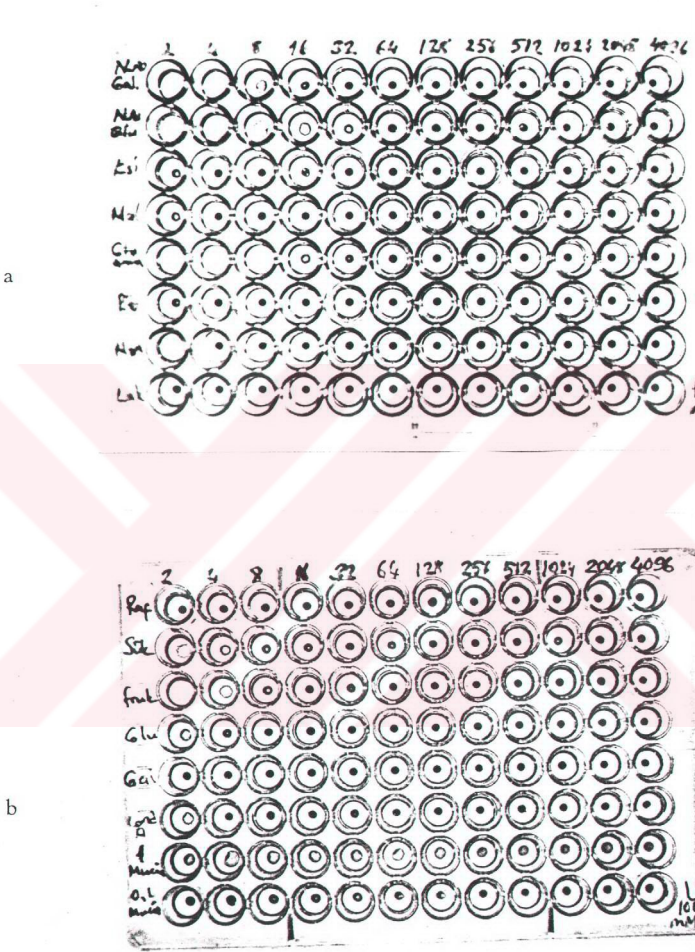
kani hemaglutinasyonu inhibisyonunun (Şekil 3.7a ve 3.7b) fotoğrafları örnek olarak çekilmiştir.



Şekil 3.6. A grubu insan kanı eritrositlerinin *A. segetum* hemolenf lektini ile hemaglutinasyonu.

3.6. Elektron Mikroskobu (TEM) Çalışmaları

Saflaştırılan lektin ve hemaglutinasyon deneylerinden alınan örnekler, grid üzerine alınarak TEM’de incelenmiştir. Lektinin ince yapısı hakkında bilgi edinmek amacıyla TEM’de inceleme yapılmıştır. Saflaştırılan lektinin ağısı (retiküler) yapı gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 3.8). Retiküler yapıdaki lektinin globüler (küresel) yapıdaki birimlerden meydana görülmüştür. Bu birimlerin birbiri ardına veya dallanmalar yaparak dizilmiş olduğu TEM’de gözlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.7a. 100 mM'lık karbohidratların (N-asetil galaktozamin'den laktöz'a kadar) tavuk kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu inhibe etmesi

b. 100 mM'lık karbohidratlar (Rafinoz'dan Galaktoz'a kadar) ve Kondrotin Sülfat A, 1 mg/ml mucin ve 0,1 mg/ml mucin'in tavuk kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunu inhibe etmesi.

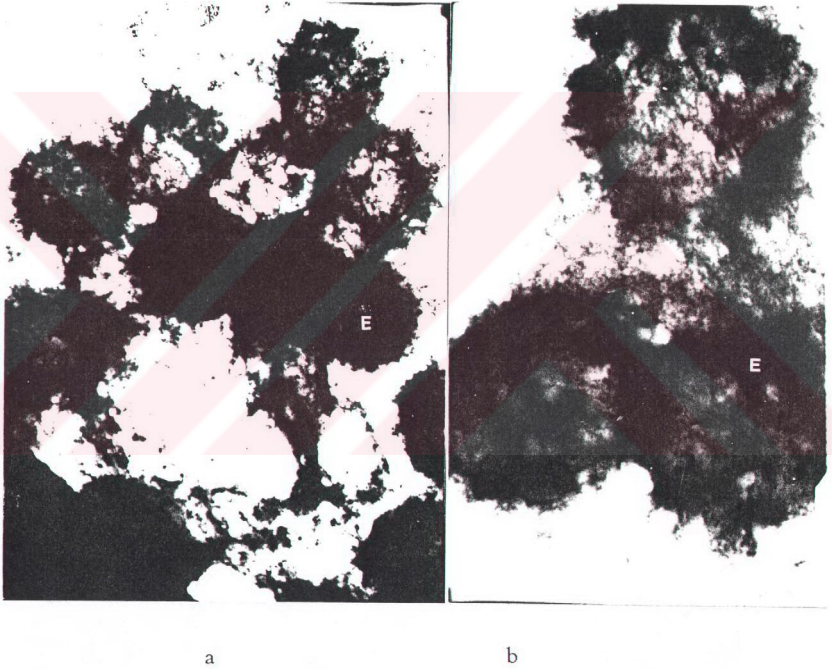


Şekil 3.8. Saflaştırılan lektin X 8.200.



Şekil 3.9. Saflaştırılan lektinin birim yapıları X 68.500.

U- tabanlı mikro titre kaplarında yapılan *A. segetum*'dan saflaştırılan hemolenf lektininin 0 grubu insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonu deneylerinin pozitif sonuç veren örnekleri grid üzerinde TEM'de incelenmiştir. *A. segetum* hemolenfinden saflaştırılmış lektinler nedeniyle eritrositlerin birbirine bağlandığı ve hemaglutinasyonun meydana geldiği TEM fotoğraflarında görülmektedir (Şekil 3.10).



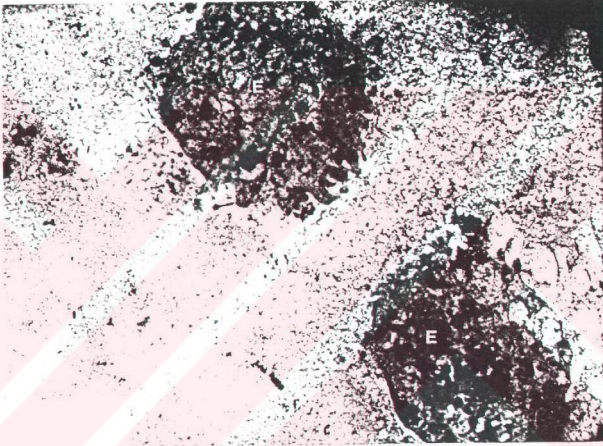
Şekil 3.10. Saflaştırılan lektininin 0 grubu insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunun TEM'deki görüntüsü.

a) 4.500 büyütmedeki hemaglutinasyon;

b) 9.000 büyütmedeki hemaglutinasyon

E. Eritrosit

A. segetum'un hemolenf lektininin olmadığı, yani PBS ve eritrositlerin bulunduğu negatif sonuç elde edilen hemaglutinasyondan alınan örnekler TEM'de incelenmiştir. Yapılan incelemede eritrositlerin birbirine bağlanmadığı ve ayrı ayrı yerlerde olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Hemaglutine olmayan eritrositler.

