



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

ANOPHELES SACHAROVİ NESİLLERİNDE STEROL
TAŞIYICI PROTEİN-2 GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE EKSPRESYON ANALİZLERİ

Hazırlayan
Sümeyye AYGÜN

Danışman
Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

Yüksek Lisans Tezi

Eylül 2022
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

***ANOPHELES SACHAROVİ* NESİLLERİNDE STEROL
TAŞIYICI PROTEİN-2 GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE EKSPRESYON
ANALİZLERİ**
Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan
Sümeyye AYGÜN

Danışman
Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2021-11456 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Eylül 2022
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Sümeyye AYGÜN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“*Anopheles sacharovi* Nesillerinde Sterol Taşıyıcı Protein-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri” konulu yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Sümeyye AYGÜN

Danışman
Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Prof. Dr. Önder DÜZLÜ danışmanlığında **Sümeyye AYGÜN** tarafından hazırlanan “*Anopheles sacharovi* Nesillerinde Sterol Taşıyıcı Protein-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

08/09/2022

JÜRİ :

İmza

Danışman: Prof. Dr. Önder DÜZLÜ (Erciyes Üniversitesi Veteriner

Üye: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Erciyes Üniversitesi Veteriner

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mübeccel ATELGE (Kastamonu Üniversitesi

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

....../....../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve tez yazımına kadar her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Önder DÜZLÜ ve Anabilim/Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladığım günden bu yana desteklerini hissettiğim ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Abdullah İNCİ, Doç. Dr. Zuhale ÖNDER, Doç. Dr. Arif ÇİLOĞLU ve Araş. Gör. Gamze YETİŞMİŞ'e teşekkür ederim.

Tezime değerli katkılarından dolayı sevgili tez jüri üyem Dr. Öğr. Üyesi Mübeccel ATELGE'ye teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, sadece bu çalışma sürecinde değil tüm hayatım boyunca beni cesaretlendiren ve moral veren babam Hüseyin AYGÜN, annem Ayşe AYGÜN ve ablalarım Esmâ AYGÜN YILDIZ ve Sema Nur AYGÜN'e, bu süreçte hep yanımda olan motivasyon ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili arkadaşım Nurhayat Tuğra ÖZER'e sonsuz teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan arkadaşlarım Sadullah USLU ve Doğukan DOKUZCU'ya desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez projemi, TYL-2021-11456 proje kodu ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne sonsuz teşekkür ederim.

Sümeyye AYGÜN
KAYSERİ, Eylül 2022

***ANOPHELES SACHAROVİ* NESİLLERİNDE STEROL TAŞIYICI PROTEİN-2 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE EKSPRESYON ANALİZLERİ**

Sümeyye AYGÜN

T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Eylül 2022

Danışman: Prof. Dr. Önder DÜZLÜ

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye’yi de içine alan Palearktik bölgede geçmişten günümüze *Plasmodium vivax* sıtmasının en etkin vektörlerinden olan *Anopheles sacharovi*’de insektler ile biyoteknolojik mücadele kapsamında çeşitli zararlı ve/veya hastalık nakleden insektler için aşı adayı veya hedef ilaç bölgelerinden birisi olarak nitelenen sterol taşıyıcı protein-2 (SCP-2) geninin ilk kez moleküler karakterizasyonunu yapmak ve bu proteini kodlayan genin *An. sacharovi* gelişim dönemleri ve dişi nesillerin tükürük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusu gibi farklı dokularında ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmalı olarak ortaya çıkarmak ve dolayısıyla ilgili alanda literatüre özgün veriler sağlamak amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında Sultanazade yöresindeki endemik odaklardan toplanan ergin dişi *An. sacharovi* ve bunlardan insektaryumda elde edilen gelişim dönemleri proje materyalini oluşturmuştur. Morfolojik ve moleküler tür identifikasyonu yapılan *An. sacharovi* nesilleri ve ergin dişi dokularından total RNA ekstraksiyonunu takiben cDNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA kalıplarında SCP-2 geninin 216 bp fragmenti optimize edilmiş primerlerle amplifiye edilmiş ve elde edilen ampliconlar sekanslanmıştır. Elde edilen sekansların in-silico analizlerle işlenerek genetik karakterizasyonları sağlanmıştır. Sekans analizine alınan toplam 14 izolata ait SCP-2 nükleotid sekanslarının 12’sinin %100 identik olduğu birbirine homolog olan diğer iki izolata ait SCP-2 sekanslarının ise 183. bazda tek nükleotid değişimi gösterdiği belirlenmiştir. *Anopheles sacharovi* SCP-2 gen bölgesinin 216 bp fragmentinin 72 amino asit zincirini kodladığı tespit edilmiştir. Filogenetik analiz sonucu SCP-2 gen sekanslarının izolatları sivrisinek türü ve soyu bazında monofiletik olarak kümelendirdiği, *An. sacharovi* izolatlarının *Anopheles* kümesi içerisinde *An. stephensi* ve *An. funestus*’la birlikte alt küme oluşturduğunu ortaya koymuştur. qPCR’da ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2’nin en yüksek ergin erkeklerde ifade olduğu bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Ergin dişi dokularında ise SCP-2’nin en yüksek fatbody’de ifade olduğu bunu sırasıyla midgut ve tükürük bezinin izlediği belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma vektör potansiyeli ve önemi yüksek olan *An. sacharovi* için aşı adayı veya hedef ilaç bölgelerinden önemli birisi olan SCP-2 ilk kez karakterize edilmiş, ve ilgili sivrisineğin gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyonel farklılıklar ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Anopheles sacharovi*; Ekspresyon Analizleri; Sterol Taşıyıcı Protein-2; Moleküler Karakterizasyon;

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE STEROL-CARRIER PROTEIN-2 GENE IN *ANOPHELES SACHAROVII* GENERATIONS

Sumeyye AYGUN

Erciyes University, Institute of Health Science,

Department of Veterinary Parasitology,

Master Thesis, September 2022

Supervisor: Prof. Dr. Onder DUZLU

ABSTRACT

In this study, it was aimed to characterize the sterol carrier protein-2 (SCP-2) gene, which is considered as a vaccine candidate or one of the target drug sites for various pests and/or disease-transmitting insects within the scope of biotechnological control against insects, in *Anopheles sacharovi*, one of the most effective vectors of *Plasmodium vivax* malaria from past to present, in the Palearctic region including Turkey by molecular methods for the first time, and to reveal the expression levels of *An. sacharovi* developmental stages and female generations in different tissues such as salivary gland, midgut and adipose tissue, and thus provide specific data to the literature in the relevant field. Within the scope of the study, the adult female *An. sacharovi* collected from endemic foci in the Sultan Sazlığı region and the developmental stages in the insectarium constituted the project material. cDNA isolation was performed following total RNA extraction from *An. sacharovi* strains identified with morphological and molecular analyses and adult female tissues. The 216 bp fragment of the SCP-2 gene was amplified with optimized primers in the obtained cDNA templates and was sequenced. Genetic characterization of the obtained sequences was provided by in silico analysis. It was determined that 12 of the SCP-2 nucleotide sequences of 14 isolates included in the sequence analysis were 100% identical and the SCP-2 sequences of the other two isolates that were homologous to each other showed a single nucleotide change at base 183. It was determined that the 216 bp fragment of the *An. sacharovi* SCP-2 gene region encodes the 72 amino acid chain. Phylogenetic analysis revealed that SCP-2 gene sequences clustered the isolates monophyletically on the basis of mosquito species and strains, and that *An. sacharovi* isolates formed a subcluster together with *An. stephensi* and *An. funestus* within the *Anopheles* cluster. As a result of qPCR-mediated expression analysis, it was determined that the SCP-2 gene was expressed highest in adult males, followed by adult female, L4, L3, L2, L1 and pupal stages, respectively. In adult female tissue pieces, the SCP-2 gene was expressed the highest in the fat body, followed by the midgut and salivary glands, respectively.

In conclusion, SCP2, which is an important vaccine candidate or target drug site for *Anopheles sacharovi* with high vector potential and importance, was characterized for the first time with this study and the developmental stages and expression differences in the tissues of the relevant mosquito were revealed.

Keywords: *Anopheles sacharovi*; Expression analyses; Sterol Carrier Protein-2; Molecular characterization.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Anopheles sacharovi</i> 'nin Genel Özellikleri.....	3
2.2 Vektörlük Önemi ve Türkiye'deki Mevcut Araştırmalar	5
2.3 Sterol Taşıyıcı Proteinler ve Vektör Sivrisinek Kontrolündeki Önemleri	7
2.3.1 İnsektlerde Hayati Bir Bileşen Olan Kolesterol	8
2.3.2 Sterol Taşıyıcı Protein Aracılı Kolesterol Alımı ve İnhibisyonu	10
2.3.3. İnsekt Mücadelesinde Kolesterol Aracılı İleri Perspektifler.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. <i>Anopheles</i> Soyundaki Ergin Sivrisinek Örneklerinin Sahadan Toplanması	16
3.2. <i>Anopheles sacharovi</i> 'nin Morfolojik ve Moleküler İdentifikasyonu, İnsektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi.....	18
3.2.1. Morfolojik Teşhis	18
3.2.2. Moleküler Teşhis	19
3.2.3. İnsektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi	20
3.3. Sterol Taşıyıcı Protein-2 Geninin Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri .	23
3.3.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	23
3.3.2. SCP-2 Geninin Amplifikasyonu ve Sekanslanması.....	26
3.3.3. Nükleotid ve Amino Asit Sekanslarının Karakterizasyonu	28
3.3.4. SCP-2 Geninin Ekspresyon Analizleri	29

4. BULGULAR.....	31
4.1. <i>Anopheles sacharovi</i> Saha Örnekleri ve Morfolojik İdentifikasyon	31
4.2 <i>Anopheles sacharovi</i> Nesillerinde ITS-2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu, Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları.....	32
4.3. <i>Anopheles sacharovi</i> Nesillerinde SCP-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu	35
4.3.1. SCP-2 geninin Amplifikasyon Sonuçları.....	35
4.3.2. <i>Anopheles sacharovi</i> nesillerinde SCP2 Geninin Nükleotid ve Amino Asit Sekans Karakterizasyonu Sonuçları.....	35
4.3.2.1 Nükleik Asit Sekans Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi.....	35
4.3.3. Amino Asit Sekans Karakterizasyonu	40
4.3.3.1. SCP-2 Geninin Kodladığı Proteinin In-Silico Analiz Sonuçları.....	40
4.4. <i>Anopheles sacharovi</i> ’ de SCP-2 Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	41
4.4.1 SCP-2 geninin qPCR amplifikasyon sonuçları.....	41
4.4.2 Gelişim dönemlerinde SCP-2 geninin Ekspresyon Analizi.....	42
4.4.3. Ergin Dişi Dokularında SCP-2 Geninin Ekspresyon Analizi	43
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
7. KAYNAKLAR	50
EKLER	
ÖZGEÇMİŞİ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

BLAST	: Basic local alignment search tool
CDC	: Centers for Disease Control
cDNA	: Komplementer DNA
COI	: Cytochrome c oxidase subunit I
DDT	: Dikloro Difenol Trikloroethan
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EDTA	: Etilendaimin Tetra Asetik asit
gDNA	: Genomik DNA
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril KoA
ITS-2	: Internal Transcribed Spacer 2
JH	: Jüvenil hormon
L	: Larva
LC	: Letal konsantrasyon
mt-COI	: Mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I
NCBI	: The National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polymerase chain reaction
pH	: Power of hydrogen
RNA	: Ribonükleik asid
RT-qPCR	: Kantitatif Reverse Transkripsiyon-Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCP	: Sterol carrier protein
WHO	: World Health Organisation
µl	: Mikro litre

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>Ae. aegypti</i> 'ye karşı AeSCP-2 inhibe edici aktiviteye sahip sentetik organik bileşikler (Perera ve Wijerathna, 2019)	12
Tablo 2.2. Tıbbi açıdan önemli artropodlara karşı SCP-2 inhibe edici aktiviteye sahip fitokimyasallar (Perera ve Wijerathna, 2019)	13
Table 3.1. DNase reaksiyon protokolü	26
Table 3.2. cDNA sentez reaksiyonunun kurulması	26
Tablo 3.3. cDNA sentezinde termal döngü protokolü.....	26
Tablo 4.1. <i>Anopheles</i> türleri arasında SCP-2 gen bölgesine göre belirlenen interspesifik genetik farklılıklar.	38
Tablo 4.2. <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> ve <i>Aedes</i> soyları arasında SCP-2 gen bölgesine göre belirlenen genetik farklılıklar	38
Tablo 4.3. <i>An. sacharovi</i> gelişim dönemleri arasında SCP-2 geninin ekspresyon düzeylerinin kat değişimleri	42
Tablo 4.4. <i>An. sacharovi</i> gelişim dönemleri arasında SCP-2 geninin ekspresyon düzeylerinin kat değişimleri.	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Örneklem yapılan Sultan Sazlığı ekosistemi	16
Şekil 3.2. Ergin <i>An. sacharovi</i> nesillerinin sahadan toplanması.....	17
Şekil 3.3. <i>An. sacharovi</i> dişi nesillerden yumurtaların eldesi.....	18
Şekil 3.4. İnsektaryumda <i>An. sacharovi</i> gelişim dönemlerinin eldesi.....	22
Şekil 3.5. <i>An. sacharovi</i> erginlerinin yetiştirilmesi	23
Şekil 3.6. SCP-2 gen bölgesi için ilgili sekanslar üzerinde primer dizaynı	27
Şekil 3.7. SCP-2 geni için sybergreen tabanlı qPCR primer dizaynı	29
Şekil 4.1. <i>Anopheles sacharovi</i> ergin dişi ve yumurtaları (Orijinal)	32
Şekil 4.2. <i>An. sacharovi</i> örneklerinin ITS-2 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp); 1-6: Ergin dişi <i>An. sacharovi</i> izolatları; 7: No DNA.....	33
Şekil 4.3. <i>An. sacharovi</i> nesillerine ait ITS-2 gen bölgesi forward ve reverse nükleotid sekanslarının DeNovo analizi ve konsensüs sekansı	34
Şekil 4.4. <i>An. sacharovi</i> nesillerine ait ITS-2 gen bölgesi nükleotid sekansının blast analizi	34
Şekil 4.5. <i>An. sacharovi</i> nesillerine ait izolatların SCP-2 gen bölgesi yönünden PCR sonuçları	35
Şekil 4.6. <i>An. sacharovi</i> SCP-2 geni forward ve reverse dizilimlerin DeNovo analizi.	36
Şekil 4.7. Karakterize edilen izolatların SCP-2 gen sekanslarının çoklu hizalaması	37
Şekil 4.8. Çalışmada karakterize edilen <i>An. sacharovi</i> izolatları (Kırmızı kalın karakter) ile <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> ve <i>Aedes</i> soylarındaki diğer bazı türlerin SCP-2 gen sekanslarına göre filogenetik ilişkisi. Nodeların önündeki rakamlar 1000 bootstrap desteğini göstermektedir. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini ifade etmektedir.....	39
Şekil 4.9. <i>An. sacharovi</i> SCP-2 amino asit sekansı ve özellikleri	40
Şekil 4.10. SCP-2 geninin qPCR ekspresyon analizinde belirlenen amplifikasyon grafikleri.....	41
Şekil 4.11. SCP-2 ve normalizasyon genlerinin qPCR ekspresyon analizinde belirlenen melt pik grafikleri.....	41

Şekil 4.12. SCP-2'nin <i>An. sacharovi</i> gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (ED: Ergin dişi; EE: Ergin erkek).....	42
Şekil 4.13. SCP-2'nin <i>An. sacharovi</i> gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (FB: Fat body; MG: Midgut; TB: Tükürük bezi)	43



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anopheles soyunda yer alan *Maculipennis* kompleks sibling ve kriptik türleri içerdiği anlaşılan sivrisinekler içerisinde ilk örnek olması ve medikal önemleri ile taksonomik klasifikasyon ve filogenetik ilişkiler üzerine çalışmalarda ilgi odağı olmuştur. *Maculipennis* kompleks'in günümüze kadar Palearktik Bölgede 10'un üzerinde türü identifiye edilmiş olmakla birlikte (Sedaghat ve ark., 2003) henüz ilgili coğrafik alanda genetik çeşitlilik üzerine veriler oldukça sınırlıdır. Ülkemizde günümüze kadar yapılan morfolojik analizlerde *Anopheles* soyunda ait 10 türün varlığı tespit edilmiş olup bunlardan dördünün *Maculipennis* komplekste yer alan *An. sacharovi*, *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. messae* olduğu bildirilmiştir (Akıner ve Çağlar, 2010; Alten ve ark., 2000; Günay, 2015; Simsek ve ark., 2011). *Anopheles sacharovi*, *An. atroparvus* ve *An. labranchiae* ile birlikte Palearktik bölgede geçmişten günümüze en etkin sıtma vektörleri olarak nitelenmektedir (Jaenson ve ark., 1986; Kasap, 1990; Romi, 1999; Romi ve ark., 2001). Türkiye (Alten ve ark., 2000; Kasap, 1990), Suriye (Abdel-Malek, 1958; Berberian, 1946) ve Orta Doğu'nun farklı bölgelerinde (Zahar, 1974) *P. vivax* malaryasının en etkin vektörü *An. sacharovi* olarak kaydedilmiştir. Ayrıca Güney Avrupa bölgelerinde ana potansiyel vektör olarak da görülmektedir (Ramsdale ve Snow, 2000; Romi, 1999). *Anopheles* türlerinin vektörlüğünü yaptığı sıtmanın önlenmesindeki en kritik nokta geleneksel olarak kullanılan insektisitlerle beraber sivrisinek popülasyonlarının baskılanmasıdır (Focks ve ark., 2000). Ancak bu mücadelede karşılaşılan en büyük sıkıntı insektisitlere karşı gelişen direnç mekanizmasıdır (Rawlins, 1998). Bu noktada sivrisineklere karşı kolesterol alımı veya taşınması gibi yeni biyoteknolojik yaklaşımlara ihtiyaç bulunmaktadır (Kim ve ark., 2005). İnsektler, tüm ökaryotlar gibi yapısal ve metabolik amaçlar için sterollere ihtiyaç duyarlar. Ancak insektler, tüm artropodlar gibi kolesterol sentez aşamasında anahtar enzimlerden yoksun

oldukları için sterol üretemezler ve bu ihtiyaçlarını dışardan karşılamak zorundadırlar (Jing ve Behmer, 2020).