X 5.400 E. Eritrosit

4. TARTIŞMA

A. segetum 5. Evre larvalarından Sepharose-4B kolonuyla affinite kromatografi ve Süperdex-200 kolonuyla jel filtrasyonu yöntemleri kullanılarak, lektin saflaştırılmıştır. SDS-poliakrilamid jel ve jel filtrasyonu yöntemleri kullanılarak, saflaştırılmış hemolenf lektininin molekül ağırlığı tesbit edilmeye çalışılmıştır. Lektin SDS-PAGE'e uygulanmadan önce 2-Merkaptoetanolle redüklenmiş ve redüklenmemiş olarak hazırlanmıştır. Yapılan deney sonucunda redüklenen ve redüklenmeyen lektin örneklerinin aynı molekül ağırlığında (69.000 Da) bant verdiği gözlenmiştir.

Limulus polyphemus (at nalı yengeci)'un hemolenf lektininin Sephadex G200 kolonuyla (jel filtrasyonu) saflaştırıldığı bildirilmiştir. Araştırmada lektinin 400.000 Da molekül ağırlığına sahip olduğu tesbit edilmiştir. Saflaştırılan lektin, 8M üre ile diyaliz edilmiş ve 6M üre ihtiva eden 1M propiyonik asit ile dengelenen Sephadex G100 kolonundan (jel filtrasyonu) geçirilmiştir. Kolondan geçirilen lektinin nişasta jelinde 22.500 Da ağırlığa sahip bant verdiği gözlenmiştir. 22.500 Da ağırlığındaki lektin alt ünitelerinin non-kovalent bağlarla bağlandığı öne sürülmüştür (Marchalonis and Edelman, 1968).

Kerevit (*Pasifastacus leniusculus*) plasmasından Fetuin-Sepharose 4B kolonuyla (affinite kromatografi) saflaştırılmıştır. Lektin, SDS-Poliakrilamid jelle redüklenmeden uygulandığında 420.000 Da ağırlığına sahip bant oluşturduğu gözlenmiştir. Lektin, Dithiothreitol (DTT) ile redüklendiği zaman jel'de 65.000 ve 80.000 Da ağırlıklarına sahip iki alt ünite oluşturduğu gözlenmiştir (Kopacek et al, 1993).

Deniz kestanesi (*Anthocidaris crassispina*) sölomik sıvısından multimerik yapıya sahip lektin DEAE-selüloz kolonu (kolon kromatografi) ile saflaştırılmıştır. Lektinin 2-Merkaptoetanolle redüklendiğinde SDS-poliakrilamid jelde 13.000 Da ağırlığında bant, redüklenmediğinde ise 26.000 Da ağırlığında bant verdiği gözlenmiştir. Sedimentasyonla dengeleme analizlerinde ise 300.000 Da ağırlığında bir molekül olduğu gözlenmiştir (Giga et al., 1985).

Yukarıda at nalı yengeci, kerevit ve deniz kestanesine ait lektin molekül ağırlıkları omurgasız hayvanlara örnek olarak verilmiştir. Çalışmada materyal olarak

kullanılan *A. segetum* bir böcek örneği olduğu için lektini incelenmiş ve diğer böceklerdeki lektin molekülünün molekül ağırlığı açısından karşılaştırması yapılmıştır. *Sarcophaga peregrina* (hamam böceği) larvalarının vücut duvarları aşlandıktan sonra lektin saflaştırılmıştır. Aktif lektinin 190.000 Da ağırlığında bir bant oluşturduğu, SDS-poliakrilamid jelde gözlenmiştir. Merkaptotanol (% 2'lik) ve SDS (%1'lik) ile kaynatılarak denatüre edilen lektinin, SDS-PAGE'de dört α alt ünitesi (32.000 Da) ve iki β alt ünitesine (30.000 Da) sahip olduğu belirtilmiştir (Komano *et al.*, 1980). *Melanoplus sanguinipes* (Çekirge) hemolenfinden Sepharose-galaktoz kolonu (affinite kromatografi) kullanılarak lektin izole edilmiştir (Stebbins and Hapner, 1985). Jel filtrasyonu ve elektroforez yöntemleriyle lektinin 600-700.000 molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. Lektinin 70.000 Da ağırlığında alt ünitelere sahip olduğu ve bu alt ünitelerin disülfid bağlarıyla bağlanmış 40.000 ve 28.000 molekül ağırlığına sahip polipeptid zincirlerinden oluştuğu gözlenmiştir. *Periplaneta americana* (Amerikan hamam böceği) hemolenfinden sığır tükürük bezleri mucin kullanılmış kolon dolgu maddesi ile (affinite kromatografi) büyük bir molekül ağırlıklı lektin saflaştırılmıştır. Bu lektinin SDS-PAGE'de 1500 kDa ağırlığında olduğu tesbit edilmiştir. Lektin denatüre edildikten sonra jele uygulandığında 30.000 Da molekül ağırlığına sahip bir alt ünitesinin bulunduğu tesbit edilmiştir (Kubo and Natori, 1987). *Glossina fuscipes fuscipes* (sinek) hemolenfinden bulunan lektinin 710.000 Da ağırlığında olduğu bildirilmiştir. Lektin % 5 SDS ve % 10 β -2-Merkaptotanol içeren örnek tamponda 100 °C de 5 dakika kaynatılarak denatüre edilmiş ve SDS-PAGE'e uygulanmıştır. Deneysel sonucu lektinin 70.000 molekül ağırlığına sahip alt ünitelerinin bulunduğu tesbit edilmiştir (Ingram and Molyneux, 1990). *Calliphora vomitoria* larvalarının hemolenfinden FPLC jel filtrasyonu ile saflaştırılan lektinin 130.000 Da ağırlığında olduğu tesbit edilmiştir. Doğal formunun non-kovalent bağlarla bağlanmış tetramer olabileceği ileri sürülmüştür. Lektinin redüklendiği zaman 32.000 Da ağırlığında alt ünitelere sahip olduğu SDS-PAGE ile tesbit edilmiştir (McKenzie and Preston, 1992a). *Extatosoma tiaratum* hemolenfinden D-galaktoza spesifik lektin affinite kromatografi ve jel filtrasyonu ile saflaştırılmıştır. 71.000-76.000 Da ağırlığındaki lektinin non-kovalent bağla bağlanan altı adet 12.000-14.000 Da ağırlığında alt ünitelere sahip olduğu gözlenmiştir (Richards *et al.*, 1988). *Spodoptera exigua* (şeker tırtılı) hemolenfindeki