İnsektler kolesterole bağımlıdırlar, çünkü kolesterol olmadan gelişimlerini tamamlayamaz ve çoğalamazlar. Dolayısıyla dışarıdan kolesterol almak insektler için fizyolojik olarak bir zorunluluktur. Kolesterol oldukça hidrofobiktir (Renshaw ve ark., 1983). Taşıyıcı proteinler, kolesterolün hidrofobik kısmını sitoplazmanın veya hemolenfin sulu ortamından koruyarak kolesterolün verilmesine aracılık eder (Arrese ve ark., 2001; Chino ve Kitazawa, 1981; Yancey ve ark., 1996). Böceklerde kolesterolü hücre içi olarak orta bağırsak epitelinin lümenal tarafından bazal tarafına veya lipid damlacıklarından yağ gövdesindeki sitoplazmik membrana taşımak için bir sterol taşıyıcı proteine (SCP) ihtiyaç vardır. *Aedes* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda (Blitzer ve ark., 2005; Lan ve Massey, 2004), hücre içi bir sterol taşıyıcı protein olan SCP-2'nin hücrel kolesterol transferinden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Bu kapsamda bu tez projesinde, biyoteknolojik mücadele kapsamında çeşitli zararlı ve/veya hastalık nakleden böcekler için aşı adayı veya hedef ilaç bölgelerinden birisi olarak nitelenen sterol taşıyıcı protein-2 geninin *An. sacharovi*'de moleküler karakterizasyonunun ilk kez gerçekleştirilmesi ve bu antijenin sineğin yaşam dönemlerindeki ekspresyon analizleri karşılaştırmalı bir şekilde ortaya konularak genetik çalışmalara katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Anopheles sacharovi*'nin Genel Özellikleri

Sivrisinekler, Diptera dizisinde Culicidae ailesinde Culicinae ve Anophelinae olmak üzere iki alt familyaya ayrılırlar. Culicinae alt ailesindeki sivrisinekler dünya çapında yayılış gösterir. Bu altailede, *Aedes* ve *Culex* olmak üzere iki soy bulunmaktadır. *Anopheles sacharovi*'nin de yer aldığı Anophelinae alt ailesindeki *Anopheles* soyunda yedi altsoyda toplam 465 tür tarif edilmiştir. Bu altsoylar içinde en önemlileri arasında *Anopheles* (182 tür), *Baimaia* (1 tür), *Cellia* (220 tür), *Kerteszia* (12 tür), *Lophopodomyia* (6 tür), *Nyssorhynchus* (39 tür) ve *Stethomyia* (5 tür) yer almaktadır (Ghassemi-Khademi ve ark., 2021). NCBI tabanlı taksonomik sınıflandırmaya göre *Anopheles* türlerinin sınıflandırması aşağıdaki gibidir (NCBI, 2022):

Domain: Eukaryota (Chatton, 1925)

Opisthokonta (Cavalier-Smith 1987)

Metazoa

Eumetazoa

Subkingdom: Bilateria (Hatschek, 1888)

Infrakingdom: Protostomia (Grobber, 1908)

Superphylum: Ecdysozoa (Aguinaldo, Turbeville, Linford, Rivera, Garey, Raff & Lake, 1997)

Panarthropoda (Nielsen, 1995)

Phylum: Arthropoda (von Siebold, 1848)

Subphylum: Mandibulata (Snodgrass, 1938)

Infraphylum: Pancrustacea (Zrzavý & Štys, 1997)

Superclass: Hexapoda (Latreille, 1825)

Class: Insecta (Linnaeus, 1758)

Subclass: Dicondylia

Infraclass: Pterygota (Lang, 1888)

Neoptera

Endopterygota

Order: Diptera (Linnaeus, 1758)

Suborder: Nematocera

Infraorder: Culicomorpha

Superfamily: Culicoidea

Family: Culicidae

Subfamily: Anophelinae

Genus: Anopheles Meigen, 1818

Anopheles albimanus Wiedemann, 1820

Anopheles atroparvus Thiel, 1927

Anopheles atropos Dyar & Knab, 1906

Anopheles barberi Coquillett, 1903

Anopheles bradleyi King, 1939

Anopheles cavernicolus E. Abonnenc, 1954

Anopheles claviger (Meigen, 1804)

Anopheles crucians Wiedemann, 1828

Anopheles culicifacies Giles, 1901

Anopheles dirus Peyton & Harrison, 1979

Anopheles earlei Vargas, 1943

Anopheles franciscanus McCracken, 1904

Anopheles freeborni Aitken, 1939

Anopheles funestus Giles, 1900

Anopheles gambiae Giles, 1902

Anopheles hermsi Barr & Guptavanij, 1988

Anopheles maculatus Theobald, 1901

Anopheles maculipennis group Meigen, 1818

Anopheles messeae Falleroni, 1926
Anopheles moucheti Evans, 1925
Anopheles plumbeus Stephens, 1828
Anopheles punctipennis (Say, 1823)
Anopheles quadrimaculatus Say, 1824
Anopheles stephensi Liston, 1901
Anopheles walkeri Theobald, 1901

Anopheles sacharovi türleri endofilik ve zoo-antropofilik özelliktedirler. Ev, ahır ve barınaklarda sıklıkla bulunurlar. Bu alanlarda hem hayvanlardan hem de insanlardan kan emerek beslenirler. Ayrıca kış aylarında da kan ile beslenebilirler. Erkek bireyler uçarak küme oluşturur ve uçarken çiftleşebilirler. *Anopheles sacharovi*'nin yaşam döngüsünde yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört aşama vardır (Rowland, 2003). Holometabolar yaşam döngüsüne sahiptirler. Bu döngünün sucul (akuatik) aşamasında yumurta, larva ve pupa, karasal aşamasında ise erginler yer alır. Dişiler yumurtalarını su yüzeyine tek tek bırakırlar. Yumurtaların yüzelebilmelerini kolaylaştıran her iki tarafında kanat benzeri yapılar (yüzgeç) bulunur. Yumurtalarda embriyonik gelişim hava ve ortam koşullarına bağlı olarak 2-3 gün ile bir hafta arasında değişir. *Anopheles* soylarına bağlı türlerin yumurtalarında embriyo döneminde kış uykusu (diapoz) gözlenmez. Larvalar embriyonik gelişimi tamamladıktan sonra yumurtadan çıkarlar. Sudaki gelişim döneminde, larva dört kez gömlek değiştirir. Dördüncü larva pupaya dönüşür. Takiben pupa tam bir metamorfoz geçirerek ergin hale dönüşür. Her gelişim aşamasının uzunluğu sıcaklığa ve neme bağlı olarak değişmektedir. Yetişkinlerin doğal koşullarda yaşam sürelerini belirlemek güç olmakla birlikte ortalama 10-14 gün veya daha uzun sürmektedir (CDC, 2022a). Tropikal bölgelerde bir yumurtanın yetiştikine dönüşme süresi 5-7 güne kadar düşebilmektedir (Rowland, 2003).

2.2 Vektörlük Önemi ve Türkiye'deki Mevcut Araştırmalar

Maculipennis kompleks'in günümüze kadar Palearktik Bölgede 10'un üzerinde türü identifiye edilmiş olmakla birlikte (Sedaghat ve ark., 2003) henüz ilgili coğrafik alanda genetik çeşitlilik üzerine veriler oldukça sınırlıdır. *Maculipennis* komplekste

yer alan *An. sacharovi*, *An. atroparvus* ve *An. labranchiae* ile birlikte Palearktik bölgede geçmişten günümüze en etkin sıtma vektörleri olarak nitelenmektedir (Jaenson ve ark., 1986; Kasap, 1990; Romi, 1999; Romi ve ark., 2001). Türkiye (Alten ve ark., 2000; Kasap, 1990), Suriye (Abdel-Malek, 1958; Berberian, 1946) ve Orta Doğu'nun farklı bölgelerinde (Christophers, 1920; Zahar, 1974) *Plasmodium vivax* malaryasının en etkin vektörü *An. sacharovi* olarak kaydedilmiştir. Ayrıca Güney Avrupa bölgelerinde ana potansiyel vektör olarak da görülmektedir (Ramsdale ve Snow, 2000; Romi, 1999). Ülkemizde günümüze kadar morfolojik analizlerle *Anopheles* soyunda 10 türün varlığı bildirilmiş olup bunlardan dördünün *Maculipennis* komplekste yer alan *An. sacharovi*, *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. messae* olduğu görülmektedir (Akıner ve Çağlar, 2010; Alten ve ark., 2000; Günay, 2015; Simsek ve ark., 2011). Ancak Türkiye genelinde medikal önemi oldukça yüksek olan *An. sacharovi* ve diğer *Anopheles* türlerinin, dağılımları ve moleküler filogenetikleri üzerine veriler yetersizdir. Yapılan sınırlı sayıdaki araştırmalarda Sevgili (2009), Türkiye'nin farklı coğrafyalarından örneklediği 117 *Anopheles* larva ve ergin nesillerinin ribozomal ITS-2 gen bölgesi sekans analizleri ile *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. sacharovi* türlerinin varlığını tespit etmiş ve populasyon örneklerinin genetik karakterizasyonunu yapmıştır. Akıner ve Çağlar (2010), Birecik, Beyşehir ve Çankırı yörelerinden örnekledikleri ergin *Anopheles* örneklerinin ribozomal ITS-2 tür spesifik PCR analizleri ile *An. sacharovi*, *An. maculipennis* s.s. ve *An. melanoon* türlerinin yaygınlığını rapor etmişlerdir. Öztürk (2016), Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde bulunan *Anopheles* türlerinin belirlenmesi üzerine yürüttüğü araştırmada ribozomal ITS-2 gen bölgesi PCR ve sekans analizleri ile *An. maculipennis* tür kompleksi içerisinde belirledikleri nesillerin *An. maculipennis* s.s. olduğunu ve bu türün araştırma yöresinde yaygın olduğunu tespit etmiştir. Topluoğlu ve ark. (2019), Şanlıurfa yöresinde örneklediği *Anopheles* larvalarının ribozomal ITS-2 gen bölgesi PCR ve sekans analizleri ile *An. sacharovi* ve *An. superpictus* türlerine ait olduğunu belirlemiş, *An. sacharovi*'nin en yaygın tür olduğunu rapor etmiştir. Köşl  oğlu (2017), Türkiye'nin farklı bölgelerinden çeşitli yakalama yöntemleri kullanılarak elde edilen *Anopheles* örneklerinin ribozomal ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerine göre karakterizasyonunu sağlamıştır. Kayseri yöresinde yürütülen çeşitli araştırmalarda *An. sacharovi* (Korlu,

2018), *An. maculipennis* (Korlu, 2018; Yildirim ve ark., 2011) ve *An. claviger*'in (Korlu, 2018; Yildirim ve ark., 2011) varlığı belirlenmiş olup bunlar arasında *An. sacharovi* popülasyonunun başta Sultan Sazlığı ekosisteminde yaygın olduğu (%58,7) ve risk potansiyeli oluşturduğu belirlenmiştir (Korlu, 2018). Ayrıca sunulan proje önerisinin araştırmacılarının da yer aldığı ilgili çalışmalar (Korlu, 2018) kapsamında *Maculipennis* kompleks üyeleri *An. sacharovi* ve *An. maculipennis* üzerine parsiyel COI barkod sekansları sağlanmış ve dünya veri bankasına Türkiye'den ilk kayıtlar olarak kaydedilmiştir (MF095665-73). Tüm bu araştırma sonuçları sunulan projenin kurgulanmasında yönlendirici olmuştur.

Son yıllarda vektör kontrol programlarının artışına bağlı olarak Dünya genelinde sıtma yaygınlığının azalma eğiliminde olduğu kaydedilmektedir. Ancak Ortadoğu ve Afrika'daki az gelişmiş ülkelerde sıtma halen büyük bir problem olarak devam etmektedir. Ülkemizde de sporadik vakalar halinde özellikle güney bölgelerden bildirimler bulunmaktadır. Ancak özellikle vektörlerin beslenme alışkanlıklarında ve dinlenme davranışlarındaki değişimlerin yanında insektisit dirençliliğinin gelişimi, dünya çapında sıtma kontrolünün belirli ölçüde duraksamasına veya aksaklıklara yol açmaktadır. Genom bazlı yaklaşımlardaki teknolojik gelişimin bir sonucu olarak popülasyon genetiği ve genomik metotlar, vektör popülasyon çeşitliliği, dağılımı ve dinamiklerinin monitorize edilmesi ve anlaşılmasında sıtma kontrol programları çerçevesinde oldukça kullanışlı hale gelmiştir (Main ve ark., 2015; Main ve ark., 2016; Marsden ve ark., 2013).

2.3 Sterol Taşıyıcı Proteinler ve Vektör Sivrisinek Kontrolündeki Önemleri

Vektör kaynaklı hastalıkların kontrolü, vektör popülasyonlarının başarılı bir şekilde kontrolüne bağlıdır (Genta ve ark., 2016). Kimyasalların kullanılmadığı dönemlerde, ana vektör kontrol stratejileri, bataklıkların ve diğer sivrisinek üreme alanlarının drenajını, vektör dinlenme ve üreme yerlerini belirlemek için bitki örtüsünün temizlenmesini ve diğer çeşitli geleneksel yöntemleri içeren çevre yönetimi ve biyolojik kontrolünü içermekteydi (Keiser ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2010). Diklorodifeniltrikloroetan (DDT) in bir insektisit olarak keşfi ile vektör kontrolü daha etkili hale gelmiştir. Ancak bu kimyasalın kontrolsüz kullanımı ekosisteme ve hayvanlara çok ciddi zararlar vermiştir. Bunun yanında sivrisinekler DDT'ye karşı

direnç geliştirmişlerdir (Brown, 1958, 1986; Hamon ve ark., 1968). Bu direnç, yaygın olarak kullanılan diğerk birkaç insektisit için de gözlenmiştir (Hemingway ve Ranson, 2000). Böylece vektör ve vektör kaynaklı hastalıklara karşı nihai çözüm olarak tek bir kimyasalın sürekli bir şekilde kullanılmaması gerektiğı bilgisine varılmıştır. Artropodlarda gözlenen bu direnç gelişimine karşı entegre mücadele kapsamında daha etkili yeni insektisitlere ihtiyaç duyulmaktadır.

İnsektler, kolesterol biyosentez yolundaki bazı temel enzimlere sahip değildir ve kolesterol sentezi yapamazlar (Beydon ve ark., 1987; Grieneisen, 1994). Bu onları, vücut yapılarında önemli bir bileşik olan ve gömlek değıştirme hormonları gibi önemli biyolojik bileşiklerin öncüsü olan kolesterol için dış kaynaklara bağımlı hale getirir (Barton ve ark., 1970; Bellés ve ark., 2005). Bu nedenle, kolesterol alımının herhangi bir hayati basamağının inhibisyonu insektler için ölümcül olacaktır. Bu durum, vektör kaynaklı hastalıklarla mücadelede vektör kontrol stratejisi olarak kolesterol bileşenlerinin kullanımı hipotezini doğurmuştur.

2.3.1 İnsektlerde Hayati Bir Bileşen Olan Kolesterol

Kolestrol, ökaryotik organizmalarda, plazma zarlarının stabilitesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca böceklerin gelişimini etkileyen gömlek değıştirme hormonları ve diğerk sinyal molekülleri de dahil olmak üzere diğerk metabolitlerin öncüsü olarak işlev görür (McKean, 1977). Kolesterol, zarların bütünlüğünü korumak ve hücreler arası sinyal iletimini kolaylaştırmak için önemlidir (Krause ve Regen, 2014; Patra, 2008; Sheng ve ark., 2012). Hem hidrofilik hem de hidrofobik alanlara sahip amfipatik bir moleküldür. Kolesterol molekülü bu amfipatik yapısı ve şekli nedeniyle, en yakın fosfolipid molekülündeki yağ asidi zincirine bağlanır ve bazı suda çözünür moleküllerin geçmesini zorlaştırır (Yeagle, 1985). Bununla birlikte kolesterol, yağ asidi zincirlerinin bir araya gelerek kristalleşmesini önleyen fosfolipitlerin ayrılmasına da yardımcı olur (Halling ve ark., 2008; Yeagle, 1985). Böylece kolesterol, hücre zarını korur. Kolestrol ayrıca, lipid yığınlarının bir parçası olarak hücreler arasındaki iletişim için çok önemlidir ve vücuttaki hücrelerin bağlantısız gruplara dönüşmesini önler (Pike, 2003; Simons ve Ikonen, 2000; Simons ve Toomre, 2000).

Artropodlardaki “ecdysone” ve “20- hydroxyecdysone” gibi gömlek değiştirmede görevli hormonları sentezleyebilmek için öncül madde olarak kolestrol kullanılır (De Loof ve ark., 1984; McKean, 1977). Bu hormonlar genellikle ekdisteroidler olarak bilinir ve artropodların gömlek değiştirme süreci için gereklidir ve bu da büyüme ve gelişmeyi kolaylaştırır (Chan ve ark., 1988; Cranston, 2011; Truman ve ark., 1983). Artropodlardaki juvenil hormon (JH), ekdisteroidlerin salgılanmasını engeller ve JH'nin sıfıra düşmesi, bir sonraki gömlek değiştirme işlevini başlatan ekdisteroidlerin salgılanmasıyla sonuçlanır. Sonraki hormonal eylemler, ekdisteroid hormon salgısını azaltan JH seviyelerinin yükselmesine neden olur. Ecdysis, ekdisteroid seviyelerindeki bu düşüşle tetiklenir (Cranston, 2011; Truman, 2005). Bu hormonal dengeyi koruyabilmek için kolestrole ihtiyaç vardır. Kolesterol yokluğunda artropodlarda gömlek değiştirme olayı gerçekleşmeyecektir. Böylece artropodlarda büyüme bozuklukları şekillenerek gelişim aşamalarında ölümler görülebilecektir (Cranston, 2011; Truman, 2005). Kolesterol sentezi, bir dizi enzim katalizli reaksiyon yoluyla hayvan ve bitki hücrelerinde gerçekleşir. Kolesterol biyosentezi, mitokondride glikoliz veya mitokondrideki yağ asitlerinin β -oksidasyonu yoluyla mitokondride üretilen asetil-CoA'yı ve prekürsör olarak peroksizomu kullanır (Krisans, 1996; Schwenk ve Werthessen, 1952). İlk adım, enzim tiyolaz varlığında asetoasetil-CoA oluşturmak üzere iki asetil-CoA molekülünün yoğunlaşmasıyla başlatılan mevalonat oluşumudur. Daha sonra, HMG-CoA sentaz, HMG-CoA üretmek için başka bir asetil-CoA molekülünü birleştirir. Mevalonat üretiminin son ve hız sınırlayıcı adımı olan HMG-CoA redüktaz, HMG-CoA'yı mevalonata dönüştürür (B. Alberts, 2002; Cerqueira ve ark., 2016). Bir dizi ardışık enzim katalizli reaksiyonun ardından farnesil pirofosfat üretilir. Skualen sentaz varlığında, farnesil pirofosfat, tüm steroidlerin üretiminin öncüsü olan 30 karbonlu skualene dönüştürülür (Cerqueira ve ark., 2016). Skualen önce lanosterole dönüştürülür ve farklı reaksiyonlar yoluyla çeşitli kolesteroller üretilir. Bu kolesteroller ya hormonlar ve hücre ve dokuların yapısal bileşenleri için öncü olarak kullanılır ya da yağ dokusu, karaciğer ve safra kesesi gibi vücut dokularındaki yağ hücrelerinde depolanır (Angel ve Farkas, 1974). Bu kolesterol sentez yolunda farnesil pirofosfatın skualene dönüştürülmesi için gerekli olan enzimler artropodlarda yoktur. Bu enzimler; skualen sentaz, skualen monooksijenaz ve lanosterol sentaz enzimleridir (Beydon ve ark.,

1987; Grieneisen, 1994; Moncecchi ve ark., 1996). Artropodlar de novo kolesterol sentezi yapamazlar ve dolayısıyla büyüme, gelişme ve üreme için gerekli olan fitoller, stigmasterol β sitosterol ve kampesterol gibi sterolleri elde etmek için diyet ve/veya simbiyotik patojenlere bağımlıdırlar (Gilbert ve ark., 2002).