galaktoz bağlayan lektin, affinite kromatografi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan lektinin 100.000-700.000 Da ağırlığında büyük molekül ağırlığı olan agregatlar oluşturduğu gözlenmiştir. SDS-PAGE preparasyonlarıyla, lektinin 33.200 Da ve 34.400 Da ağırlığında iki alt üniteye sahip olduğu belirlenmiştir (Boucias and Pendland, 1993). *Hyalophora cecropia* (gece ipek böceği) hemolenfinden D-Galaktoz/ N-asetil-Sepharose kolon kromatografisi ile lektin saflaştırılmıştır. Saflaştırılan lektinin 160.000 Da ağırlığında olduğu ve SDS-PAGE'de denatüre edilen lektinin 41.000 Da (α alt ünitesi) ve 38.000 Da (β alt ünitesi) ağırlıklarına sahip alt üniteleri tesbit edilmiştir. Lektin alt ünitelerinin tetramerlerden oluşabileceği öne sürülmüştür (Castro *et al.*, 1983). *Antheraea pernyi* (Çin meşesi ipek böceği) hemolenfinden 380.000 Da ağırlığa sahip lektin izole edilmiştir. SDS ve 2-Merkaptoetanolla redüklenen lektinin, 380.000 Da ağırlığa ve oligomerik yapıya sahip alt ünitesi olduğu tesbit edilmiştir (Qu *et al.*, 1987).

Yukarıda bahsedilen çeşitli omurgasız hayvanların değişik molekül ağırlıklarına sahip hemolenf lektinlerinin bulunduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.1). Lektinler, affinite kromatografi veya jel filtrasyonu ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan lektinin, SDS, 2-Merkaptoetanol, üre veya DTT ile denatüre edildiğinde SDS-PAGE de gözleendiği üzere alt ünitelerine ayrıldığı bildirilmiştir (Çizelge 4.1). Oysa *A. segetum* hemolenf lektinin (69.000 Da) 2- Merkaptoetanolla redüklediği halde SDS-PAGE de alt ünitelerine ayrılmadığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 3.5 ve Çizelge 4.1).

Bombyx mori (ipek böceği) 5. evre larvalarından jel filtrasyonu (Sephacryl S-300) ile hemolenf lektini saflaştırılmıştır. Lektin molekül ağırlığı 260.000 Da olarak tesbit edilmiştir. SDS ve 2-Merkaptoetanolla redüklenen lektinin SDS-PAGE'de alt ünitelerine ayrılmadığı gözlenmiştir (Suzuki and Natori, 1983). Aynı böceğin yine 5. evre larvasından 350.000 Da ağırlığında lektin saflaştırılmıştır. SDS (% 1'lik) ve 2-Merkaptoetanolla (% 2'lik) redüklenen lektinin SDS-PAGE'de alt ünitelerine ayrılmadığı belirlenmiştir (Amanai *et al.*, 1991). *B. mori* larvalarından izole edilen lektinin SDS ve 2-Merkaptoetanolla redüklenmesine rağmen SDS-PAGE'de alt ünitelerine ayrılmadığı değişik araştırmacılar (Suzuki and Natori, 1983; Amanai *et al.*, 1991) tarafından ifade edilmiştir. *A. segetum* 5. evre larva hemolenf lektininin 2-Merkaptoetanolla redüklenmesine rağmen *B. mori* larvalarının hemolenf lektini gibi SDS-PAGE'de alt ünitelerine ayrılmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Bazı omurgasız hayvan lektinleri ve alt üniteleri.

Omurgasız Hayvan	Lektin	Alt Üniteler	Literatür
<i>Limulus polyphemus</i>	400.000 Da	22.500 Da	Marchalonis and Edelman, 1968
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	420.000 Da	65.000 ve 80.000 Da	Kopacek <i>et al.</i> , 1993
<i>Anthocidaris crassispina</i>	26.000 Da		Giga <i>et al.</i> , 1985
<i>Sarcophaga peregrina</i>	190.000 Da	32.000 ve 30.000 Da	Komano <i>et al.</i> , 1980
<i>Melanoplus sanguinipes</i>	600-700.000 Da	70.000 Da	Stebbins and Hapner, 1985
<i>Periplaneta americana</i>	1.500.000 Da	30.000 Da	Kubo and Natori, 1987
<i>Glossina fuscipes fuscipes</i>	710.000 Da	70.000 Da	Ingram and Molyneux, 1990
<i>Calliphora vomitoria</i>	130.000 Da	32.000 Da	Mc Kenzie and Preston, 1992a
<i>Extatosoma tiaratum</i>	72.000-76.000 Da	33.200 Da ve 34.400 Da	Richards <i>et al.</i> , 1988
<i>Hyalophora cecropia</i>	160.000 Da	41.000 Da ve 38.000 Da	Castro <i>et al.</i> , 1983
<i>Antheraea pernyi</i>	380.000 Da	38.000 Da	Qu <i>et al.</i> , 1987
<i>Bombyx mori</i>	260.000 Da	Yok	Suzuki and Natori, 1983
<i>Bombyx mori</i>	350.000 Da	Yok	Amanai, <i>et al.</i> , 1991
<i>Agrotis segetum</i>	69.000 Da	Yok	

A. segetum 5. evre larvalarının hemolenf lektini in vitroda yabancı ajan olarak kullanılan tavşan, at, sığır, koyun, tavuk ve A, B, O grubu insan kanı eritrositlerini çeşitli titrelerde hemaglutine etmiştir (Bkz. Çizelge 3.1).

Hemolenf lektininin biyolojik fonksiyonu olarak bilinen hemaglutinasyon aktivitesi bazı omurgasız hayvan türlerinde incelenmiştir. Örneğin, *Pacifastacus leniusculus* (kerevit) plasma lektini A, B, O grubu insan kanı eritrositlerini 1:4 titre ile; at, sığır, tavuk kanı eritrositlerini 1:2 titre ile tavşan kanını ise diğerlerine göre yüksek titre ile yani 1:64 titre ile hemaglutine ettiği bildirilmiştir (Kopacek *et al.*, 1993).

Böcek örneklerinden *Melanoplus bivittatus* (çekirge) hemolenf lektininin O grubu insan kanı eritrositlerini 1:64, A grubu insan kanı eritrositlerini 1:32, B grubu insan kanı eritrositlerini 1:128, sığır kanı eritrositlerini 1:2, tavuk kanı eritrositlerini

1:2, at kanı eritrositlerini 0, tavşan kanı eritrositlerini 1:128, koyun kanı eritrositlerini 0 titre hemaglutine ettiği gözlenmiştir (Hapner, 1983). *Locusta migratoria* (çekirge) 5. evre larvalarının hemolenf lektini A, B, O grubu insan kanı eritrositlerini 0, tavşan kanı eritrositlerini 1:4096 ve tavuk kanı eritrositlerini 0 titre ile hemaglutine ettiği gözlenmiştir (Drif and Brehelin, 1989). *Leptinotarsa decemlineata* larvalarının hemolenf lektini A, B, O grubu insan kanı eritrositlerini 1:128, tavşan kanı eritrositlerini 1:256 ve at kanı eritrositlerini 1:32 titre ile hemaglutine ettiği rapor edilmiştir (Stynen *et al.*, 1982). *Calliphora vomitoria* larvalarının hemolenf lektini insan kanı A grubu eritrositlerini 1:256, B grubu eritrositlerini 1:1024, O grubu eritrositlerini 1:512, koyun kanı eritrositlerini 1:4096 titre hemaglutine ettiği tesbit edilmiştir (Mc Kenzie and Preston, 1992a). *Hyalophora cecropia* hemolenfindeki lektinin insan kanı eritrositlerini A grubu 1:32, B grubu 1:64, O grubu 1:32, sığır kanı eritrositlerini 1:32, koyun kanı eritrositlerini 1:4, tavşan kanı eritrositlerini 1:512 ve tavuk kanı eritrositlerini 1:2 titre aglutine ettiği gözlenmiştir (Castro *et al.*, 1987). *Extatosoma tiaratum* serum lektini insan kanı A, B, O grubu eritrositlerini 1:32, at kanı eritrositlerini 1:64, tavşan eritrositlerini 1:2048, sığır kanı eritrositlerini 1:32, koyun kanı eritrositlerini 1:16, tavuk kanı eritrositlerini 1:4 titre ile aglutine ettiği gözlenmiştir (Richards *et al.*, 1988).

Yukarıdaki araştırmalarda kullanılan omurgalı eritrositlerinden ortak olarak kullanılan tavşan eritrositlerinin 1:64 den 1:4096 titre ile hemaglutine olduğu göze çarpmaktadır. *A. segetum* hemolenf lektininin tavşan kanı eritrositlerini 1:64 titre ile hemaglutine ettiği gözlenmiştir. Bir kerevit türü olan *Pacifastacus leniusculus*'un (Kopacek *et al.*, 1993) plasma lektininin 1:64 titre ile tavşan kanı eritrositlerini hemaglutine ettiği gibi, *A. segetum* hemolenf lektini de 1:64 titrede tavşan eritrositlerini hemaglutine etmiştir. *Locusta migratoria* (Drif and Brehelin, 1989), *Hyalophora cecropia* (Castro *et al.*, 1987) ve *Extatosoma tiaratum* (Richards *et al.*, 1988) hemolenf lektinleri sığır kanı eritrositlerini 1:32 titre ile hemaglutine ettiği tesbit edilmiştir. *A. segetum* hemolenf lektini ise 1:4 titrede hemaglutine ettiği için bahsedilen diğer böcek hemolenf lektinlerinden farklı titrede hemaglutine etmiştir. *Calliphora vomitoria* larvalarının hemolenf lektini A grubu insan kanı eritrositlerini 1:256 titre ile hemaglutine ettiği gözlenmiştir (Mc Kenzie and Preston, 1992a). *A. segetum* hemolenf lektini A grubu insan kanı eritrositlerini *C. vomitoria* hemolenf

lektini gibi 1:256 titre ile hemaglutine etmiştir. *Hyalophora cecropia* hemolenf lektinin B grubu insan kanı eritrositlerini 1:64 titre ile hemaglutine ettiği bildirilmiştir (Castro *et al.*, 1987). *A. segetum* hemolenf lektini B grubu insan kanı eritrositlerini 1:64 titre ile hemaglutine ettiği gözlenmiştir. Her iki böceğin lektini aynı titre (1:64) ile B grubu insan kanı eritrositlerini hemaglutine etmesi hemaglutine etmiştir.

Karbohidratların ve glikoproteinlerin lektindeki reseptörlere bağlanarak, lektinin yabancı hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasını engellediği bilinmektedir (Vierbüchen, 1991; Sharon, 1977). Böylece lektinin yabancı ajan olarak omurgasız hayvan vücuduna giren mikroorganizmaları hemaglutinasyonu engellenmiş olmaktadır. Çalışmada *A. segetum* hemolenf lektininin omurgalı eritrositlerini deneysel olarak kullanılan çeşitli karbohidratların ve glikoproteinlerin lektine bağlanarak hemaglutinasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir.

Schistocerca gregaria hemolenf lektininin tavuk kanı eritrositlerini aglutinasyonunu 100 mM konsantrasyonda D-galaktoz ve N-asetil galaktozaminin ve bir glikoprotein olan 1 mg/ml yumurta albuminin inhibe ettiği bildirilmiştir (Lackie, 1981). *A. segetum* hemolenf lektininin tavuk kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 100 mM'lık D-galaktoz'un inhibe etmesi bakımından *S. gregaria* lektininin hemaglutinasyon inhibisyonuna benzerlik göstermiştir. Ancak 1mg/ml yumurta albumini *S. gregaria* lektininin hemaglutinasyonunu inhibe ettiği halde, *A. segetum* lektininin hemaglutinasyonunu inhibe etmemiştir.

Periplaneta americana hemolenf lektininin at kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 1 mg/ml mucin'in inhibe ettiği gözlenmiştir (Lackie, 1981). *A. segetum* lektininin ise at kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 1 mg/ml mucin'in inhibe etmediği gözlenmiştir. Aynı türün tavşan eritrositlerini hemaglutinasyonunu 100 mM'lık glukoz, galaktoz, ksiloz, mannoz, sükroz ile glikoprotein olarak kullanılan 1 mg/ml yumurta albumini ve mucinin inhibe ettiği gözlenmiştir (Lackie, 1981). *A. segetum*'un tavşan eritrositlerini sadece 12.5 mM ve 6 mM konsantrasyonda D-laktozun inhibe ettiği gözlenmiştir. Diğer karbohidrat ve glikoprotein örneklerinin *A. segetum* lektini hemaglutinasyonunu inhibe etmediği gözlenmiştir. *P. americana*'nın O grubu insan kanı eritrositlerini

hemaglutinasyonunu 25 mM'lık glukoz ve laktoz ile, 100 mM'lık galaktoz, ksiloz, mannoz ve sükrozun inhibe ettiği gözlenmiştir (Lackie, 1981). *A. segetum* lektininin ise O grubu insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu sadece 1 mg/ml mucin ve 0.1 mg/ml mucin'in inhibe ettiği gözlenmiştir. Kullanılan karbohidratlar ve glikoproteinlerden yumurta albumini ve Kondroitin sülfat A'nın hemaglutinasyon aktivitesini inhibe etmediği gözlenmiştir. Bu durumda *Periplaneta americana*'nın hemolenf lektininin O grubu insan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonunun inhibe edilmesi, *A. segetum* lektini hemaglutinasyonunun inhibe edilmesine benzemektedir. Yine *P. americana*'nın koyun kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 100 mM galaktoz ve 12.5 mM'lık N-asetil galaktozamin'in inhibe ettiği gözlenmiştir (Lackie, 1981). *A. segetum* lektininin koyun kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 100, 50, 25, 12.5 ve 6 mM'lık N-asetil galaktozaminin inhibe ettiği gözlenmiştir. *P. americana*'nın koyun kanı hemaglutinasyonunun sadece 12.5 mM N-asetil galaktozamin ile inhibe edilmesi *A. segetum*'a benzemektedir.