2.3.2 Sterol Taşıyıcı Protein Aracılı Kolesterol Alımı ve İnhibisyonu

Kolesterol, orta bağırsaktan kullanım yerine membranlar ve hücreler arası sıvı, kan ve hücresel sıvılar gibi hidrofilik ortamlar yoluyla taşınmaktadır. Sterol taşıyıcı protein-2 (SCP 2) gen ailesindeki proteinler, sterol taşıyıcı protein-2 (SCP 2) ve sterol taşıyıcı protein-x (SCP x), bu hidrofilik ortamlarda kolesterolün taşınması için organizmaya yardımcı olan moleküller olarak tanımlanmıştır (Lan ve Massey, 2004; Larson ve ark., 2014a).

Omurgalıların aksine, artropod hücreleri, lipoproteinlerin reseptör aracılı endositozu yoluyla orta bağırsak ve yağ gövdesi arasında kolesterolün transferini gerçekleştiremezler (Yun ve ark., 2002). Hidrofobik doğası nedeniyle, kolesterol hücre zarının dış tabakasına kolayca difüze olabilir ve SCP-2 gibi proteinler molekülleri zardan desorbe edebilir ve onları depolama alanına veya metabolik yollara iletebilir (Yun ve ark., 2002). Bu nedenle, kolesterolün bağlanması için mevcut SCP-2 miktarını azaltan herhangi bir yöntem, artropodlarda kolesterol alımını azaltabilir. Genetik düzeyde, AeSCP-2 gen ekspresyonunun aşırı ekspresyonu veya ekspresyonun azaltılmasının kolesterol alımını etkilediği gösterilmiştir (Blitzer ve ark., 2005; Dyer ve ark., 2003; Vyazunova ve ark., 2007). Küçük çift sarmallı AeSCP-2 RNA enjeksiyonu ile larvada AeSCP-2'nin ekspresyonun azaltılması, gelişmekte olan yetişkinlerde yüksek ölüm oranlarına ve *Aedes aegypti*'de yumurta canlılığının azalmasına neden olduğu gözlenmiştir (Blitzer ve ark., 2005). Larvaların radyoaktif [3H] kolesterol içinde yetiştirilmesi ve çıkarılmış lipidlerde [3H] kolesterol seviyesinin ölçülmesi, AeSCP-2 geninin ekspresyonun azaltılması pupalarda birikmiş kolesterolde %33 azalma ile sonuçlandığını göstermiştir (Blitzer ve ark., 2005). Kolesterol ile aynı aktif bölgeye bağlanabilen bir molekülün varlığında, kolesterolün bağlanabileceği AeSCP-2 miktarı azalır. Böyle bir durum, kolesterol alımını engeller veya önemli ölçüde azaltır. Birçok çalışma, rekabetçi bağlanma yoluyla SCP-2'nin etkisini engelleyen

kimyasal bileşikler keşfetmeye yönelik girişimlerde bulunmuştur. Bazıları sentetik organik bileşiklerdir (Kim ve ark., 2005), bazıları ise fitokimyasallardır (Anstrom ve ark., 2012; Ee ve ark., 2006; Larson ve ark., 2014b). Ayrıca, SCP-2'nin etkisini engelleme kabiliyetine sahip olduğu gösterilen bazı sentetik fitokimyasal analogları da vardır. Kimyasal kütüphanelerdeki yaklaşık 16.000 bileşikten yaklaşık 57 organik bileşik, sterol taşıyıcı protein inhibitörleri (SCPI'ler) olarak tanımlanmıştır (Kim ve ark., 2005). Bunlar arasında, AeSCP-2 inhibe edici aktiviteye dayalı olarak beş ana organik bileşik tanımlanmıştır. Bunlar SCPI-1, SCPI-2, SCPI-3, SCPI-4 ve SCPI-5 olarak adlandırılmıştır (Tablo 1). AeSCP-2'ye afinite düzeyleri göz önünde bulundurulduğunda, SCPI-5 ve SCPI-2'nin diğerlerinden daha yüksek bir afiniteye sahip olduğu ve gelecek vadeci sonuçlar göstermiştir. Kim ve ark. (Kim ve ark., 2005) tarafından yapılan bu çalışma (Kim ve ark., 2005), sivrisineklerde kolesterol alımını inhibe etme etkinliğinin SCPI-3 > SCPI-2 > SCPI-4 > SCPI-1 > SCPI-5 sırasına göre değiştiğini ortaya koydu. Hem sivrisinek sterol taşıyıcı protein 2 (AeSCP-2) hem de sivrisinek sterol taşıyıcı protein-x (AeSCP-x) inhibe edilebilir ve AeSCP-2 inhibisyonunun sivrisinekler üzerinde ölümcül etkiler yaratmada daha etkili olduğu bulunmuştur. Sonraki çalışmalarda, SCPI-1 ve SCPI-2'nin *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* ve *Culex pipiens* gibi sivrisinek türlerinde geniş toksisiteye sahip olduğunu ortaya konulmuştur (Larson ve ark., 2014a; Li ve ark., 2009). Ayrıca, AeSCP-2 inhibitörleri ile birlikte kullanıldığında permetrin gibi insektisitlerin toksisitesinde bir artış olduğu bildirilmektedir (Li ve ark., 2009). Ayrıca, AeSCP-2 aracılı kolesterol alım yolunun *Aedes* sivrisineklerinde dang virüsü üretimi için önemli olduğu ve AeSCP-2 aktivitesinin inhibisyonunun sivrisinek hücreleri içinde in vitro olarak baskılanmış virüs üretimi ile sonuçlandığı da açıklanmıştır (Fu ve ark., 2015). Kurkumin, antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser özellikleri dahil olmak üzere çeşitli biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinen başka bir bileşiktir (Anand ve ark., 2008). Bu bileşiğin sentetik analoglarının da AeSCP-2 inhibe edici aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Anstrom ve ark., 2012). Bunlardan (Tablo 1), 1,5-bis (3,4,5-trimetoksi-fenil)-penta-1,4 dien-3-on, AeSCP-2 aktivitesinin inhibisyonunda en etkili bileşiklerdir. Bununla birlikte, burada analiz edilen kurkumin analoglarından sadece

biri (2E,6E)-2-6-bis (furan-2 ylmethilen) sikloheksanon, *Ae. aegypti* larvasına karşı larvisit aktivite sergiledi.

Tablo 2.1. *Ae. aegypti*'ye karşı AeSCP-2 inhibe edici aktiviteye sahip sentetik organik bileşikler (Anstrom ve ark., 2012; Kim ve ark., 2005)

Compounds	(IC ₅₀ /EC ₅₀) μ M
<i>SCPIs</i>	
<i>N</i> -(4-{[4-(3,4-Dichlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]amino}phenyl)acetamidehydrobromide (SCPI-1)	0.347 (IC ₅₀)
8-Chloro-2-(3-methoxyphenyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydroisothiazolo[5,4-c]quinoline-1(2H)-thione (SCPI-2)	0.059 (IC ₅₀)
3-(4-Bromophenyl)-5-methoxy-7-nitro-4H-1,2,4-benzoxadiazine (SCPI-3)	0.159 (IC ₅₀)
4,4,8-Trimethyl-5-(3-methylbutanoyl)-4,5-dihydro-1H-[1,2]dithiolo[3,4-c]quinoline-1-thione (SCPI-4)	0.065 (IC ₅₀)
3-Bromo- <i>N</i> -{2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)amino]ethyl}-4-ethoxybenzamide (SCPI-5)	0.042 (IC ₅₀)
<i>Synthetic analogs of curcumin</i>	
(2E,6E)-2-6-Bis(3,4,5-trimethoxybenzylidene) cyclohexanone	12.11 (EC ₅₀)
(2E,6E)-2-6-Bis(furan-2-ylmethylene) cyclohexanone	62.87 (EC ₅₀)
(1E,4E)-1,5-Bis(4-hydroxyphenyl) penta-1,4-dien-3-one	2.38 (EC ₅₀)
(1E,4E)-1-(2-Hydroxyphenyl)-5-phenylpenta-1,4-dien-3-one	2.02 (EC ₅₀)
1,5-Bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-penta-1,4-dien-3-one	0.65 (EC ₅₀)

Larvisid aktivite için test edilen bu bileşiklere ek olarak, bazı fitokimyasallar da AeSCP-2'yi inhibe etmede gelecek vadeden sonuçlar göstermiştir (Tablo 2). *Saxifraga stolonifera* (sürünen saksafon çiçeği) bitkisinden izole edilen quercetin adlı bileşiğin, AeSCP-2 inhibe edici aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Anstrom ve ark., 2012). *Garcinia mangostana* (mangosten) bitkisinden izole edilen α mangostin adlı başka bir bileşik, altı sivrisinek türüne karşı larva öldürücü etkiler sergilediği için daha umut verici sonuçlar vermiştir. Bu türler; *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens pipiens*, *Anopheles quadrimaculatus* ve *Culex quinquefasciatus* 'dur (Larson ve ark., 2014a).

Tablo 2.2. Tıbbi açıdan önemli artropodlara karşı SCP-2 inhıbe edici aktiviteye sahip fitokimyasallar (Perera ve Wijerathna, 2019)

Compound/extraction	Plant species	Part of the plant	LC ₅₀ µgml ⁻¹	Reference
			19.4 µgml ⁻¹ (<i>Ae. aegypti</i>)	Ee et al. [44]
			5.0 (<i>Ae. aegypti</i>)	
			4.0 (<i>An. gambiae</i>)	
α-Mangostin	<i>Garcinia mangostana</i>	Pericarp of the fruit	11.0 (<i>An. quadrimaculatus</i>)	Larson et al. [45]
			6.0 (<i>An. stephensi</i>)	
			6.0 (<i>Cx. pipiens pipiens</i>)	
			8.0 (<i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i>)	
			23.3 (<i>Ae. aegypti</i>)	Sasikumar and Ghosh, [49]
Quercetin	<i>Saxifraga stolonifera</i>	Whole plant	7.53 µgml ⁻¹ (<i>Ae. aegypti</i>)	Anstrom et al. [43]
Dulxanthone	<i>Garcinia mangostana</i>	Pericarp of the fruit	8.81 (<i>Ae. aegypti</i>)	Sasikumar and Ghosh, [49]

Garcinia mangostana'dan izole edilen alfa-mangostin ve pantenol moleküler yerleştirme yöntemine dayalı olarak tanımlanmıştır. Bu bitki kaynaklı kimyasalların AeSCP-2'ye bağlanma ve etkinliğini engelleme potansiyeli göstermektedir (Kumar ve ark., 2010). Ayrıca, aynı teknik, *Calotropis gigantea*'dan ekstrakte edilen terpenin, α-amirin'in etkili bir AeSCP-2 inhibitör potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Kumar ve ark., 2012).

Kurkuminin sentetik analoglarının sentezlenmesi çok kolaydır ve çeşitli kimyasal yapıları nedeniyle çok zengin bir potansiyel insektisit kaynağıdır. Ancak yine de bu bileşiklerin sentezi, ileri laboratuvar ayarları gerektirir ve işlemin maliyeti de yüksektir. Vektör kontrolü için daha az pahalı ve yerel olarak temin edilebilen bir materyalin gerekliliği göz önüne alındığında, sentetik bileşikler yerine fitokimyasallar seçilebilir (Perera ve Wijerathna, 2019).

Bununla birlikte, şimdiye kadar AeSCP-2 inhıbe edici aktiviteye sahip çok az sayıda bileşik keşfedilmiştir. Birkaç bileşik arasında, α mangostinin, en düşük 24 saat LC₅₀ değerleriyle *Ae aegypti*'nin kontrolüne karşı daha umut verici olduğu gösterilmiştir (Tablo 2). Bununla birlikte, gelecekte daha fazla bileşik ele alınacaktır ve bu bileşiklerin diğer türler üzerindeki etkinliği, vektörlere karşı kullanılacak en iyi bileşiğin doğru bir şekilde seçilmesini sağlayacaktır.

2.3.3. İnsekt Mücadelesinde Kolesterol Aracılı İleri Perspektifler

İnsektisit direnci, vektör kaynaklı hastalıkların kontrolünde en önemli sorunlardan biridir. İnsektisit direncine ilişkin ilk rapor 1940'larda aşırı DDT kullanımı ile rapor edilmiştir (Brown, 1986). En az 100 sivrisinek türü ve diğer hastalık bulaştırıcı vektörlerin insektisitlere dirençli olduğu bildirilmektedir (Biology ve ark., 1992). İnsektisit doğası gereği ister biyolojik bir kontrol ajanı, ister kimyasal bir bileşik olsun, insektisitlere karşı böceklerde her zaman direnç geliştirme ihtimali vardır (Hemingway ve Ranson, 2000; Ranson ve ark., 2011). Bu nedenle, bu tür bir direncin gelişmesinin entegre vektör kontrol programları kapsamında önlenmesi önemlidir (Organization, 2004).

Ayrıca, insektisitlerin diğer hayvanlar üzerinde hiçbir etkisi olmadığından emin olmak çok önemlidir. Bildirilen çalışmalarda test edilen bileşiklerin çoğu, sivrisinek SCP-2'ye özgüdür ve hedeflenmeyen türlere zarar verme olasılığının daha düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, çevreye karşı zararlı olup olmadığını doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu bileşiklerin vektörlerin kontrolünde kullanımı ile ilgili pratik hususlara da dikkat etmek önemlidir. Örneğin, bileşiğin ortamdaki kalıcılığı belirlenmeli ve bu bileşiklerin ortamdaki yarı ömürlerini en üst düzeye çıkarmak için önlemler alınmalıdır. Ancak, vektörler üzerinde etkili olmak için süre yeterli olmalı ve diğer çevresel etkilere sahip olmak için çok kalıcı olmamalıdır. α -mangostin gibi doğal olarak oluşan bileşiklerin kullanılması, diğer çevresel etkilere neden olmadığı için bu sorunu ortadan kaldırabilir (Bullangpoti ve ark., 2007). α -Mangostin'in 6 saat boyunca güneş ışığına maruz kaldığında larvisit aktivitesinde azalma olduğu bulundu (Larson ve ark., 2014a). Bu, fotostabil olmadıkları için fitokimyasalların çoğuyla ilişkili sorundur. Bu nedenle, bu bileşikler, dış ortamda aylarca biyolojik olarak aktif kalmalarına izin veren metopren larvisitler için kullanılan UV bloke edici katkı maddeleri ile birleştirilmiş yavaş salınan formülasyonlar gibi dikkatli bir hazırlık gerektirecektir (Larson ve ark., 2014a; Lorenz ve ark., 2013).

Potansiyel bir AeSCP-2 inhibitör aktivitesine sahip çok çeşitli diğer bitki özleri, çeşitli sivrisinek türlerine karşı insektisidal etkiler göstermiştir (Andrade-Ochoa ve

ark., 2018; Murty ve ark., 1997; Pathak ve ark.; Perich ve ark., 1994). Bununla birlikte, bu bileşiklerin kesin etki şekli henüz anlaşılamamıştır. Bu nedenle, AeSCP-2'nin inhibisyonu, farklı bir etki şekline sahip bileşiklerle ilgili olarak daha spesifik olarak bir hedef böcek grubuna etki ettiğinden, çalışmalar bu bileşiklerin etki modunu doğrulamaya odaklanmalıdır.