Panstrongylus megistus (Hemiptera) 5. Evre larvalarının hemolenf lektininin O grubu insan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonu 12.5 mM D-galaktoz ile 6 mM'lık D-laktoz ve rafinoz'la inhibe edildiği bildirilmiştir (Gomes *et al.*, 1991). *A. segetum*'un 5. evre hemolenf lektininin O grubu insan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonu sadece 1 mg/ml ve 0.1 mg/ml mucin'in inhibe ettiği gözlenmiştir. *A. segetum* hemolenfinin O grubu insan kanını hemaglutinasyonunu karbohidratların inhibe etmemesi yönünden *P. megistus* lektininin hemaglutinasyonunu karbohidratların inhibe etmesine benzemediği anlaşılmaktadır.

Antheraea pernyi pupalarının hemolenf lektininin tavşan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 100 mM'lık glukoz, maltoz, mannoz, sükroz; 50 mM'lık N-asetil galaktozamin, laktoz ve 25 mM'lık galaktoz'un inhibe ettiği bildirilmiştir (Qu *et al.*, 1987). *A. segetum* hemolenf lektininin ise tavşan kanı eritrositlerini 12.5 mM ve 6 mM'lık D-laktoz'un inhibe etmesi bakımından *A. pernyi* hemaglutinasyonu inhibisyonuna sadece laktoz inhibisyonu ile benzediği anlaşılmaktadır.

Extatosoma tiaratum'un serum lektininin tavşan kanı eritrositlerinin hemaglutinasyonu 50 mM'lık N-asetil galaktozamin, 25 mM'lık rafinoz 12.5 mM'lık galaktoz ve laktozun inhibe ettiği rapor edilmiştir (Richards *et al.*, 1988). *A. segetum* hemolenf lektinin tavşan kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 12.5 mM ve 6 mM'lık laktoz'un inhibe etmesi bakımından *E. tiaratum* lektini hemaglutinasyonun inhibisyonuna benzemektedir.

Calliphora vomitoria larvalarının hemolenf lektininin koyun kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 50 mM'lık D-laktoz ve N-asetil galaktozamin'in inhibe ettiği bildirilmiştir (Mc Kenzie and Preston, 1992). *A. segetum* hemolenf lektininin koyun kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu 50 mM'lık N-asetil galaktozaminin inhibe etmesi bakımından *C. vomitoria* lektininin hemaglutinasyonunun aynı şekerle inhibe edilmesine benzemektedir, oysa *A. segetum*'un koyun kanı eritrositlerini hemaglutinasyonunu D-laktoz inhibe etmemiştir.

İnhibisyon deneylerinde tartışması yapılan karbohidrat ve glikoproteinlerden başka karbohidrat ve glikoprotein de kullanılmıştır. Örneğin *Periplaneta americana*'nın hemaglutinasyonunu D-fruktoz, D-rhamnoz, D-melibiyoz ve fetuin (glikoprotein) nedeniyle inhibe edildiği gözlenmiştir (Lackie, 1981). *Extatosoma tiaratum* hemolenfinin hemaglutinasyonunu D-fruktoz, α -metil-D-galaktopiranosid ve fetuin'in inhibe ettiği bildirilmiştir (Richard *et al.*, 1988). *Calliphora vomitoria*'nın hemolenf lektininin hemaglutinasyonunu fetuin'in inhibe ettiği gözlenmiştir (McKenzie and Preston, 1992a).

A. segetum hemolenf lektinin hemaglutinasyonunu yukarıda bahsedilen değişik böceklerin lektin hemaglutinasyonu inhibisyonunda kullanılan karbohidratlar ve glikoproteinin inhibe etmesi incelenmediği için bu konuda karşılaştırma mümkün olmamıştır.

Affinite ve jel filtrasyonu kromatografi yöntemleriyle saflaştırılan *A. segetum* hemolenf lektinin, elektron mikroskopunda (TEM) yapısal özelliği incelenmiştir. Geçmiş yıllarda çeşitli omurgasız hayvan lektininin ince yapısı geçirmeli elektron mikroskopunda incelenmiştir. Bir deniz omurgasız hayvanı olan *Limulus polyphemus*'un hemolenf lektini elektron mikroskopunda incelenmiş ve hegzagonal yapı gösterdiği gözlenmiştir (Fernandez-Moran *et al.*, 1968). *Anthocidaris*

crassispinga'nın sölomik sıvısında bulunan lektin TEM'de incelenmiştir. Lektinin TEM'de yayılmış kelebek kanadı şeklinde bir yapı gösterdiği ve bu yapının çoğu zaman dört parça semiglobuler birimden bazen de globuler birimden meydana geldiği gözlenmiştir (Giga *et al.*, 1985). Bir böcek türü olan *Periplaneta americana*'nın affinite kromatografi yöntemiyle saflaştırılan hemolenf lektininin TEM'de sarmal yapıdaki çubuklar halinde görüntü verdiği gözlenmiştir (Kubo and Natori, 1987). Böceklerde bu konuda başka örneklere rastlanmamıştır. Yapılan çalışmada ise *A. segetum*'un hemolenf lektinin ağsı (rektiküler) bir yapıda olduğu gözlenmiştir. Ağsı yapının boncuk dizisi veya dallanma yapan globuler birimlerden meydana geldiği gözlenmiştir. *A. segetum*'un lektini ağsı yapısıyla diğer omurgasız hayvan lektinlerinden farklı yapı göstermiştir. Lektin ince yapısı omurgasız hayvanlarda değişik şekillerde gözlenmiştir. Ancak lektinlerin esas olarak globüler birimlerden meydana gelmesi açısından çeşitli hayvan grupları arasında bir benzerlik olduğu belirlenmektedir. Sadece *A. segetum*'un dahil olduğu dört örneğe dayanarak görüş bildirmek şüphesiz yeterli olamaz. Gelecekte yapılacak araştırmaların bu konuyu daha kesin duruma getireceği ümit edilmektedir.