SCP-2 omurgalılarda hayatta kalmak için kritik değildir (Kannenbergh ve ark., 1999; Klipsic ve ark., 2015). Ayrıca, ampirik kanıtlar, α -mangostin'in sıçanlar üzerinde olumsuz bir biyolojik etkisi olmadığını doğrulamıştır (Larson ve ark., 2014a). Ayrıca, ampirik kanıtlar, α -mangostin'in sıçanlar üzerinde olumsuz bir biyolojik etkisi olmadığını doğrulamıştır (Larson ve ark., 2014a). Bu nedenle, böceklerde kolesterol alımını engelleyen bileşiklerin memeliler için daha az zararlı olduğu açıktır. Kim ve ark. (Kim ve ark., 2005)'nin gösterdiği gibi, α mangostin ayrıca sivrisineklerden tamamen farklı bir takım olan Lepidoptera takımının bir türü olan *Manduca sexta*'yı da etkilediğini bildirmiş, bunun da bu bileşiklerin tıbbi açıdan önemli türler dışındaki insektler üzerinde de etkili olabileceği anlamına geldiğini rapor etmişlerdir. Moleküler düzeydeki çalışmalar, SCP-2 inhibitör bileşiklerinin farklı özgüllüğüne neden olan yapısal farklılıkları ortaya çıkarmıştır (Dyer ve ark., 2003; Singarapu ve ark., 2010). Moleküler düzeydeki çalışmalar, sadece bir grup veya tek bir böcek türünü hedef alarak, SCP-2 inhibitör bileşik moleküllerinin özgüllüğünü artırma yolunda farklı özgüllüğe neden olan yapısal farklılıkları ortaya çıkarmıştır. Ancak bu, çok sayıda uzun vadeli moleküler düzeyde çalışma ve yüksek maliyetli laboratuvar prosedürleri gerektirir ve bu nedenle elde edilmesi uzun zaman alabilir. Bu yöntemin sivrisinekler dışındaki tıbbi açıdan önemli insektlere karşı kullanılma olasılığı konusunda hemen hemen hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, bu SCP inhibitörlerinin diğer vektörlere, özellikle Afrika ve Asya bölgelerinde her yıl çok sayıda ölümden sorumlu olan kum sinekleri ve çeçe sineklerine karşı etkinliğini değerlendirmek için maruz kalma denemeleri gereklidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

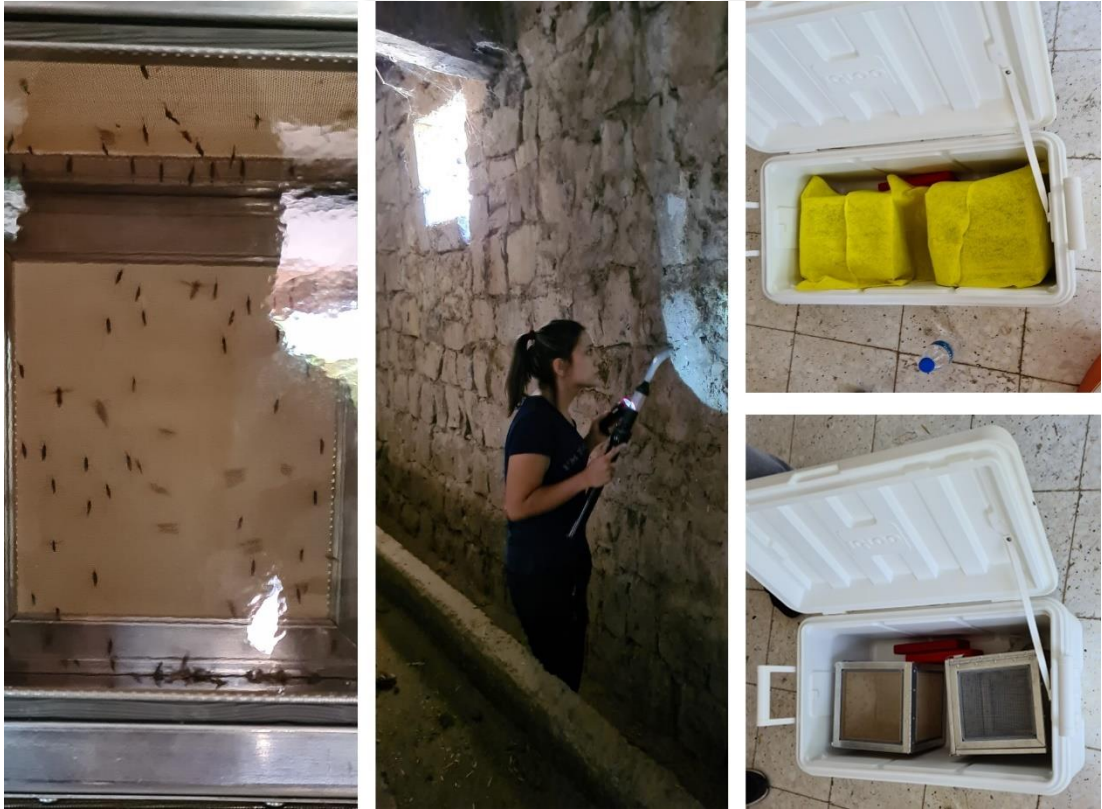
3.1. *Anopheles* Soyundaki Ergin Sivrisinek Örneklerinin Sahadan Toplanması

Anopheles soyundaki ergin sivrisinek örnekleri Mayıs-Ağustos 2021 tarihleri arasında Sultan Sazlığı ekosisteminden toplanmıştır. Sultan Sazlığı, Kayseri ilinin güneyinde bulunan Develi Ovası'nda 17.200 hektarlık alanı içermektedir. Sulak alanın büyük bir kısmı Yeşilhisar İlçe sınırları içerisinde bulunan Sultan Sazlığı 35°.00–35°.35 doğu ve 38°.05-38°.40 kuzey koordinatlarında yer almaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Örneklem yapılan Sultan Sazlığı ekosistemi

Belirlenen örnekleme alanlarında *An. sacharovi* ergin dişi örnekleri hayvan ahırları/barınakları, ev içleri, kiler, depo gibi uygun kapalı alanlarda gündüz saatlerinde bataryalı aspiratörler (2809D, BioQuip, ABD) ve hepa filtreli basit ağız aspiratörleri ve el fenerleri yardımıyla toplanmıştır (Şekil 3.1-Şekil 3.2). Örneklem boyunca kan emmiş, yarı gravid veya gravid ergin dişi sivrisineklerin toplanmasına dikkat edilmiştir. Aspiratörler aracılığıyla yakalanan örnekler küçük sivrisinek kafeslerine aktarılmış ve içerisinde buz aküleri, buz kalıpları bulunan arazi tipi taşınabilir buzluklara aktararak koruma altına alınmış ve laboratuvar ortamına en kısa sürede taşınmıştır (Şekil 3.2). Örneklerin taşınma sırasında ölüm oranını azaltmak için buzluklar içerisine ayrıca nemli bez parçaları konulmuş, nemli ve serin bir ortamda taşınmaları sağlanmıştır.



Şekil 3.2. Ergin *An. sacharovi* nesillerinin sahadan toplanması

3.2. *Anopheles sacharovi*'nin Morfolojik ve Moleküler İdentifikasyonu, İnsektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi

3.2.1. Morfolojik Teşhis

İnsektaryuma getirilerek uygun kaplar içerisine alınarak yumurtlamaları sağlanan tüm dişiler (Şekil 3.3) ayrılmış ve stereo-mikroskop altında ergin ve yumurta morfolojisine göre teşhis anahtarı kullanarak (Schaffner, 2011; Sevgili ve Simsek, 2012; WRBU, 2022) tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir. Yumurtlayan ergin dişi örnekler PBS içerisinde en az üç kez yıkanarak kod numarasıyla birlikte -80°C'lik derin dondurucuya total RNA izolasyonunda kullanılmak üzere alınmıştır. Derin dondurucuya alınmadan önce her örneğin bacakları ayrılarak içerisinde %96'lık etanol bulunan ayrı steril mikrosantrifüj tüplerine moleküler teşhis için DNA izolasyonu amacıyla alınmıştır. Morfolojik teşhis sonucu *An. sacharovi* olarak teşhis edilen örneklere ait yumurtalar ise gelişim dönemlerinin eldesi için insektaryumda yetiştirme prosesine alınmıştır.



Şekil 3.3. *Anopheles sacharovi* dişi nesillerden yumurtaların eldesi

3.2.2. Moleküler Teşhis

Ergin dişi ve yumurtalarının morfolojisine göre *An. sacharovi* olarak teşhisi sağlanan örnekler, tür teşhislerinin konfirmasyonu için moleküler analizlere alınmıştır.

Etanol bulunan mikrosantrifüj tüplerine alınan bacaklardan genomik DNA izolasyonu, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiştir.

1. Mikrosantrifüj tüp içerisinde bulunan örneklerin üzerine 180 µl Digestion Solution ilave edilerek süspanse edilmiştir.
2. Hazırlanan karışımın içerisine 20 µl Proteinase K Solution eklenerek vortekslenerek örnekler 56 °C’de 1 gece su banyosunda inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyona tabii tutulan örnekler vortekslenmiştir.
4. Vortekslenen örneklerin üzerine 20 µl RNase A Solution eklenerek tekrar vorteks yapılmıştır ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyona tabii tutulan örneklerin üzerine 200 µL Lysis Solution eklenerek homojen bir karışım elde edilinceye kadar 15 sn vortekslenmiştir.
6. Vortekslenen örneklerin üzerine 400 µL %50’lik ethanol eklenerek tekrar vortekslenmiştir.
7. Ardından 2 ml toplama tüplerinin içerisine spin kolonlar yerleştirilerek tüm lizat spin kolonlara transfer edilmiştir. Daha sonra 6.000 g’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
8. Spin kolondan süzülerek toplama tüplerine biriken sıvı uzaklaştırılarak spin kolonlar yeni 2 ml tüpe yerleştirilmiştir. Daha sonra 6.000 g ‘de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Spin kolondan içerisine 500 µl Wash Buffer I ilave edilerek 8.000 g’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırılıp aynı tüpe konulmuştur.
11. Ardından spin kolondan içerisine 500 µl Wash Buffer II ilave edilerek 17.000 g’de 3 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra toplama tüpüne biriken sıvı dökülerek boş bir şekilde tekrardan 17.000 g’de 1 dk santrifüj edilmiştir.

12. Toplama tüpü atılarak spin kolon steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içerisine alınmıştır. Bu işlemi takiben spin kolondan içerisine 50 µl Elution Buffer ilave edilmiştir.
13. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler inkübasyonun ardından 8.000 g'de 1 dk santirfüj edilerek genomik DNA izolasyonu tamamlanmıştır.
14. Çalışılan örnekler ait genomik DNA'lar kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Örneklere ait gDNA izolatları, *An. sacharovi* ITS-2 (Kronefeld ve ark., 2014; Proft ve ark., 1999) gen bölgesinin 180 bp'lik fragmentini spesifik olarak amplifiye eden primerlerle PCR'da analiz edilmiştir. PCR reaksiyonları 25 µl final konsantrasyonda hazır kullanımlık Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (12,5 µl) (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM her bir primer (1,3 µl) ve 10-20 ng kalıp DNA (2 µl) olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler C1000 Touch thermalcycler cihazına (BioRad) yerleştirilerek, termal profil 95°C'de 2 dk; 35 siklus 95°C'de 30 sn, 57°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 dk; 72°C'de 10 dk olarak ayarlanmış ve amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (BioRad) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solüsyon hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinin doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin her birinden 5 µl alınıp 130 V'da 30 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

PCR analizleri sonrası, hedef büyüklükteki ITS-2 gen bölgesi amplikonları ayrıca PCR primerleri ile sekans analizine tabii tutulmuş ve tür teşhisleri elde edilen nükleotid dizilerinin GenBank veri tabanındaki referans izolatlarla birlikte hizalama analizleri yapılarak konfirme edilmiştir.

3.2.3. İnsektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi

Morfolojik ve moleküler analizlerle *An. sacharovi* olarak teşhis edilen toplam 50 dişi sivrisinek örneğine ait yumurtalar larva 1 dönemi çıkana kadar bulundukları kaplar

içerisinde takip edilmiştir. 1. dönem larvaların çıkışını takiben tüm larvalar geniş ağızlı pipetler yardımıyla dikkatli bir şekilde gelişim kaplarına aktarılmıştır (Şekil 3.4). Larval besleme sürecinden önce 240 (3 tekrar oluşturmak üzere) adet L1 SCP2 geninin karakterizasyonu ve ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere ayrılarak üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında -80°C'lik derin dondurucuya konulmuştur. *Anopheles sacharovi*'nin insektaryumda yetiştirilmesi ve gelişim dönemlerinin sağlanmasında ilgili referans protokoller takip edilmiştir (Kasap ve ark., 2003; Kasap ve Kasap, 1983; MR4, 2014; Şimşek ve ark., 2005).

Özet olarak, gelişim dönemleri için insektaryum ortamının gerekli optimum sıcaklık, nispi nem ve fotoperiyot koşulları; 26-30°C, 70%±10% nispi nem ve 12saat:12saat aydınlık: karanlık fotoperiyot şeklinde ayarlanmıştır. Larval gelişim dönemlerinde larva beslenme kaplarında ortaya çıkan bakteri veya fungus kontaminasyonlarına bağlı ölüm oranlarını azaltmak için larvaların konulduğu kaplar dezenfekte edildikten sonra kullanılmıştır. Larva kapları kendinden kapaklı özellikli olup üzerlerine delikler açılmış ve böylece laboratuvar ortamındaki atmosferden kontaminasyon oluşma riski en aza indirilmiştir. Bu gelişim süresi içerisinde larvaları besleme amacıyla ağırlıklı olarak öğütülmüş pul balık yemi (TertaMin), larval gelişim hızlarına bağlı olarak bazı durumlarda da kedi maması+balık yemi eşit oranda karıştırılıp toz haline getirilerek günlük olarak verilmiştir (Besin miktarı larva kaplarındaki larvaların yoğunluğuna ve gelişmişlik düzeyine göre ayarlanmıştır). Larval gelişim süresince (Şekil 3.4) larva kaplarında kireçten arındırılmış musluk suyu kullanılmıştır. Larva kaplarında bazen kontaminasyonlara bağlı su kirliliği oluşmuş olup (su yüzeyinde yağimsı tabaka oluşumu, suyun bulanıklaşması) böyle durumlarda larvalar temiz su bulunan yeni bir larva gelişim kabına aktarılmıştır. Larval gelişim süreci takip edilerek yaklaşık 10-14 günde (CDC, 2022a) (Yumurta-L1: 2-3 gün; L1-L2: 2-3 gün; L2-L3: 2-3 gün; L3-L4: 3-4 gün; L4-Pupa: 3-4 gün; Pupa-Ergin: 2-3 gün) pupaya dönüşen (Şekil 3.4) örneklerden L1, L2, L3, L4 ve pupa dönemleri için ilgili zaman aralıklarında SCP2 geninin karakterizasyonu ve ekspresyon analizleri amacıyla sırasıyla 240, 180, 120, 60 ve 15 (3 tekrar oluşturmak üzere) (Dzaki ve ark., 2017) örnek ayrılarak üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında -80°C'lik derin dondurucuya konulmuştur.



Şekil 3.4. İnsektaryumda *Anopheles sacharovi* gelişim dönemlerinin eldesi

Larval besleme kaplarında gelişen pupalar küçük ve geniş ağızlı pipetler aracılığıyla toplanarak erginleşme kaplarına alınmış ve bu kaplar büyük yetiştirme kafesine aktarılmıştır. Yaklaşık 2-3 gün içerisinde pupadan çıkan ergin sinekler, büyük kafes içerisinde pamuklara emdirilmiş %10'luk şeker çözeltisi ve ayrıca çeşitli bitki öz sularıyla yaklaşık 2 gün beslenmeleri yapılmıştır (Şekil 3.5). Takiben ergin erkek ve dişilerden bireysel olarak ayrılan üçer örnek (3 tekrar oluşturmak üzere) üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında SCP2 geninin karakterizasyon ve ekspresyon analizleri amacıyla -80°C'lik derin dondurucuya konulmuştur.



Şekil 3.5. *Anopheles sacharovi* erginlerinin yetiştirilmesi

3.3. Sterol Taşıyıcı Protein-2 Geninin Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri

3.3.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

SCP-2 geninin moleküler karakterizasyonu amacıyla, sahadan toplanarak yumurtaları geliştirmeye alınan ve yumurtlama sonrası teşhisleri sağlanarak -80°C 'lik derin dondurucuya alınmış olan 50 adet dişi *An. sacharovi* örneğinden 7'si kullanılmıştır. Ayrıca Başlık 3.2.3'de belirtilen her gelişim dönemi için oluşturulmuş üç replikasyondan birisi moleküler karakterizasyon çalışmasına dahil edilmiş ve böylece toplam 14 izolata ait total RNA'lar sekans analizleri için kullanılmıştır. SCP-2 geninin ekspresyon analizleri için Başlık 3.2.3'de belirtilen sayıda insektaryumda yetiştirilen tüm gelişim dönemlerine ait örnekler kullanılmıştır. Sahadan toplanan ergin dişilerden bireysel olarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, insektaryum hattından ise ilgili gelişim dönemlerine ait Başlık 3.2.3'de belirtilen sayıda örneği içeren havuzlar oluşturulmuş ve total RNA izolasyonuna alınmıştır. SCP-2 geninin *An. sacharovi* dişi nesillerinin tükrük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusu gibi organlarında ekspresyon düzeylerinin araştırılması amacıyla insektaryum hattından

elde edilen toplam 30 ergin dişiye ait ilgili dokular steril olarak diseke edilmiş ve her doku 10'arlı olarak tüplere yerleştirilmiş ve üç replikasyonun oluşumu sağlanmıştır. Sonraki basamakta oluşturulan doku havuzları total RNA izolasyonuna alınmıştır. Örneklerinden total RNA izolasyonu, GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiş olup, prosedüre başlamadan önce:

- Çalışma için gerekli miktarda Lysis Buffer β -mercaptoethanol veya DTT ile tamamlanmıştır. Gereken her 1 mL Lysis Buffer hacmine 20 μ L 14.3 M β -mercaptoethanol veya 2 M DTT eklenmiştir.
 - Çalışma için gerekli miktarda Proteinaz K çözeltisi hazırlanması: 10 μ L Proteinaz K'yi 590 μ L TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) ile seyrelterek hazırlandı. Ardından RNA izolasyon basamaklarına geçildi.
- I. *Anopheles sacharovi*'nin gelişim dönemlerinden ve doku parçalarından yaklaşık 30 mg tartılmıştır. Örneklerin birbirleri ile karışmasını önlemek adına her örneğe ayrı bir protokol numarası verilerek steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Steril mikrosantrifüj tüplerine alınan örnekler sıvı nitrojen ve pestel yardımı ile iyice ezilmiştir. Ezilen her bir örnek üzerine yukarıda verilen açıklama doğrultusunda β -merkaptetanol eklenerek hazırlanan Lysis Buffer'dan 300 μ L olacak şekilde eklenmiştir. Ezilen örneklerin Lysis Buffer ile iyice karışmasını sağlamak için 10 saniye vortekslenmiştir.
 - II. Lysis Buffer eklenerek vortekslenen örneklerin üzerine yukarıda verilen açıklama doğrultusunda dilüe edilmiş 600 μ L Proteinaz K eklenmiştir. İşlem sonrasında örnekler vortekslenerek 15-25 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
 - III. İnkübasyondan sonra başlangıçta eklenen materyalin miktarına göre 5 dakika (lizat >10 mg başlangıç malzemesinden hazırlanmışsa) ya da 10 dakika (lizat $\geq$ 10 mg başlangıç malzemesinden hazırlanmışsa) x 12000 $\times$ g' de santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantı yeni bir RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
 - IV. Yeni tüpe aktarılan süpernatantın üzerine 450 μ L etanol (%96-100) ekleyerek pipetle karıştırılmıştır.
 - V. Elde edilen lizattan 700 μ L alınarak 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilen GeneJET RNA Saflaştırma Kolonu'na aktarılmıştır. Santrifüj cihazına

yerleştirilen kolon 1 dakika boyunca $\geq 12000 \times g$ 'de santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken lizat dökülerek kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

- VI. Tekrardan toplama tüpüne yerleştirilen GeneJET RNA Saflaştırma Kolonunun üzerine 700 μ L f Wash Buffer 1 (etanol eklenmiş) eklenerek $12000 \geq g$ 'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken lizat dökülerek kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- VII. Yerleştirilen GeneJET RNA Saflaştırma Kolonunun üzerine 600 μ L f Wash Buffer 2 (etanol eklenmiş) eklenerek $12000 \geq g$ 'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken lizat dökülerek kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- VIII. Yerleştirilen GeneJET RNA Saflaştırma Kolonunun üzerine 250 μ L f Wash Buffer 2 eklenerek $12000 \geq g$ 'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken lizat dökülerek atılmıştır. Kolon 1.5mL RNase-free mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- IX. Yerleştirilen GeneJET RNA Saflaştırma Kolonunun üzerine 50 μ L nuclease-free su eklenerek $12000 \geq g$ 'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- X. GeneJET RNA Saflaştırma Kolonu atılarak 1.5 mL RNase-free mikrosantrifüj tüpüne toplanan saflaştırılmış RNA kullanılabileceğine kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

Total RNA izolatlarından komplementer DNA elde etmek için iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) protokolü uygulanmıştır.

cDNA Elde Edebilmek İçin Reaksiyon Basamağının Kurulması:

1. Her bir örnek için iScript DNase'dan 0.5 μ L ve iScript DNase Buffer'dan 1.5 μ L eklenerek total volüm 2 μ L olacak şekilde DNase master mix hazırlandı. Hazırlanan DNase master mix PCR tüplerine 2 μ L olarak dağıtıldı.
2. Dağıtılan 2 μ L DNase master mix'in üzerine 14 μ L total RNA örnekleri eklendi.
3. Homojen bir şekilde karışmasını sağlamak için pipetaj yapılmıştır.
4. Thermal cycler kullanılarak reaksiyonun inkübasyonu aşağıdaki yönergelere göre yapılmıştır.