5. KAYNAKLAR

- AMANAI, K., SAKURAI, S., and OHTAKI, T., 1991. Site of hemolymph lectin production and its activation in vitro by 20-hydroxyecdysone. *Arch. Insect Biochem., and Physiol.* 17: 39-51.
- ANADOLU, R., ERDEM, C., ERDİ, H., and TAŞPINAR, A., 1992. Skuamöz hücreli karsinoma tanısında peanut agglutinin. *Türk J. Dermatopathol.* 1: 46-50.
- BLUMENTHAL, R., SARKAR, D.P., DURELL, S., HOWARD, D.E., and MORRIS, S.J., 1996. Dilation of the influenza hemagglutinin fusion pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events. *J. Cell Biol.* 135 (1): 63-71.
- BOUCIAS, D. G., and PENDLAND, J. C., 1993. The galactose binding lectin from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: distribution and site of synthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23 (2): 233-242.
- BRADLEY, R. S., STUART, G. S., STILES, B., and HAPNER, K. D., 1989. Grasshopper haemagglutinin: immunochemical localization in haemocytes and investigation of opsonic properties. *J. Insect Physiol.* 35 (5): 353-361.
- BREHELIN, M., DRIF, L., BAUD, L., and BOEMARE, N. 1989. Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19 (3): 301-307.
- BROOKMAN, J.L., RATCLIFFE, N.A., and ROWLEY, A.F., 1988. Optimization of a monolayer phagocytosis assay and its application for studying the role of the prophenoloxidase system in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 34 (4): 337-345.
- CASTRO, V.M., BOMAN, H.G., and HAMMARSTRÖM, S., 1987. Isolation and characterization of a group of isolectins with galactose/N-acetyl galactosamine specificity from hemolymph of the giant silk moth *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.* 17 (4): 513-523.

- COOMBE, D.R., EY, P.L., and JENKIN, C.R., 1984. Self/non-self recognition in invertebrates In *The Quarterly Review of Biology*. 59: 231-255.
- DANGUY, A., and GENTEN, F., 1990. Lectin histochemistry on glycoconjugates of the epidermis and dermal glands of *Xenopus laevis* (Daudin, 1802). *Acta Zool. (Stocholm)* 71 (1): 17-24.
- DAVIES, D.H., STRAND, M.R., and VINSON, S.B., 1987. Changes in differential haemocyte count and in vitro behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoplex sonorensis* polydnavirus. *J. Insect Physiol.* 33(3): 143-153.
- DRIF, L., and BREHELIN, M., 1989. Agglutinin mediated immune recognition in *Locusta migratoria* (Insecta). *J. Insect Physiol.* 35 (10): 729-736
- DUNN, P.E., 1990. Humoral immunity in insects. *Bio Science*, 40 (10): 738-745.
- DUNPHY, G.B., and DOWNER, R.G.H., 1994. Octopamine, a modulator of the haemocytic nodulation response of non-immune *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.* 40 (3): 267-272.
- ERİNÇ, M., 1996. *Bacillus thuringiensis* ve bazı kimyasal insektisitlerin *Agrotis segetum* (Dennis et. Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarına etkileri. A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi (Yayınlanmamış, Ankara).
- FERNANDEZ-MORAN, H., MARCHALONIS, J.J., and EDELMAN, G.H., 1968. Electron Microscopy of hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *J. Mol. Biol.* 32: 467-469.
- FITCHES, E., GATEHOUSE, A.M.R., and GATEHOUSE, J.A., 1997. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. *J. Insect Physiol.* 43 (8): 727-739.
- GIGA, Y., SUTOH, K., and IKAI, A., 1985. A new multimeric hemagglutinin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Biochem.* 24: 4461-4467.

- GILLESPIE, J.P., and KANOST, M.R., 1997. Biological mediators of insect immunity. In Annual Review of Entomology (Ed: Mittler, T. E., Radovsky, F.J., and Resh, V.H.). 42:611-643.
- GOMES, Y. DE M., FURTADO, A.F., and COELHO, L.B.B., 1991. Partial purification and some properties of a hemolymph lectin from *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae). Appl. Biochem. And Biotechn. 31: 97-107.
- GRUBHOFFER, L., and MATHA, V., 1991. New lectins of invertebrates. Zool. Sci. 8: 1001-1003.
- GRUBHOFFER, L., MUSKA, M., and VOLF, P., 1994. Midgut hemagglutinins in five species of tsetse flies (*Glossina* spp.): two different lectin systems in the midgut of *Glossina tachinoides*. Folia Parasitol. 41: 229-232.
- GRUBHOFFER, L., UHLIR, J., and VOLF, P., 1993. Functional and structural identification of a new lectin activity of *Borrelia recurrentis* spirochetes. Comp. Biochem. Physiol. 105B (3/4): 535-540.
- GUZO, D., and STOLTZ, D.B., 1987. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. J. Insect Physiol. 33 (1): 19-31.
- GÜL, N. ve AYVALI, C., 1995. *Agrotis segetum*'da (Dennis and Schiffmüller) (Lepidoptera: Noctuidae) hücresel bağışıklık. Tr. J. Biol. 19: 259-268.
- HAPNER, K.D., 1983. Haemagglutinin activity in the haemolymph of individual Acrididae (grasshopper) specimens. J. Insect Physiol. 29 (1): 101-106.
- INGRAM, G.A., and MOLYNEUX, D.H., 1988. Sugar specificities of anti-human ABO (H) blood group erythrocyte agglutinins (lectins) and haemolytic activity in the haemolymph and gut extracts of three *Glossina* species. Insect Biochem., 18 (3): 269-279.
- INGRAM, G.A., EAST, J., and MOLYNEUX, D.H., 1984. Naturally occurring agglutinins against trypanosomatid flagellates in the haemolymph of insects. Parasitol. 89: 435-451.

- INGRAM, G.A., and MOLYNEUX, D.H., 1990. Lectins (haemagglutinins) in the haemolymph of *Glossina fuscipes fuscipes*: Isolation, partial characterization, selected physicochemical properties and carbohydrate-binding specificities. *Insect Biochem.* 20 (1): 13-27.
- JOHANSSON, M.W., and SODERHALL, K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol. B* 156: 175-181.
- JURENKA, R., MANFREDI, K., and HAPNER, K. D., 1982. Haemagglutinin activity in Acrididae (grasshopper) haemolymph. *J. Insect Physiol.* 28 (2):177-181.
- KALENDER, Y. ve KALENDER, S., 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin *Agrotis segetum* (Lep: Noctuidae) larvalarının sindirim sisteminin ileum bölgesine etkisi. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2): 18-32.
- KAMIYA, H., MURAMOTO, K., GOTO, R., and SAKAI, M., 1992. Lectins in the hemolymph of a starfish, *Asterina pectinifera*: purification and characterization. *Develop. and Comp. Immunol.* 16: 243-250.
- KANOST, M.R., KAWOOYA, J.K., LAW, J.H., RYAN, R.O., VAN HEUSDEN, M.C., and ZIEGLER, R., 1990. Insect Haemolymph Proteins. In *Advances in Insect Physiology.* (Ed. Evans, P.D., and Wigglesworth, V.B.), 22: 299-396, Academic Press, London.
- KAWAGISHI, H., YAMAWAKI, M., ISOBE, S., USUI, T., KIMURA, A., and CHIBA, S., 1994. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai* *J. Biol. Chem.* 269 (2): 1375-1379.
- KAYA, N., 1979, Ege Bölgesinde Patateslerde Zarar Yapan *Agrotis* Türleri (Lepidoptera: Nactuidae), Tanınmaları, Yayılışları, Zarar Şekli ve Dereceleri, Kısa Biyolojileri Üzerinde Araştırmalar. İzmir Bölge Zirai Mücadale Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Araştırma Eserleri Serisi No:33 s. 1-78, Ankara.

- KOMANO, H., MIZUNO, D., and NATORI, S., 1980. Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. J. Biol. Chem. 255 (7): 2919-2924.
- KOPACEK, P., GRUBHOFFER, L., and SÖDERHALL, K., 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Develop. and Comp. Immunol. 17: 407-418.
- KUBO, T., and NATORI, S., 1987. Purification and some properties of a lectin from the hemolymph of *Periplaneta americana* (American cockroach). Eur. J. Biochem. 168: 75-82.
- KUBO, T., KAWASAKI, K., and NATORI, S., 1990. Sucrose-binding lectin in regenerating cockroach (*Periplaneta americana*) legs: its purification from adult hemolymph. Insect Biochem. 20 (6): 585-591.
- LACKIE, A. M., 1981. The specificity of the serum agglutinins of *Periplaneta americana* and *Schistocerca gregaria* and its relationship to the insects immune response. J. Insect Physiol. 27: 139-143.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- LEVER, G.S., ALROY, J. UCCI, A., and LEVER, W.F., 1984. Distribution of carbohydrate residues in normal skin. Arch. Dermatol. Res. 276: 216-223.
- LIS, H., and SHARON, N., 1986. Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem., 55: 35-67.
- LORD, J.C., and UNDEEN, A.H., 1990. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin by dissolved tannins. Environ. Entomol. 19(5): 1547-1551.
- MARCHALONIS, J.J., and EDELMAN, G.M., 1968. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. J. Mol. Biol., 32: 453-465.

- Mc KENZIE, A.N.J., and PRESTON, T.M., 1992 a. Purification and characterization of a galactose-specific agglutinin from the haemolymph of the larval stages of the insect *Calliphora vomitoria*. Dev. Comp. Immunol. 16: 31-39.
- Mc KENZIE, A.N.J., and PRESTON, T.M., 1992 b. Biological characteristics of the *Calliphora vomitoria* agglutinin. Dev. Comp. Immunol. 16: 85-93.
- MIHOK, S., OLUBAYO, R.O., DARJI, N., and ZWEYGARTH, E., 1993. The influence of host blood on infection rates in *Glossina morstitans* ssp. infected with *Trypanosoma congolense*, *T. brucei* and *T. simiae*. Parasitol. 107:41-48.
- MIYAZAWA, M., KIMURA, T., and ITAGAKI, S., 1994. Lectin histochemistry on the skin of hairless descendants of Mexican hairless dogs. Tissue and Cell, 26 (1): 19-27.
- MOHAMED, H.A., INGRAM, G.A., MOLYNEUX, D.H., and SAWYER, B.V., 1991. Use of fluorescein-labelled lectin binding of salivary glands to distinguish between *Anopheles stephensi* and *A. albimanus* species and strains. Insect Biochem. 21 (7): 767-773.
- MULLAINADHAN, P., and RENWRANTZ, L., 1986. Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. Immunobiol., 171: 263-273.
- MULLETT, H., RATCLIFFE, N.A., and ROWLEY, A.F. 1993. Analysis of immune defence of the wax moth, *Galleria mellonella*, with anti-haemocytic monoclonal antibodies. J. Insect Physiol. 39 (10): 897-902.
- MURDOCK, L.L., HUESING, J.E., NIELSEN, S.S., PRATT, R.C., and SHADE, R.E., 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. Phytochem., 29 (1): 85-89.
- MYERS, C.R., COLLINS, M.L.P., AGRESTI, M., and BERGTROM, G., 1986. Haemoglobin-producing tissues of larvae and pupae of *Chironomus thummi* (Diptera). J. Insect Physiol. 32 (10): 845-851.

- NATORI, S., 1987. Hemolymph proteins participatin in the defence system of *Sarcophaga peregrina*. Mol. Entomol., 369-378.
- NICHOLS, W.S., and NAKAMURA, R.M., 1986. Agglutination and agglutination inhibition assays. In Manual of Clinical Laboratory Immunology. (Ed. Rose, N.R., Friedman H., Fahey, J.L.) Third Ed. Pp: 49-56. American Soc. For Microbiol., Washington D.C.
- OLAFSEN, J.A., 1986. Invertebrate lectins: Biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In Immunity in Invertebrates (Ed. Brehelin, M.). pp.94-111. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- OLAFSEN, J.A., FLETCHER, T.C., and GRANT, P.T., 1992. Agglutinin activity in pasific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *vibrio anguillarum* challenge. Develop. and Comp. Immunol., 16: 123-138.
- ORDUZ, S., ROJAS, W., CORREA, M.M., MONTOYA, A.E., and DE BARJAC, H., 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., 59: 99-103.
- PADIDAM, M., 1992. The insecticidal crystal protein CryIA (c) from *Bacillus thuringiensis* is highly toxic for *Heliothis armigera*. J. Invertebr. Pathol., 59: 109-111.
- PAKANDL, M., and GRUBHOFFER, L., 1994. Some properties of sialicacid binding systems in *Tritrichomonas suis* and *Tritrichomonas foetus*. Comp. Biochem. Physiol. 108B (4): 529-536.
- PENDLAND, J.C., and BOUCIAS, D.G., 1985. Hemagglutinin activity in the hemolymph of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected with the fungus *Nomuraea rileyi*. Develop. and Comp. Immunol. 9: 20-30.
- PENDLAND, J.C., and BOUCIAS, D.G., 1996. Phagocytosis of lectin-opsonized fungal cells and endocytosis of the ligand by insect *Spodoptera exigua* granular hemocytes: an ultrastructural and immunocytochemical study. Cell Tissue Res. 285: 57-67.