Table 3.1. DNase reaksiyon protokolü

Adım	Sıcaklık, °C	Süre, dk
DNA digestion	25	5
DNase inactivation	75	5
Storage conditions	4; ice	Until RT step

cDNA Sentezi İçin Reaksiyon Basamağının Kurulması:

1. cDNA synthesis reaction mix'i hazırlamak için DNase-treated RNA template'in üzerine iScript Reverse Transcription Supermix eklenerek pipetleme yolu ile homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.

Table 3.2. cDNA sentez reaksiyonunun kurulması

Bileşen	Reaksiyon Başına Hacim, µl
iScript Reverse Transcription Supermix	4
DNase-treated RNA template	16
Total volüme	20

2. Tamamlanan reaksiyon karışımı Tablo 3.3'teki protokole göre termal döngü cihazında inkübe edilmiştir.

Table 3.3. cDNA sentezinde termal döngü protokolü

Adım	Sıcaklık, °C	Süre, dk
Priming	25	5
Reverse transcription	46	20
RT inactivation	95	1
Hold (opsiyonel)	4	-

Termal döngü protokolünün tamamlanmasından sonra örneklere ait elde edilen cDNA'lar kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. SCP-2 Geninin Amplifikasyonu ve Sekanslanması

Elde edilen cDNA kalıplarında Sterol Taşıyıcı Protein-2 gen bölgesinin amplifiye edilmesi için Şekil 3.6'da verilen diğer bazı *Anopheles* ve *Culex* türlerine ait ilgili gen sekansları üzerinde optimum özellikte primer dizaynı gerçekleştirilmiş ve sonrasında SCP-2 geninin 216 bp kısmını çoğaltan SCP76F (5'-GTGCAGCAGATSTACAAGT TC-3') ve SCP291R (5'-CTCAACCTGTCCCTCCACRTCSAG-3') primerleri sentezletilmiştir.

tutulmuştur. Sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. PCR analizleri sonrası, SCP-2 gen bölgesi amplikonları uygun konsantrasyonda hazırlanarak PCR primerleri ile birlikte MacroGen Europe firmasında çift yönlü olarak sekanslatılmıştır.

3.3.3. Nükleotid ve Amino Asit Sekanslarının Karakterizasyonu

Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 2022.1.1 yazılımı (<https://www.geneious.com>) ile forward ve reverse dizilimler DeNovo Assamble kullanılarak contig analizi yapılmış ve ilgili gen için final konsensus dizilimler ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut diğer sivrisinek ve yakın taksonlara ait SCP-2 sekanslarıyla Geneious yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid ve aminoasit farklılıkları ortaya çıkarılmıştır.

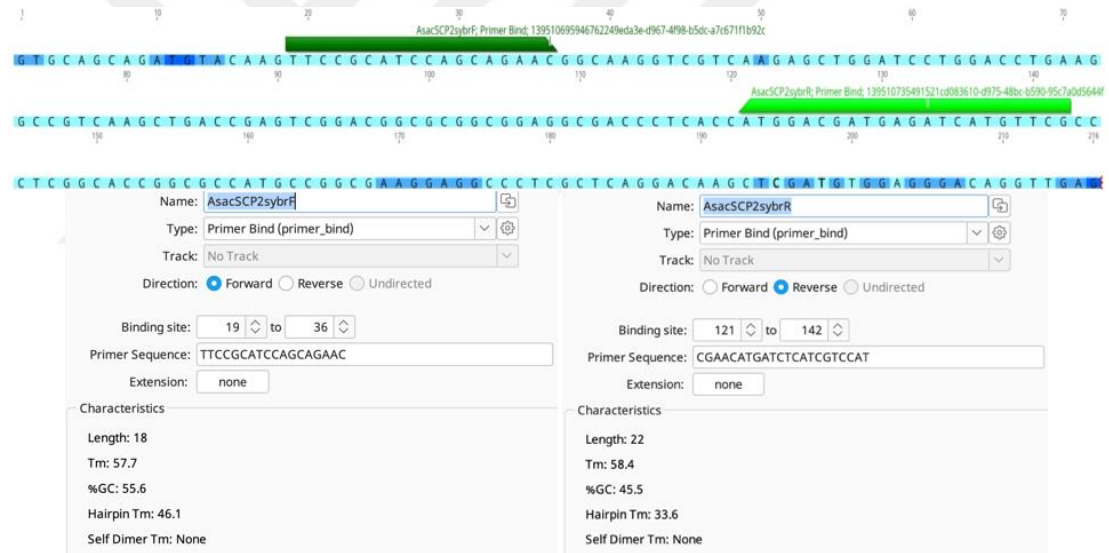
SCP-2 gen bölgesine göre elde edilen nükleotid sekansları ile diğer sivrisinek türleri ve yakın taksonlara ait sekanslar filogenetik analize tabii tutulmuştur. Filogenetik ağaç oluşturulmasında Maximum Likelihood (ML) analizi uygulanmıştır. Skans evrimi için en uygun değişim modeli jModelTest v.0.1.1'de belirlenmiştir. En düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) skoru gösteren GTR+I modeli filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizi Geneious yazılımı üzerinden PhyML (Guindon ve Gascuel, 2003) plugini kullanılarak yapılmıştır. ML analizleriyle oluşturulan ağacın güvenilirliği 1000 tekrarlı Bootstrap testi ile gerçekleştirilmiştir.

İzolatlara ait amino asit dizilimleri; protein yapısı yönünden analiz edilmiştir. SCP-2 proteinin transmembran bölgelerindeki amino asit dizilimlerinin sinyal peptid analizleri ve dizilimlerdeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 plugin yazılımı kullanılarak yapılmıştır. *Anopheles sacharovi* SCP-2 proteininin transmembran sarmallarının yapısı aynı yazılım üzerinden Transmembrane Prediction Tool 0.9 ile araştırılmıştır. İzoelektrik nokta ve proteinin tahmini moleküler ağırlığı ExPASy programı ile hesaplanmıştır.

3.3.4. SCP-2 Geninin Ekspresyon Analizleri

Sterol Taşıyıcı Protein 2 geninin *An. sacharovi*'nin farklı gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyon analizleri Kantitatif Reverse Transkripsiyon-Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile gerçekleştirilmiştir.

SCP-2 geninin, *An. sacharovi* laboratuvar hatlarından elde edilen larva (1,2,3,4 instar larvalar), pupa ve ergin dönemleriyle ergin dişilerin tükürük bezi, orta bağırsak ve abdomen karkasları gibi dokularında transkripsiyonel düzeylerinin belirlenmesi için analizler gerçekleştirilmiştir. SCP-2 proteinini kodlayan hedef gen bölgesinin bütün olarak amplifikasyonu amacıyla sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak karakterize edilen gen bölgesi sekanslarından sybergreen tabanlı qPCR için genetik yazılımlarla optimum spesifik primer dizaynı yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. SCP-2 geni için sybergreen tabanlı qPCR primer dizaynı

Dizayn edilen SCP-2 gen bölgesi için AsacSCP2sybrF ve AsacSCP2sybrR primerleri qPCR analizleri için standardize edilmiştir. Real Time PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Sisteminde (BioRad) sybergreen tabanlı olarak gerçekleştirilip her örnek üç tekrar çalışılmıştır. Floresans okumaları her siklstan sonra 62°C'de alınarak, PCR ürünlerinin identikliğinin konfirmasyonu için melting curve analizleri gerçekleştirilmiştir. mRNA düzeyleri, Aktin (AdrtACTF2- 5'-TCTGACCGACTACC TGAT-3' ve AdrtACTR2 5'-CATCTCCTGCTCGAAGTC-

3') ve Ribozomal S17 (S17F-5'-GGGTCGTGTACGTACCAAGACG-3' ve S17R2 5'-CATAGTTATCGC GACGCTCACG-3') referans genleri eş zamanlı kullanılarak komperatif $\Delta\Delta C_t$ metodu ile normalize edilmiştir. (Liew ve ark., 2017; Nirmala ve ark., 2005). Normalize edilmiş mRNA düzeyleri, jenerasyon bazında farklı gelişim evreleri ile ergin dişilerden izole edilen dokular arasında Student's t-test ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. *Anopheles sacharovi* Saha Örnekleri ve Morfolojik İdentifikasyon

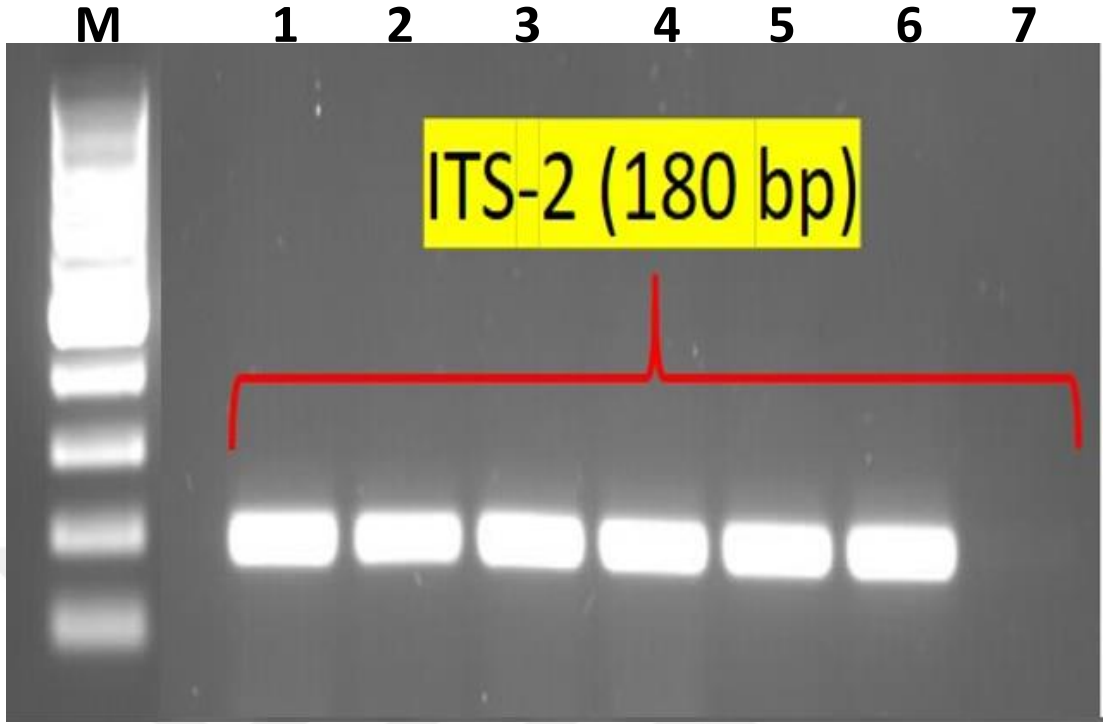
İlgili tarihler arasında yürütülen saha çalışmaları kapsamında toplam 283 adet dişi *Anopheles* sivrisineği odaklarından toplanmış ve laboratuvara getirilmiştir. Bunlar arasında kan beslemesi yapmış ve gravid olduğu belirlenen toplam 50 sivrisinek yumurtlatma prosesine alınmıştır. Yumurtlayan *Anopheles* dişi nesiller stereo-mikroskop altında incelenmiş ve *An. maculipennis* grubunun diğer türlerinden (*An. maculipennis* s.s., *An. melanoon*, *An. messeae*) kanat lekelerinin daha az belirgin olması, scutumun soluk kahverenginde olması, sucutumda soluk doğrusal bir şeritin bulunmaması ve kanat ucu saçaklarının tek düze siyah olması gibi morfolojik karakterleri ile *An. sacharovi* olarak teşhis edilmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca her bir dişi için elde edilen yumurtalar morfolojik olarak incelenmiş ve yumurtaların desenlenme biçimleri ve yumurta yüzgeçlerinin bulunma yerleri ve biçimleri ile *An. sacharovi* teşhisi doğrulanmıştır. *Anopheles sacharovi*'nin yumurta deseni özellikleri diğer *An. maculipennis* grubu türlerinkinden farklıdır ve belirgin bant profilleri veya desenleri yoktur (Şekil 4.1). Yumurtaların bu özellikleri, elde edilen tüm yumurtaların *An. sacharovi* dişilerine ait olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1. *Anopheles sacharovi* ergin dişi ve yumurtaları (Orijinal)

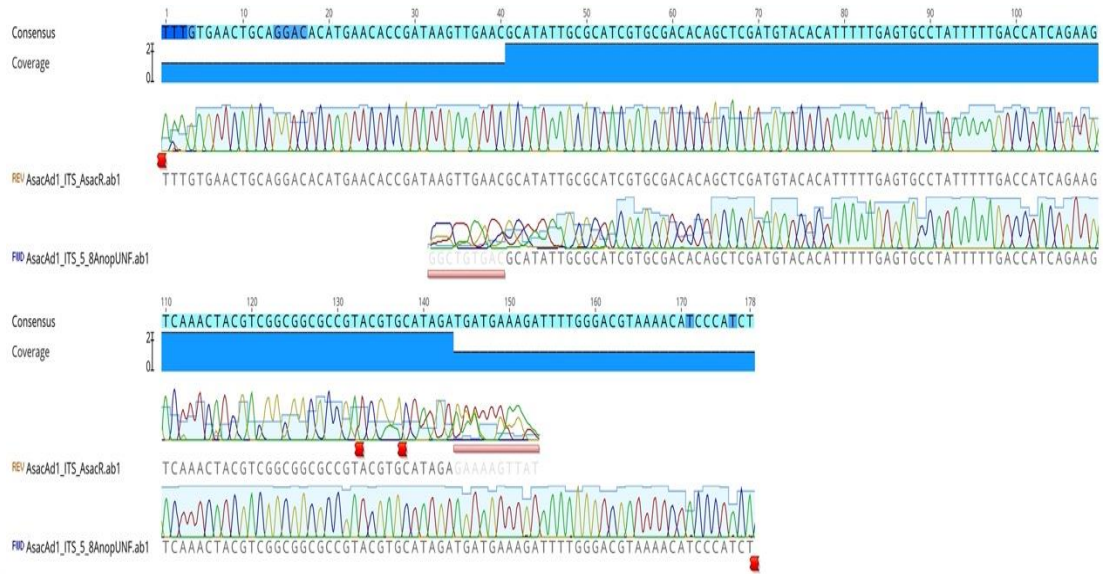
4.2 *Anopheles sacharovi* Nesillerinde ITS-2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu, Sekans ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Morfolojik identifikasyonla *An. sacharovi*'nin olarak teşhis edilen ve yumurtaları insektaryumda gelişmeye alınan toplam 50 adet dişi örneğin ayrılan bacaklarından elde edilen genomik DNA izolatlarının *An. sacharovi* spesifik ITS-2 PCR analizleri sonucu agaroz jel üzerinde hedef büyüklükte (180 bp) ampliconlar belirlenmiştir (Şekil 4.2).

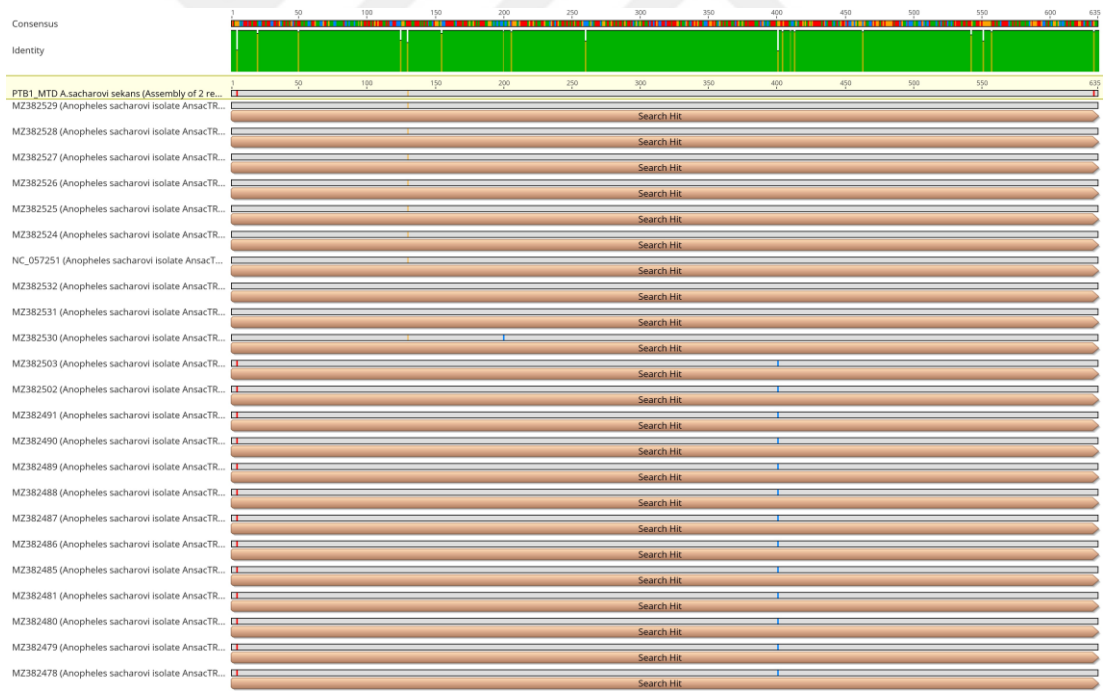


Şekil 4.2. *Anonpheles sacharovi* örneklerinin ITS-2 gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp); 1-6: Ergin dişi *An. sacharovi* izolatları; 7: No DNA

Sekans analizi için tüm izolatlara ait ampikonların PCR primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanması sonucu izolatlara ait forward ve reverse kromotogramlar Geneious 2020.1.1 yazılımında De Novo Assamble ile işlenerek kalite skoru yüksek konsensus dizilimler elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Elde edilen tüm nükleotid sekansların birbirine %100 identik olduğu görülmüştür. Yapılan blast analizi sonucunda izolatlara ait ITS-2 nükleotid sekansının GenBank veri tabanında kayıtlı diğer *An. sacharovi* sekanslarıyla yüksek düzeyde benzer olduğu belirlenmiş (Şekil 4.4) ve böylece çalışmaya dahil edilen toplam 50 dişi *An. sacharovi* neslinin tür konfirmasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3. *An. sacharovi* nesillerine ait ITS-2 gen bölgesi forward ve reverse nükleotid sekanslarının DeNovo analizi ve konsensüs sekansı

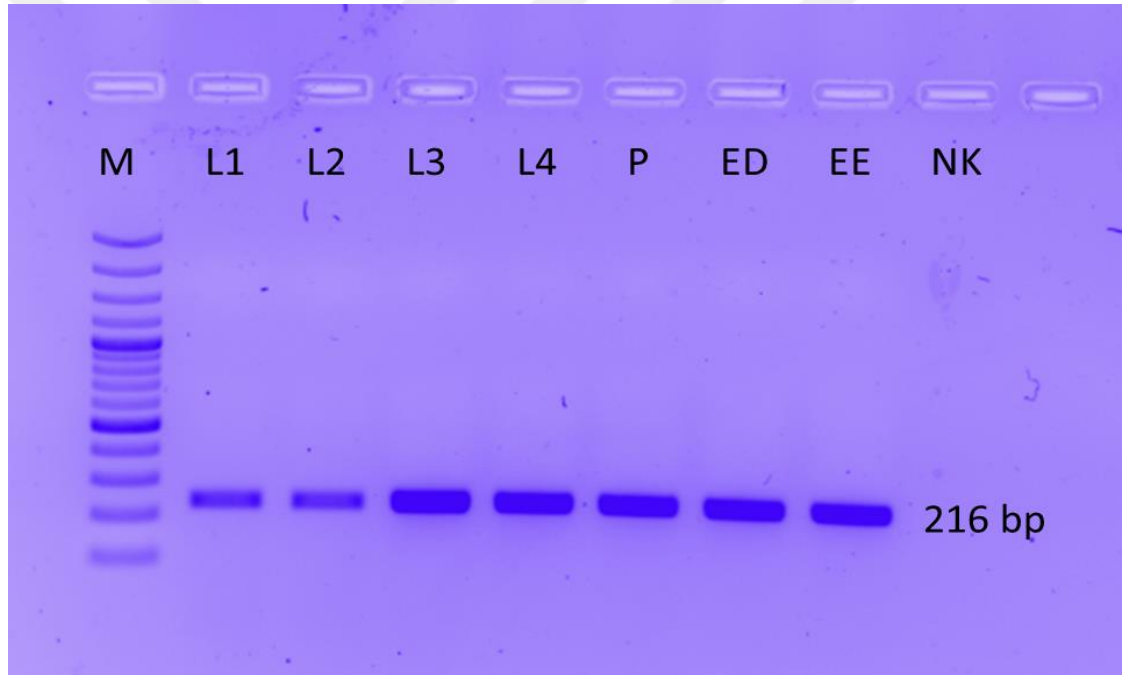


Şekil 4.4. *An. sacharovi* nesillerine ait ITS-2 gen bölgesi nükleotid sekansının blast analizi

4.3. *Anopheles sacharovi* Nesillerinde SCP-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu

4.3.1. SCP-2 geninin Amplifikasyon Sonuçları

Çalışma kapsamında morfolojik ve moleküler identifikasyonları sağlanan sahadan izole edilmiş ve yumurtaları yetiştirmeye alınmış toplam 7 ergin dişi ile insektaryumda gelişim dönemleri için oluşturulmuş replikasyonlardan seçilen toplam 7 izolata (L1-L4, Pupa, Ergin dişi, Ergin erkek) ait cDNA'ların SCP-2 gen bölgesi yönünden PCR sonuçları Şekil 4.5'de verilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda agaroz jel üzerinde tüm izolatlar için hedef büyüklükte (216 bp) ampliconlar belirlenmiştir.

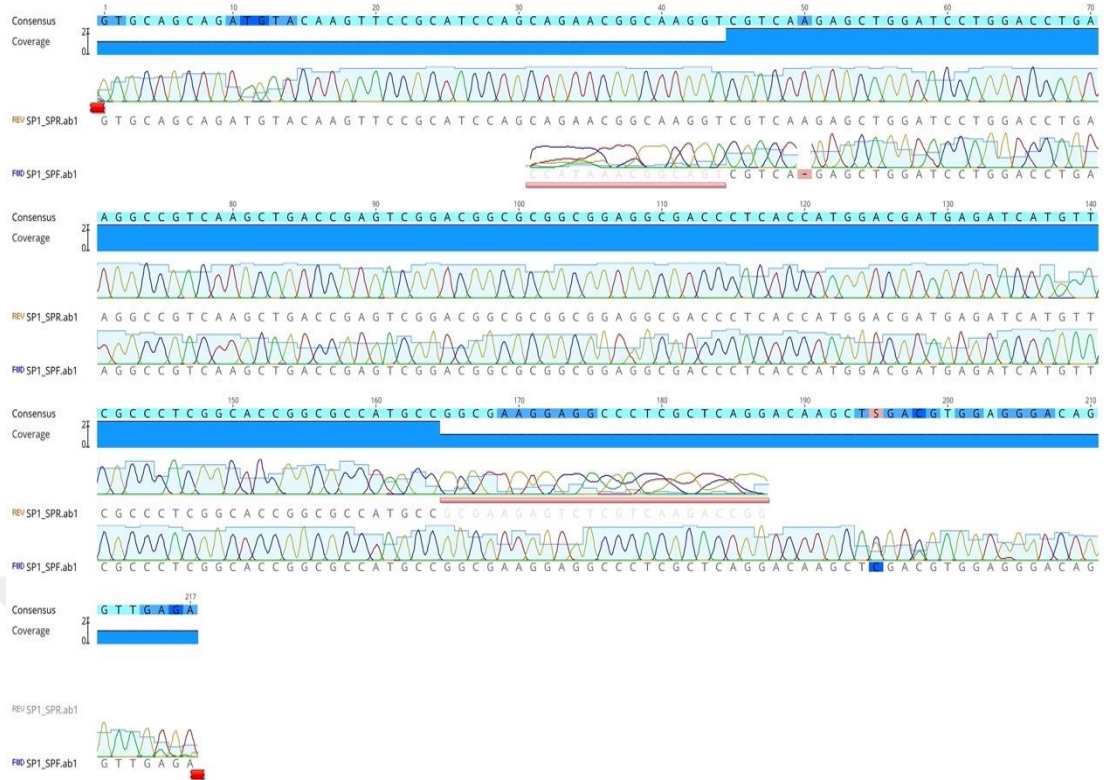


Şekil 4.5. *Anopheles sacharovi* nesillerine ait izolatların SCP-2 gen bölgesi yönünden PCR sonuçları

4.3.2. *Anopheles sacharovi* nesillerinde SCP2 Geninin Nükleotid ve Amino Asit Sekans Karakterizasyonu Sonuçları

4.3.2.1 Nükleik Asit Sekans Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi

SCP-2 genini içeren rekombinant plazmidlerin sekanslanması sonucu kalite skoru yüksek sekans kromotogramları elde edilmiş ve her iki yönde okumalara ait kromotogramların DeNovo uygulaması üzerinden birleştirilmesi ile 216 bp uzunluğunda final konsensus sekanslar elde edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *Anopheles. sacharovi* SCP-2 geni forward ve reverse dizilimlerin DeNovo analizi

Karakterizasyonu yapılan 14 izolata ait nükleotid sekanslarının hizalama analizlerinde (Şekil 4.7) 12'sinin %100 identik olduğu, aynı nükleotid dizilimine sahip kalan 2 izolata ise 183. bazda "T" yerine "C" değişimi gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerle karakterize edilen *An. sacharovi* SCP-2 sekansları sırasıyla TR_Ansac1_SCP2 (GenBank aksesyon: OL957181) ve TR_Ansac2_SCP2 (GenBank aksesyon: OL957182) izolat adlarıyla GenBank veri tabanına kayıt edilmiştir. TR_Ansac1_SCP2 ve TR_Ansac2_SCP2 sekansları arasında %0,5 genetik farklılık saptanmıştır.



37

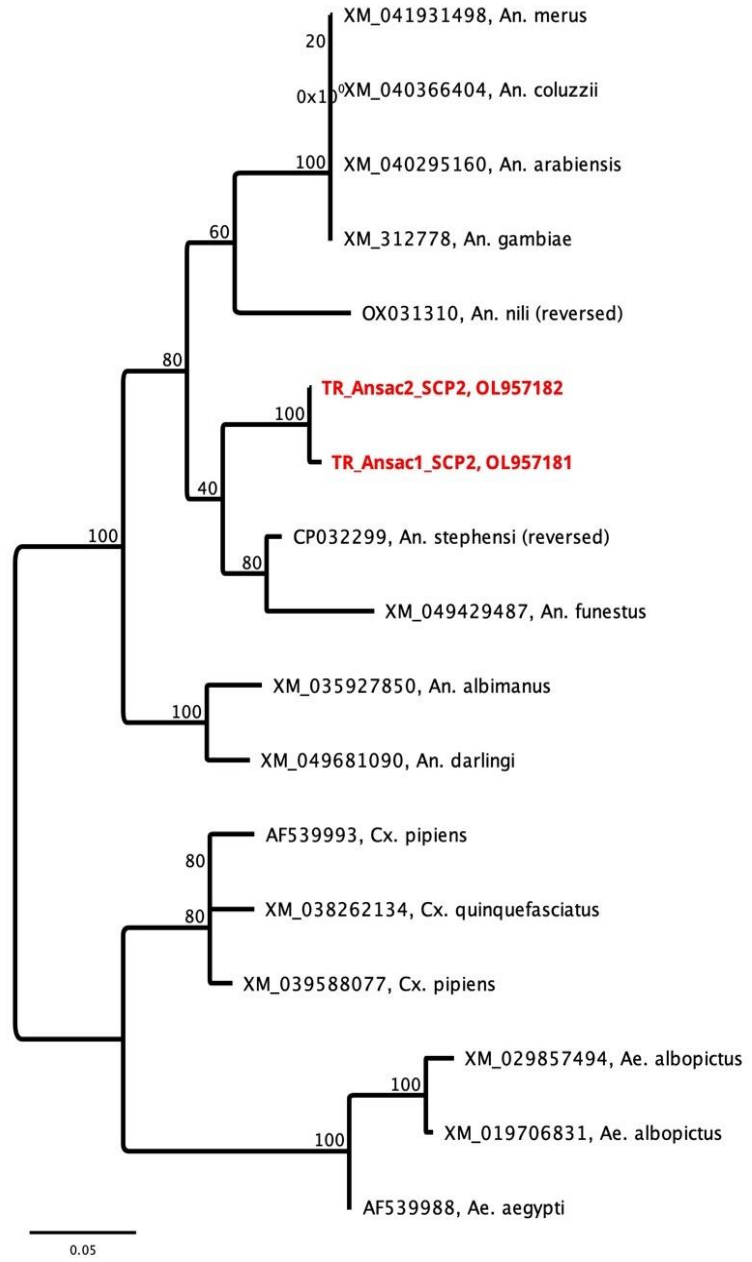
Tablo 4.1. *Anopheles* türleri arasında SCP-2 gen bölgesine göre belirlenen interspesifik genetik farklılıklar.

Tür	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>An._stephensi</i>										
	5,57									
	7,10	11,34								
	6,55	10,70	0,47							
	10,00	12,00	11,19	10,57						
	8,80	12,55	12,42	11,79	10,06					
	8,80	12,55	12,42	11,79	10,06	0,00				
	8,80	12,55	12,42	11,79	10,06	0,00	0,00			
	8,80	12,55	12,42	11,79	10,06	0,00	0,00	0,00		
	14,49	20,05	13,23	12,55	15,19	15,09	15,09	15,09	15,09	
	13,13	18,40	13,72	13,06	13,72	13,72	13,72	13,72	13,72	3,90

Sivrisinek soyları arasında SCP-2 gen bölgesine göre belirlenen genetik farklılıklar Tablo 4.2’de gösterilmiş olup *Aedes* ve *Culex* SCP-2 gen sekanslarının birbirine daha benzer olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. *Anopheles*, *Culex* ve *Aedes* soyları arasında SCP-2 gen bölgesine göre belirlenen genetik farklılıklar

	<i>Aedes</i>	<i>Culex</i>
<i>Culex</i>	18,69	
<i>Anopheles</i>	28,58	22,76

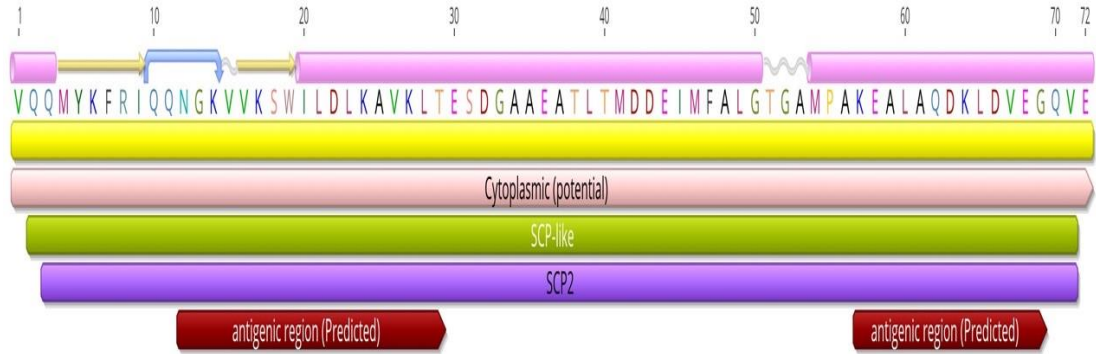


Şekil 4.8. Çalışmada karakterize edilen *An. sacharovi* izolatları (Kırmızı kalın karakter) ile *Anopheles*, *Culex* ve *Aedes* soylarındaki diğer bazı türlerin SCP-2 gen sekanslarına göre filogenetik ilişkisi. Nodeların önündeki rakamlar 1000 bootstrap desteğini göstermektedir. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini ifade etmektedir.

4.3.3. Amino Asit Sekans Karakterizasyonu

4.3.3.1. SCP-2 Geninin Kodladığı Proteinin In-Silico Analiz Sonuçları

Anopheles sacharovi SCP-2 genin in-silico analizleri sonucu ekprese ettiği proteinin özellikleri Şekil 4.9’da verilmiştir. SCP-2 gen sekansları içerisinde belirlenen tek nükleotid değişiminin amino asit diziliminde farklılığa yol açmadığı görülmüştür. *Anopheles sacharovi* SCP-2 genin 216 bp gen diziliminin kodladığı 72 aa zincirinin ifade ettiği proteinin 7,915 kDa büyüklüğünde olduğu, transmembran bölge içermeyip tamamen sitoplazmik karakterde olduğu belirlenmiştir. SCP-2 geninin aminoasit zinciri içerisinde 13 ve 18 aa uzunluğunda ve antijenik skorları da sırasıyla 1.089 ve 1.143 olan 2 antijenik bölge bulunduğu görülmüştür. İlgili proteinin izoelektronik noktasının 4.26 olduğu ve pH 7’de aktivasyon değerinin de -4,08 olduğu tespit edilmiştir.

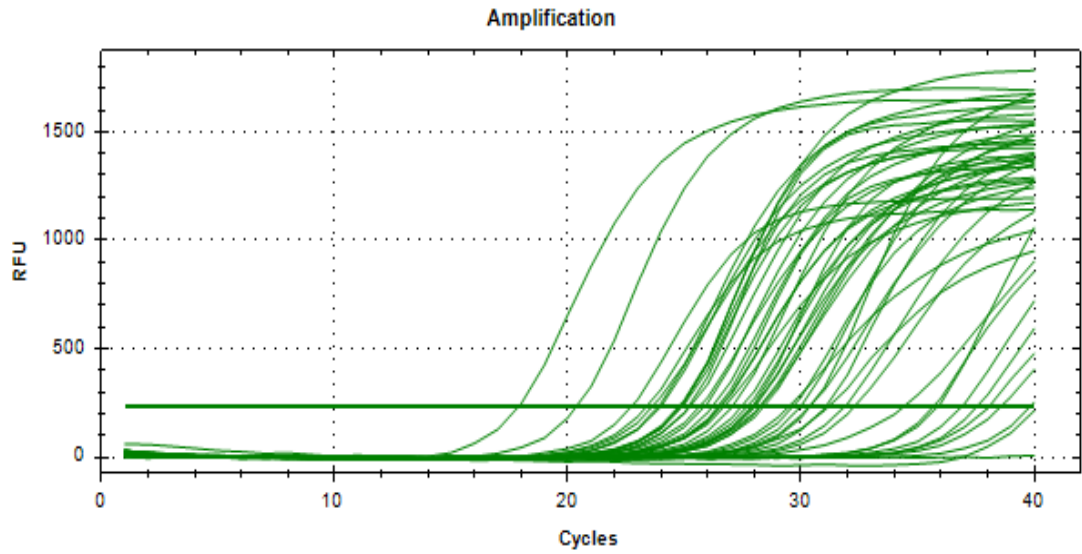


Şekil 4.9. *Anopheles sacharovi* SCP-2 amino asit sekansı ve özellikleri

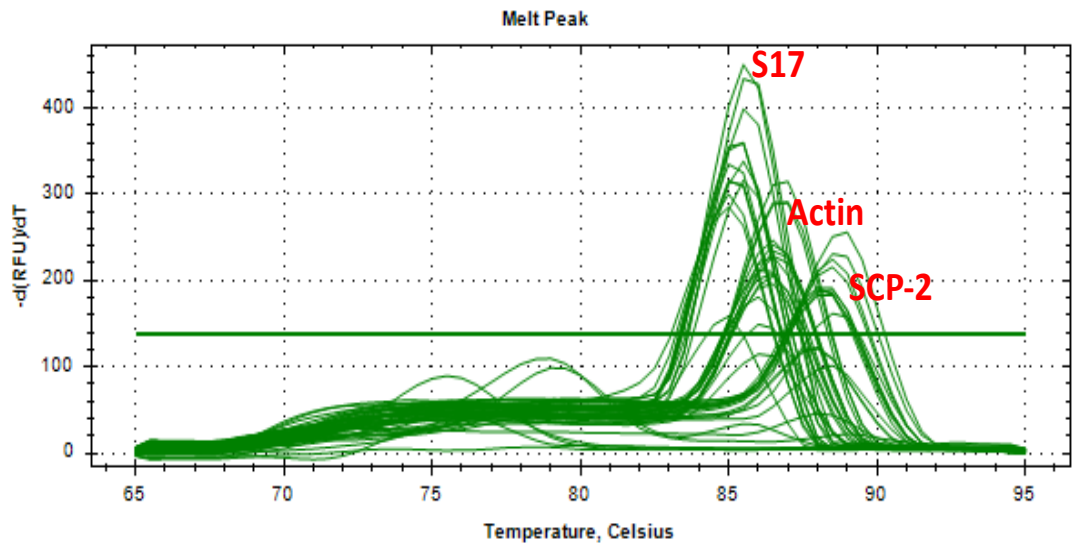
4.4. *Anopheles sacharovi*' de SCP-2 Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları

4.4.1 SCP-2 geninin qPCR amplifikasyon sonuçları

Anopheles sacharovi SCP-2 geninin ekspresyon analizleri için dizayn edilen qPCR primerli ile normalizasyon genleri Aktin ve ribozomal S17 için primerlerin hem gelişim dönemleri hem de dokulardan izole edilen total RNA izolatlarında etkin olarak çalıştığı (Şekil 4.10) ve spesifik melt pik gösterdikleri (Şekil 4.11) görülmüştür.



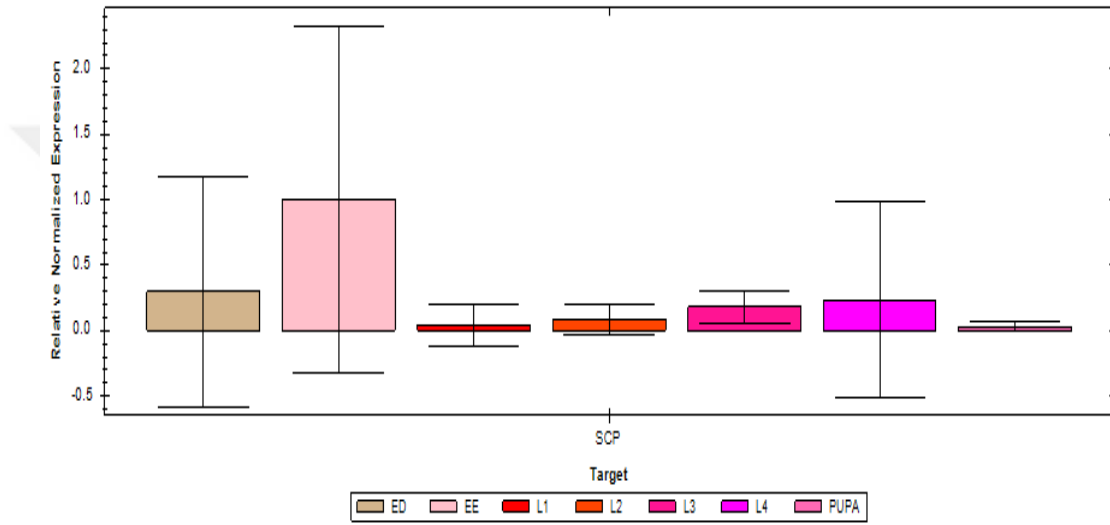
Şekil 4.10. SCP-2 geninin qPCR ekspresyon analizinde belirlenen amplifikasyon grafikleri



Şekil 4.11. SCP-2 ve normalizasyon genlerinin qPCR ekspresyon analizinde belirlenen melt pik grafikleri

4.4.2 Gelişim dönemlerinde SCP-2 geninin Ekspresyon Analizi

SCP-2 geninin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ekspresyon düzeyleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir. qPCR’da ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2’nin en yüksek ergin erkeklerde ifade olduğu bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Tüm gelişim dönemleri arasındaki SCP-2 ekspresyon kat değişimi Tablo 4.3’de verilmiş olup ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.



Şekil 4.12. SCP-2’nin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (ED: Ergin dişi; EE: Ergin erkek)

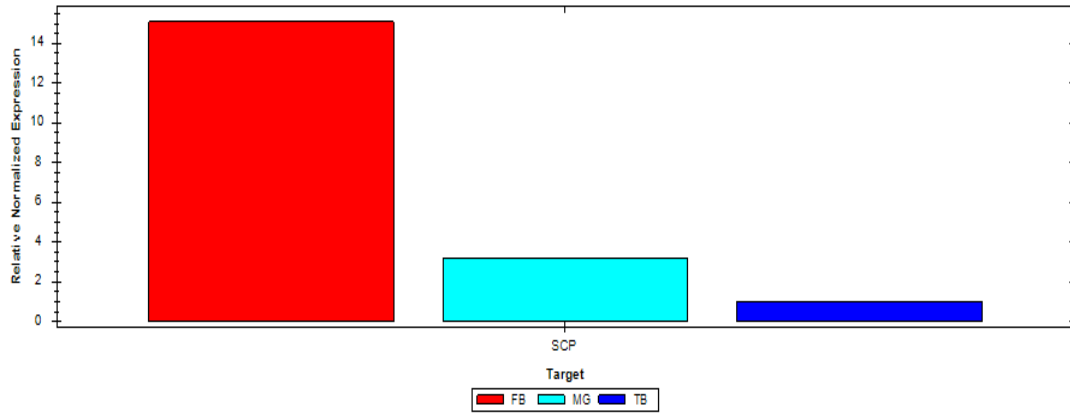
Tablo 4.3. *Anopheles sacharovi* gelişim dönemleri arasında SCP-2 geninin ekspresyon düzeylerinin kat değişimleri

	Pupa	L1	L2	L3	L4	ED	EE
Pupa	1,00	-1,37	-2,60	-5,46	-6,99	-8,99	-30,22
L1	1,37	1,00	-1,90	-3,99	-5,11	-6,57	-22,10
L2	2,60	1,90	1,00	-2,10	-2,69	-3,45	-11,61
L3	5,46	3,99	2,10	1,00	-1,28	-1,65	-5,53
L4	6,99	5,11	2,69	1,28	1,00	-1,29	-4,32
ED	8,99	6,57	3,45	1,65	1,29	1,00	-3,36
EE	30,22	22,10	11,61	5,53	4,32	3,36	1,00

(L: Larva, ED: Ergin dişi; EE: Ergin erkek)

4.4.3. Ergin Dişi Dokularında SCP-2 Geninin Ekspresyon Analizi

SCP-2 geninin *An. sacharovi* ergin dişi tükrük bezi, orta bağırsak (midgut) ve yağ (fat body) dokularındaki ekspresyon düzeyleri Şekil 4.13’de gösterilmiştir. qPCR’da ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2’nin en yüksek fatbody’de ifade olduğu bunu sırasıyla midgut ve tükrük bezinin izlediği belirlenmiştir. Ergin dişi dokuları arasındaki SCP-2 ekspresyon kat değişimi Tablo 4.4’de verilmiş olup ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.



Şekil 4.13. SCP-2’nin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (FB: Fat body; MG: Midgut; TB: Tükrük bezi)

Tablo 4.4. *Anopheles sacharovi* gelişim dönemleri arasında SCP-2 geninin ekspresyon düzeylerinin kat değişimleri

	TB	MG	FB
TB	1,00	-3,17	-15,09
MG	3,17	1,00	-4,77
FB	15,09	4,77	1,00

(FB: Fat body; MG: Midgut; TB: Tükrük bezi)

5. TARTIŞMA

Sterol Taşıyıcı Protein-2, her birinin sterol-bağlayıcı alan taşıdığı SCP-2, SCP-x, SCP-like-2, SCP-like-3, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase tip IV, ve stomatin'i içeren SCP-2 gen ailesinin bir üyesidir (Dyer ve ark., 2009; Dyer ve ark., 2008; Gallegos ve ark., 2001). SCP-2 geninin insan kromozom bandı 1p32.3'de yerleştiği ve 18 exon ve 123 amino asitten oluştuğu belirlenmiştir (Xu ve ark., 2022). SCP-x ve SCP-2'yi bir genin kodladığı ve SCP-x'in diğer bir transkripsiyon bölgesinden geldiği bilinmektedir. Her bir mRNA ortak bir C- terminus yapısı gösteren bir prekürsor 15 kDa pro-SCP-2 proteini ve tüm-uzunlukta 58 kDa SCP-x proteinine transkribe olur. 58-kDa SCP-x kısmi post-translasyonel modifikasyon geçirir ve takiben tam fonksiyonel 13 kDa SCP-2 ve 46-kDa proteine ayrılır (Gallegos ve ark., 2001). Açıkça, 15-kDa pro-SCP-2'nin aktivitesi yoktur ve tamamen post-translasyonel olarak işlenmesiyle bir 2-kDa peptid ve bir matür 13-kDa SCP-2 oluşur (Gallegos ve ark., 2001). Günümüze kadar omurgalı SCP-2 genlerinin birçok özelliği ortaya çıkarılmış olup, SCP-2'nin insanlar, kurbağalar, zebra balıkları, köpekler, tavuk ve fareler arasında evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuş olduğu belirtilmektedir (Xu ve ark., 2022). Omurgalılarda SCP-2'nin sterol metabolizması ve steroid biyosentezinin önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir (Gallegos ve ark., 2001; Pfeifer ve ark., 1993). Ayrıca omurgalılarda SCP-2'nin kolesterol, doymuş asitler ve doymuş acyl CoA'a bağlandığı da tespit edilmiştir (Gallegos ve ark., 2001; Stolowich ve ark., 2002). Ayrıca SCP-2'nin mitokondride kolesterolün steroidlere döndürülmesini mitokondri içine girişi artırarak hızlandırdığı belirlenmiştir (van Noort ve ark., 1988; Xu ve ark., 1991). Buna ilaveten SCP-2'nin mikrozom ve plazma membranı arasında sterol döngüsünü artırdığı (Baum ve ark., 1997), ve kolesterol veya steroid biyosentezine dahil olan dokularda yüksek düzeyde SCP-2

ekspresyonu olduğu ortaya çıkarılmıştır (Baum ve ark., 1997; Gallegos ve ark., 2001).

İnsektler kolesterol biyosentez yolağında önemli olan enzimlerden yoksundur ve bu sebeple kolesterolün hücre ve dokularda sentezi için uygun canlılar değildir (Beydon ve ark., 1987; Grieneisen, 1994). Bu faktör, insektlerin vücut yapıları ve büyüme hormonları gibi önemli biyobileşenler için zorunlu olan kolesterolün dış kaynaklardan sağlanmasını zorunlu kılmaktadır (Barton ve ark., 1970; Bellés ve ark., 2005). Günümüze kadar *Anopheles*, *Aedes* ve *Culex* soylarındaki çeşitli sivrisinek türleri üzerinde SCP-2 genin metabolik yolları ve çeşitli SCP-2 inhibitörü maddelerin sivrisinek gelişim parametreleri üzerine etkisi temelinde sivrisinek kontrolü için yenilikçi yaklaşımlarla araştırmaların yapıldığı görülmektedir (Perera ve Wijerathna, 2019). Ancak SCP-2 geninin farklı sivrisinek türlerinde moleküler yapısı ve gelişim dönemleri ile çeşitli vücut dokularındaki ifade düzeyleri üzerine araştırma açığı bulunduğu dikkati çekmiştir. Günümüze kadar gen veri tabanı incelendiğinde SCP-2 geninin çeşitli *Anopheles* türleri ile *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* ve *Ae. albopictus* türlerinin genom ve/veya transkriptom çalışmalarında anotasyonlandığı görülmektedir (*An. gambiae*: XM_312778; *An. stephensi*: CP032233, CP032232, XM_036041178; *An. maculipalpis*: OX030895; *An. coustani*: OX030901; *An. funestus*: XM_049429487; *An. nili*: OX031310; *An. coluzzii*: XM_040366404; *An. marshallii*: OX030903; *An. merus*: XM_041931498; *An. arabiensis*: XM_040295160; *An. albimanus*: XM_035927850; *An. darlinge*: XM_049681090, OX030911; *An. aquasalis*: OX030882; *An. bellator*: OX030927; *An. cruzii*: OX030880; *Cx. pipiens*: XM_039588077; *Cx. quinquefasciatus*: XM_038262134; *Ae. aegypti*: XM_021857277; *Ae. albopictus*: XM_019706831, XM_029857494, XM_019706059). Diğer yandan GenBank veri tabanında direkt SCP-2 geni üzerine odaklanan *Cx. quinquefasciatus* (AF539991-3, AY196002), *Ae. aegypti* (AF539987-9, FJ554568, AF539995, AF510492, AY190283, XM_021857277) ve *An. quadrimaculatus* (AF539996) türleri için gen sekansları bulunmakta olup bunlardan yalnızca *Ae. aegypti* üzerine bir çalışmanın yayınlandığı görülmektedir (Krebs ve Lan, 2003). Mevcut bu veriler dikkate alındığında çeşitli sivrisinek türlerinde SCP-2 geninin açık okuma çerçevesinin yaklaşık 335 bp uzunlukta olduğu ve 110 aa uzunluğunda bir proteini kodladığı görülmektedir.

Çalışmamızda *Maculipennis* grubun en önemli üyelerinden biri olan ve *P. vivax* için en etkin vektörlerden birisi olan *An. sacharovi* için SCP-2 geni ilk kez karakterize edilmiştir. Yukarıda bahsi geçen mevcut sivrisinek SCP-2 gen sekansları üzerinde yürüttüğümüz primer dizaynı çalışmalarında SCP-2 gen bölgesi ORF sekansını bütün olarak çoğaltan veya kapsayan bir fragmentin cDNA kalıbı içerisinde çoğaltılması mümkün olmamıştır. Ancak ilgili dizilimler içerisinde gerçekleştirilen analizlerde diğer *Anopheles* türleri ve diğer soylardan türlere ait gen sekansları arasında gerçekleştirilen analizlerle korunmuş bölgeler tespit edilmiş ve bu yönüyle de SCP-2 geninin değişken bölgeleri de içeren 216 bp fragmenti etkin olarak çoğaltılmıştır. SCP-2 gen bölgesi ORF sekansı çeşitli sivrisinek türlerinde 110 aa uzunluğunda ve 12.3 kDa büyüklüğünde bir proteini ifade etmekte olup çalışmamızda çoğaltığımız gen fragmenti bunun içerisinde 76 aa uzunluğunda ve yaklaşık 8 kDa büyüklüğünde bir proteini ifade ettiği in silico analizlerle gösterilmiştir. Sivrisineklerde SCP-2 ORF amino asit sekanslarının antijenite analizlerinde 5 antijenik bölge içerdiği, karakterize ettiğimiz *An. sacharovi* parsiyel amino asit sekansında diğer türlerin sekans bölgeleriyle de örtüşen 2 antijenik bölgenin bulunduğu görülmüştür. Ayrıca *An. sacharovi* SCP-2 amino asit sekansının ifade ettiği proteinin diğer sivrisinek türlerinde olduğu gibi transmembran bölge içermediği ve stoplazmik karakterde olduğu dikkati çekmiştir. Krebs ve Lan, (2003), karakterize ettikleri *Ae. aegypti* SCP-2 amino asit sekansının filogenetik analizinde, SCP-2'nin rat SCP-2'sine %30, memeli SCP-2'sinin sterol-transfer domainine %46 identiklik gösterdiğini, ayrıca insan genomunda SCP-2-like geni (XM_115847.1) ile %50, *An. gambiae* (EAA08376) ile %79 ve üç *Drosophila* geni CG11151 (AE003493) ile de %25-38 identiklik gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar (Krebs ve Lan, 2003), SCP-2 gen sekansının *Ae. aegypti* nesilleri içerisinde yüksek düzeyde korunmuş olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak çalışmamızda sahadan izole edilmiş olan ergin dişi nesiller ve bunlardan elde edilen jenerasyonlardan alınan örnekleri içeren toplam 14 izolata ait SCP-2 nükleotid sekanslarının yüksek düzeyde korunmuş olduğu, yalnızca 2 izolatta 183. bazda tek nükleotid değişimi olduğu ancak bu değişiminde amino asit sekansında farklılığa yol açmadığı ve tüm izolatların homolog amino asit dizilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada karakterize edilmiş olan *An. sacharovi* SCP-2 nükleotid sekansları ile GenBank veri tabanında

mevcut sınırlı sayıda diğer sivrisinek türlerine ait SCP-2 sekanslarının filogenetik analizinde SCP-2 sekanslarının tür ve soy bazlı olarak izolatları monofiletik kümelerle yerleştirdiği görülmüştür. Bu sonuç SCP-2 geninin sivrisinek türleri içerisinde korunmuş yapı sergilediğine dair destekleyici kanıt sağlamıştır. Bunun yanında SCP-2'nin *Anopheles* türleri arasında %10,45 oranında genetik farklılık gösterdiği, bu farklılığın *Culex* türleri ile yaklaşık %23,0 *Aedes* türleri ile ise yaklaşık %29'a yükseldiği dikkati çekmiştir. Ayrıca SCP-2 gen bölgesi filogenetik analiz sonuçları *An. sacharovi*'nin *Anopheles* türleri içerisinde *An. stephensi*'ye genetik olarak daha yakın olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada qPCR ile gerçekleştirilen ekspresyon analizlerinde SCP-2'nin *An. sacharovi*'nin tüm gelişim dönemleri ve ergin dişilerin tükrük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusunda farklı düzeylerde ifade olduğunu göstermiştir. Omurgalıların aksine insekt hücreleri kolesterolü, lipoproteinlerin reseptör aracılı endositozu yoluyla orta bağırsak ve yağ doku arasında transfer edemez (Yun ve ark., 2002). Hidrofobik yapısı sebebiyle kolesterol, hazır olarak hücre membranının dış yüzeyi içine doğru dağılır ve SCP-2 gibi proteinler ilgili molekülleri membrandan ayrıştırır ve depolanacakları bölgeye ve metabolik yollarına teslim eder (Stremmel ve ark., 2001). *Ae. aegypti* SCP-2 proteini üzerine yapılan bir araştırmada (Lan ve Massey, 2004), SCP-2'nin orta bağırsak epitelinde sitozol içinde lokalize olduğu ve overekspresyon sonucunda kolesterol seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir. Buna ilaveten, *Ae. aegypti* SCP-2 ekspresyonunun larval beslenme döneminde orta bağırsakta yüksek seviyede olduğu gösterilmiş ve SCP-2'nin kolesterolün dönüştürülmesi için orta bağırsakta pyhtosterollerin işlenmesine dahil olduğu belirtilmiştir (Radek ve ark., 2010). Nitekim araştırmamızda ergin dişi dokularında gerçekleştirdiğimiz ekspresyon analizlerinde *Ae. aegypti*'de araştırmacıların (Krebs ve Lan, 2003) elde ettikleri bulgulara paralel olarak orta bağırsakta SCP-2 ekspresyonu yüksek belirlenmiş ve tükrük bezine oranla yaklaşık üç kat daha yüksek düzeyde ifade olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan çalışmamızda ergin dişi dokularından en yüksek ifade düzeyi yağ dokusu (fat body)'de belirlenmiş, SCP-2'nin tükrük bezi ve orta bağırsaktaki ifade düzeyinden sırasıyla yaklaşık 15 ve 5 kat daha yüksek ifade olduğu görülmüştür. Bu sonuç ergin dişilerde SCP-2'nin fat body dokusunda

kolesterol metabolizmasının regülasyonunda önemli bir fonksiyona sahip olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Diğer yandan Krebs ve Lan (Krebs ve Lan, 2003), Northern ve dot blotting analizleri ile gerçekleştirdikleri ekspresyon analizlerinde 4. dönem *Ae. aegypti* larvalarında orta bağırsağa göre fat body de içeren vücut duvarında SCP-2'nin ifade düzeyini oldukça düşük belirlemişlerdir. Bu sonuç da göz önüne alındığında sivrisineklerin gelişim dönemleri boyunca kolesterol metabolizmasının regülasyonunda bağırsak epiteli dışındaki organ ve dokularda da SCP-2'nin önemli bir fonksiyona sahip olabileceği hipotez edilebilir. Çalışmamızda ayrıca *An. sacharovi*'nin tüm gelişim dönemlerinde SCP-2'nin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiş olup en yüksek ifade düzeyi ergin erkeklerde olduğu bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Krebs ve Lan (Krebs ve Lan, 2003), *Ae. aegypti* üzerinde gerçekleştirdikleri SCP-2 ekspresyon analizlerinde metodoloji ve yöntem farklı olmakla birlikte çalışmamızda elde edilen sonuca paralel olarak 4. dönem larvadan pupaya geçtikten sonra SCP-2 ifade düzeyinin oldukça düştüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar (Krebs ve Lan, 2003), pupadan çıkan ilk gün dişi ve erkeklerde SCP-2'nin eşit düzeyde eksprese olduğunu ancak 7. günde yalnızca dişilerde saptanabilir düzeyde transkripsiyon gözlemlediklerini belirtmişler, protein düzeyinin ise her iki cinsiyet için de saptanabilir olduğunu kaydetmişlerdir. Çalışmamızda SCP-2 ekspresyonu gen düzeyinde spesifik qPCR analizleri ile gerçekleştirilmiş olup insektaryumda yetiştirilen ve %10 şekerli su ile beslemeleri sağlanan ergin erkeklerde dişilere oranla yaklaşık 3,5 kat daha yüksek ifade düzeyi saptanmıştır. Bu sonuç ergin erkek bireylerin kolesterol metabolizmasında SCP-2 aracılı regülasyonun çok daha yüksek olabileceğine dair kanıtlar ortaya çıkarmış olmakla birlikte bu hipotezin ilgili transkripsiyon ve protein sentez yolları üzerine detaylı çalışmalarla aydınlatılması gerektiği düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışması ile vektör potansiyeli ve önemi yüksek olan *An. sacharovi* için kolesterolün hidrofilik ortama taşınmasında ve metabolize olmasında en önemli proteinlerden birisi olan ve bu yönüyle de özellikle yeni biyoteknolojik ilaç yaklaşımları için önemli bir hedef olarak nitelenen SCP-2'yi eksprese eden gen bölgesi ilk kez karakterize edilmiş ve ilgili sivrisineğin gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyonel farklılıklar ortaya konulmuştur. Çalışma ile SCP-2'nin farklı sivrisinek türlerinde genetik yapısı ve çeşitliliği üzerine mevcut bilgi birikimine katkı sağlanmış ve özellikle *Anopheles* soyu içerisinde korunmuş yapısı ile SCP-2'nin bu soy içerisindeki türlere karşı geliştirilecek yenilikçi mücadele yaklaşımlarında hedef bir protein olarak kullanılabileceğine dair destekleyici kanıtlar sağlanmıştır. Türkiye'de yayılım gösteren, vektörlük potansiyeli yüksek olan ve ayrıca popülasyon yoğunluğu ile pest problemi oluşturan diğer sivrisinek türlerinde SCP-2 üzerine genetik ve transkriptomik düzeyde ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abdel-Malek A. The Anopheline Mosquitoes of Northern Syria. Bull Soc Entomol Egypte, 1958; 519-535.
- Akiner MM, and Çağlar SS. Birecik, Beyşehir ve Çankırı bölgelerinde Anopheles maculipennis grup türlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanarak araştırılması. Türkiye Parazitoloj Derg, 2010; 50-54.
- Alten B, Çağlar S, and Özer N. Malaria and its vectors in Turkey. Eur mosq bull, 2000; 27-33.
- Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, and Rajasekharan KN. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. Biochem Pharmacol, 2008; 1590-1611.
- Andrade-Ochoa S, Correa-Basurto J, Rodríguez-Valdez L, Sánchez-Torres L, Noguera-Torres B, and Nevárez-Moorillón G. In vitro and in silico studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Chem Cent J, 2018; 1-21.
- Angel A, and Farkas J. Regulation of cholesterol storage in adipose tissue. J Lipid Res, 1974; 491-499.
- Anstrom DM, Zhou X, Kalk CN, Song B, and Lan Q. Mosquitocidal properties of natural product compounds isolated from Chinese herbs and synthetic analogs of curcumin. J Med Entomol, 2012; 350-355.
- Arrese EL, Canavoso LE, Jouni ZE, Pennington JE, Tsuchida K, and Wells MA. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. Insect Biochem Mol Biol, 2001; 7-17.
- B. Alberts AJ, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. Molecular Biology of the Cell, (1 st). Garland Science, New York, NY, USA 2002.
- Barton D, Feakins P, Poyser J, and Sammes P. A synthesis of the insect moulting hormone, ecdysone, and related compounds. J Chem Soc C, 1970; 1584-1591.
- Baum CL, Reschly EJ, Gayen AK, Groh ME, and Schadick K. Sterol carrier protein-2 overexpression enhances sterol cycling and inhibits cholesterol ester

- synthesis and high density lipoprotein cholesterol secretion. *J Biol Chem*, 1997; 6490-6498.
- Bellés X, Martín D, and Piulachs M-D. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol*, 2005; 181-199.
- Berberian D. The Species of Anopheline Mosquitoes found in Syria and Lebanon. Their Habits, Distribution and Eradication. *J Palest Arab Med Assoc*, 1946; 120-146.
- Beydon P, Girault JP, and Lafont R. Ecdysone metabolism in *Pieris brassicae* during the feeding last larval instar. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1987; 139-149.
- Biology WECOV, Control, and Organization WH. Vector resistance to pesticides: fifteenth report of the World Health Organization Expert Committee on Vector Biology and Control, Meeting held in Geneva from 5 to 12 March 1991. WHO, 1992.
- Blitzer E, Vyazunova I, and Lan Q. Functional analysis of AeSCP- 2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 2005; 301-307.
- Brown AW. The insecticide-resistance problem: a review of developments in 1956 and 1957. *Bull World Health Organ*, 1958; 309-321.
- Brown AW. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc*, 1986; 123-140.
- Bullangpoti V, Visetson S, Milne J, Milne M, Sudthongkong C, and Pronbanlualap S. Effects of alpha-mangostin from mangosteen pericarp extract and imidacloprid on *Nilaparvata lugens* (Stal.) and non-target organisms: toxicity and detoxification mechanism. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2007; 431-441.
- CDC (2022a). *Anopheles* species mosquitoes. Access: [https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/anopheles.html], 23.08.2022.
- Cerqueira NM, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, Ramos MJ, and Fernandes P. Cholesterol biosynthesis: a mechanistic overview. *Biochemistry*, 2016; 5483-5506.
- Chan S-M, Rankin SM, and Keeley LL. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biol Bull*, 1988; 185-192.
- Chino H, and Kitazawa K. Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects. *J Lipid Res*, 1981; 1042-1052.
- Christophers S. A Summary of Recent Observations upon the *Anopheles* of the Middle East. . *Indian J Med Res*, 1920.
- Cranston PGaPS. *Insects: An Outline of Entomology* (4th). Wiley-Blackwell, Chichester, England 2011.
- De Loof A, Briers T, and Huybrechts R. Presence and function of ecdysteroids in adult insects. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1984; 505-509.
- Dyer DH, Wessely V, Forest KT, and Lan Q. Three-dimensional structure/function analysis of SCP-2-like2 reveals differences among SCP-2 family members. *J Lipid Res*, 2008; 644-653.
- Dyer DH, Vyazunova I, Lorch JM, Forest KT, and Lan Q. Characterization of the yellow fever mosquito sterol carrier protein-2 like 3 gene and ligand-bound protein structure. *Mol Cell Biochem*, 2009; 67-77.

- Dyer DH, Lovell S, Thoden JB, Holden HM, Rayment I, and Lan Q. The structural determination of an insect sterol carrier protein-2 with a ligand-bound C16 fatty acid at 1.35-Å resolution. *J Biol Chem*, 2003; 39085-39091.
- Dzaki N, Ramli KN, Azlan A, Ishak IH, and Azzam G. Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. *Sci Rep*, 2017; 1-13.
- Ee G, Daud S, Taufiq-Yap Y, Ismail N, and Rahmani M. Xanthonenes from *Garcinia mangostana* (Guttiferae). *Nat Prod Res*, 2006; 1067-1073.
- Focks DA, Brenner RJ, Hayes J, and Daniels E. Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. *Am J Trop Med Hyg*, 2000; 11-18.
- Fu Q, Inankur B, Yin J, Striker R, and Lan Q. Sterol carrier protein 2, a critical host factor for dengue virus infection, alters the cholesterol distribution in mosquito Aag2 cells. *J Med Entomol*, 2015; 1124-1134.
- Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Chao H, and Kier AB. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res*, 2001; 498-563.
- Genta FA, Diaz-Albiter HM, Salgueiro P, and Gomes B. Control of Vector-Borne Human Parasitic Diseases. *Biomed Res Int*, 2016; 1014805.
- Ghassemi-Khademi T, Oshaghi MA, Vatandoost H, Madjdzadeh SM, and Gorouhi MA. Utility of complete mitochondrial genomes in phylogenetic classification of the species of anopheles (Culicidae: Anophelinae). *J Arthropod Borne Dis*, 2021; 1.
- Gilbert LI, Rybczynski R, and Warren JT. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol*, 2002; 883-916.
- Grieneisen ML. Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem Mol Biol*, 1994; 115-132.
- Guindon S, and Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, 2003; 696-704.
- Günay F. Türkiye sivrisinek faunası üzerine DNA barkodlama yöntemiyle moleküler analizler. 2015.
- Halling KK, Ramstedt B, Nyström JH, Slotte JP, and Nyholm TK. Cholesterol interactions with fluid-phase phospholipids: effect on the lateral organization of the bilayer. *Biophys J*, 2008; 3861-3871.
- Hamon J, Subra R, Sales S, and Coz J. Presence in the southwestern part of Upper Volta of a population of *Anopheles gambiae* "A" resistant to DDT. *Med Trop (Mars)*, 1968; 521-528.
- Hemingway J, and Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*, 2000; 371-391.
- Jaenson TG, Lokki J, and Saura A. *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and malaria in northern Europe, with special reference to Sweden. *J Med Entomol*, 1986; 68-75.
- Jing X, and Behmer ST. Insect sterol nutrition: physiological mechanisms, ecology, and applications. *Annu Rev Entomol*, 2020; 251-271.
- Kannenbergh F, Ellinghaus P, Assmann G, and Seedorf U. Aberrant oxidation of the cholesterol side chain in bile acid synthesis of sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x knockout mice. *J Biol Chem*, 1999; 35455-35460.

- Kasap H. Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, 1990; 111-117.
- Kasap H, Alptekin D, Kasap M, Güzel AI, and Lüleyp U. Artificial bloodfeeding of *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. *J Am Mosq Control Assoc*, 2003; 367-370.
- Kasap M, and Kasap H. Laboratory colonization of *Anopheles sacharovi*, the principal vector of human malaria in Turkey. *Mosq News*, 1983; 498-499.
- Keiser J, Singer BH, and Utzinger J. Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2005; 695-708.
- Kim M-s, Wessely V, and Lan Q. Identification of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors. *J Lipid Res*, 2005; 650-657.
- Klipsic D, Landrock D, Martin GG, McIntosh AL, Landrock KK, Mackie JT, Schroeder F, and Kier AB. Impact of SCP-2/SCP-x gene ablation and dietary cholesterol on hepatic lipid accumulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015; G387-G399.
- Korlu M. Sultan Sazlığı ekosisteminde *Anopheles* (Diptera: Culicidae) türlerinin DNA barkodlaması ve filogenetik karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2018.
- Köşlülüoğlu Ç. Türkiye’de yayılış gösteren *Anopheles* türlerinin (diptera: culicidae) morfolojik ve moleküler sistematiği, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 2017.
- Krause MR, and Regen SL. The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts. *Acc Chem Res*, 2014; 3512-3521.
- Krebs K, and Lan Q. Isolation and expression of a sterol carrier protein- 2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 2003; 51-60.
- Krisans SK. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1996; 142-164.
- Kronefeld M, Werner D, and Kampen H. PCR identification and distribution of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae) in Germany. *Parasitol Res*, 2014; 2079-2086.
- Kumar PS, Chezhian A, Raja PS, and Sathiyapriya JS. Computational selections of terpenes present in the plant *Calotropis gigantea* as mosquito larvicide’s by blocking the sterol carrying protein, AeSCP-2. *Bangladesh J Pharmacol*, 2012; 1-5.
- Kumar RB, Shanmugapriya B, Thiayagesan K, Kumar SR, and Xavier SM. A search for mosquito larvicidal compounds by blocking the sterol carrying protein, AeSCP-2, through computational screening and docking strategies. *Pharmacognosy Res*, 2010; 247-253.
- Lan Q, and Massey RJ. Subcellular localization of the mosquito sterol carrier protein-2 and sterol carrier protein-x. *J Lipid Res*, 2004; 1468-1474.
- Larson RT, Wessely V, Jiang Z, and Lan Q. Larvicidal activity of sterol carrier protein-2 inhibitor in four species of mosquitoes. *J Med Entomol*, 2014a; 439-444.

- Larson RT, Lorch JM, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, and Lan Q. The biological activity of α -mangostin, a larvicidal botanic mosquito sterol carrier protein-2 inhibitor. *J Med Entomol*, 2014b; 249-257.
- Li T, Lan Q, and Liu N. Larvicidal activity of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors to the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 2009; 1430-1435.
- Liew JWK, Fong MY, and Lau YL. Quantitative real-time PCR analysis of *Anopheles dirus* TEP1 and NOS during *Plasmodium berghei* infection, using three reference genes. *PeerJ*, 2017; e3577.
- Lorenz L, Maia M, and Moore SJ. The use of plants in vector control. *Biological and Environmental Control of Disease Vectors*. 1st. Boston, MA, USA: CABI, 2013; 42-66.
- Main BJ, Lee Y, Collier TC, Norris LC, Brisco K, Fofana A, Cornel AJ, and Lanzaro GC. Complex genome evolution in *Anopheles coluzzii* associated with increased insecticide usage in Mali. *Mol Ecol*, 2015; 5145-5157.
- Main BJ, Lee Y, Ferguson HM, Kreppel KS, Kihonda A, Govella NJ, Collier TC, Cornel AJ, Eskin E, Kang EY, Nieman CC, Weakley AM, and Lanzaro GC. The Genetic Basis of Host Preference and Resting Behavior in the Major African Malaria Vector, *Anopheles arabiensis*. *PLoS genetics*, 2016; e1006303.
- Marsden CD, Cornel A, Lee Y, Sanford MR, Norris LC, Goodell PB, Nieman CC, Han S, Rodrigues A, and Denis J. An analysis of two island groups as potential sites for trials of transgenic mosquitoes for malaria control. *Evol Appl*, 2013; 706-720.
- McKean ML. *Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids*, 1977.
- Moncecchi D, Murphy E, and Schroeder DP. Sterol carrier protein-2 expression in mouse L-cell fibroblasts alters cholesterol uptake. *Biochim Biophys Acta*, 1996; 110-116.
- MR4 (2014). "Methods in *Anopheles* research". . Access: [https://www.beiresources.org/portals/2/MR4/MR4_Publications/Methods%20in%20Anopheles%20Research%202014/2014MethodsInAnophelesResearchManualFullVersionv2tso.pdf], 23.08.2022.
- Murty U, Sriram K, and Jamil K. Effect of leaf extract of *Polyalthia longifolia* (Family: Annonaceae) on mosquito larvae and pupae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Say of different habitats. *Int. Pest Control*, 1997; 52-53.
- NCBI (2022). *Anopheles* - mosquitos, genus. Access: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Anopheles], 22.08.2022.
- Nirmala X, Marinotti O, and James AA. The accumulation of specific mRNAs following multiple blood meals in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*, 2005; 95-103.
- Organization WH. 2004. Global strategic framework for integrated vector management. World Health Organization.
- Öztürk E. Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Bulunan *Anopheles* Türlerinin Belirlenmesi Ve *Anopheles Maculipennis Kompleks* Türlerinin Moleküler Olarak Tanımlanması, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı 2016.

- Pathak N, Mittal P, Singh O, and Vidya Sagar V. P.(2000). Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston) *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L). Int Pest Cont, 53.
- Patra SK. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. Biochim Biophys Acta, 2008; 182-206.
- Perera H, and Wijerathna T. Sterol carrier protein inhibition-based control of mosquito vectors: Current knowledge and future perspectives. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2019;
- Perich MJ, Wells C, Bertsch W, and Tredway KE. Toxicity of extracts from three *Tagetes* against adults and larvae of yellowfever mosquito and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, 1994; 833-837.
- Pfeifer S, Sakuragi N, Ryan A, Johnson A, Deeley R, Billheimer J, Baker M, and Strauss J. Chicken sterol carrier protein m2/sterol carrier protein x: cDNA cloning reveals evolutionary conservation of structure and regulated expression. Arch Biochem Biophys, 1993; 287-293.
- Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. J Lipid Res, 2003; 655-667.
- Proft J, Maier WA, and Kampen H. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. Parasitol Res, 1999; 837-843.
- Radek JT, Dyer DH, and Lan Q. Effects of mutations in *Aedes aegypti* sterol carrier protein-2 on the biological function of the protein. Biochemistry, 2010; 7532-7541.
- Ramsdale C, and Snow K. Distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Eur. mosq. bull, 2000; 1-26.
- Ranson H, N'guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, and Corbel V. Pyrethroid resistance in African *anopheline* mosquitoes: what are the implications for malaria control? Trends Parasitol, 2011; 91-98.
- Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Rev Panam Salud Publ, 1998.
- Renshaw PF, Janoff AS, and