- PENDLAND, J.C., HEATH, M.A., and BOUCIAS, D.G., 1988. Function of a galactose-binding lectin from *Spodoptera exigua* larval haemolymph: opsonization of blastospore from entomogenous hyphomycetes. *J. Insect Physiol.* 34 (6): 533-540.
- PERRONE, J.B., DE MAIO, J., and SPIELMAN, A., 1986. Regions of mosquito salivary glands distinguished by surface lectin-binding characteristics. *Insect Biochem.* 16 (2): 313-318.
- QU, X-M., ZHANG, C.-F., KOMANO, H., and NATORÌ, S., 1987. Purification of a lectin from the hemolymph of Chinese oak silk moth (*Antheraea pernyi*) pupae. *J. Biochem.* 101 (3): 545-551.
- RAHMET-ALLA, M., and ROWLEY, A.F., 1989. Studies on the pathogenicity of different strains of *Bacillus cereus* for the cockroach, *Leucophaea maderae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 53: 190-196.
- RANTAMAKI, J., DURRANT, H., LIANG, Z., RATCLIFFE, N.A., DUVIC, B., and SODERHALL, K., 1991. Isolation of a 90 kDa protein from haemocytes of *Blaberus craniifer* which has similar functional and immunological properties to the 76 kDa protein from crayfish haemocytes. *J. Insect Physiol.* 37 (8): 627-634.
- RATCLIFFE, N.A., 1986. Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. In *Immune Mechanism in Invertebrate Vectors*: 21-43. (Ed. Lackie, A.M.). *Symp. Zool. Soc. Lond.* No: 56.
- RATCLIFFE, N.A., and GÖTZ, P., 1990. Functional studies on insect haemocytes, including non-self recognition. *Res. Immun.* 141: 919-923.
- RATCLIFFE, N.A., and ROWLEY, A.F., 1979. Role of hemocytes in defence against biological agents. In *Insect Hemocytes* (Ed. Gupta, A.P.) pp. 331-415, Cambridge University Press, London.
- RATCLIFFE, N.A., and WALTERS, J.B., 1983. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.* 29 (5): 407-415.

- RATNER, S., and VINSON, S.B., 1983. Phagocytosis and encapsulation: cellular immune response in Arthropoda. *Amer. Zool.*, 23: 185-194.
- RENWRANTZ, L., 1986. Lectins in molluscs and arthropods: Their occurrence, origin and roles in immunity. In *Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors*. (Ed. Lackie, A.M.), 21-43. Zool. Soc. London.
- RICHARDS, E.H., RATCLIFFE, N.A., and RENWRANTZ, L., 1988. Isolation and characterization of a serum lectin from the giant stick insect *Extatosoma tiaratum*. *Insect Biochem.* 18 (7): 691-700.
- RICHARDS, E.H., RATCLIFFE, N.A., and RENWRANTZ, L., 1989. The binding of lectins to carbohydrate moieties on haemocytes of the insects, *Blaberus craniifer* (Dictyoptera) and *Extatosoma tiaratum* (Phasmida). *Cell Tissue Res.* 257: 445-454.
- RICHARDS, E.H., and RATCLIFFE, N.A., 1990. Direct binding and lectin-mediated binding of erythrocytes to haemocytes of the insect, *Extatosoma tiaratum*. *Develop. and Comp. Immunol.* 14: 269-281.
- RATCLIFFE, N.A., and ROWLEY, A.F., 1981. *Invertebrate Blood V.* 2, 421-488, Academic Press, New York.
- SCAPIGLIATI, G., PECCI, M., PIERMATTEI, A., and MAZZINI, M., 1997. Characterization of a monoclonal antibody against a 180 kDa hemocyte polypeptide involved in cellular defence reactions of the stick insect *Bacillus rossius*. *J. Insect Physiol.* 43 (4): 345-354.
- SHARON, N., 1977. Lectins. *Sci. Amer.* 236 (6): 108-119.
- SHIGENAGA, T., MUTA, T., TOH, Y., TOKUNAGA, F., and IWANAGA, S., 1990. Antimicrobial Tachyplesin peptide precursor. *J. Biol. Chem.* 265 (34): 21350-21354.
- SHUKLE, R.H., and MURDOCK, L.L., 1983. Lipxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybean: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmen. Entomol.* 12 (3): 787-791.

- STEBBINS, M.R., and HAPNER, K.D., 1985. Preparation and properties of haemagglutinin from haemolymph of Acrididae (grasshoppers). *Insect Biochem.* 15 (4): 451-462.
- STEPHENS, J.M., 1963. Immunity in insect. In *Insect Pathology An Advanced Treatise* (Ed. Steinhaus, E. A.) I: 273-297, Academic Press.
- STYNEN, D., PEFFEROEN, M., and De LOOF, A., 1982. Proteins with haemagglutinin activity in larvae of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.* 28 (5): 465-470.
- STILES, B., BRADLEY, R.S., STUART, G.S., and HAPNER, K.D., 1988. Site of synthesis of the haemolymph agglutinin of *Melanoplus differentialis* (Acrididae: Orthoptera). *J. Insect Physiol.* 34 (12): 1077-1085.
- SUZUKI, T., and NATORI, S., 1983. Identification of a protein having hemagglutinating activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biochem.* 93: 583-590.
- TATU, U., and HELENIUS, A., 1997. Interactions between newly synthesized glycoproteins, Calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 136 (3): 555-565.
- THEOPOLD, U., and SCHMIDT, O., 1997. *Helix pomatia* lectin and Annexin V, two molecular probes for insect microparticles: possible involvement in hemolymph coagulation *J. Insect Physiol.* 43 (7): 667-674.
- TOH, Y., MIZUTANI, A., TOKUNAGA, F., MUTA, T., and IWANAGA, S., 1991. Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances. *Cell Tissue Res.* 266: 137-147.
- TUNCER, C. ve ECEVİT, O., 1994. *Bacillus thuringiensis* ürünleri ve böceklerde dayanıklılığın önemi. *Türk. Entomol. Derg.* 18 (2): 119-128.
- VARI, F., and BELL, K., 1996. A simplified silver diamine method for staining of nucleic acids in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 17: 20-25.

- VASTA, G.R., CHENG, T.C., and MARCHALONIS, J.J., 1984. A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cellular Immunol.* 88: (475-488).
- VIERBUCHEN, M., 1991. Lectin receptors. In *Current Topics in Pathology*. (Ed. Seifert, G.) 83: 1-522. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona.
- VOLF, P., GRUBHOFFER, L., and MUSKA, M., 1993. Detection and identification of tissue specific lectins of the tsetse fly, *Glossina tachinoides*. Midgut lectin activity with lipopolysaccharide binding specificity. In *Proceeding of an International Symposium on Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecula and Genetic Techniques*. Pp: 557-565, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- WIESNER, A., and GOTZ, P., 1993. Silica beads induce cellular and humoral immune responses in *Galleria mellanella* larvae and in isolated plasmatocytes, obtained by a newly adapted nylon wool separation method. *J. Insect Physiol.* 39 (10): 865-876.
- WHEELER, M.B., STUART, G.S., and HAPNER, K. D., 1993. Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). *J. Insect Physiol.* 39 (6): 477-483.
- ZACHARY, D., and HOFFMANN, D., 1984. Lysozyme is stored in the granules of certain haemocyte types in *Locusta*. *J. Insect Physiol.* 30 (5): 405-411.

6. ÖZGEÇMİŞ

Kars-Selim'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini baba mesleği nedeniyle Türkiye'nin çeşitli yerlerinde tamamladı. 1978 yılında Ankara Atatürk Lisesi'nden ve 1981 yılında kayıt olduğu A. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1985 yılında mezun oldu. 1990 yılında A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini "*Agrotis segetum*"da Hücresel Bağışıklık Üzerine Araştırmalar" konulu tez çalışması ile tamamladı. Halen A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

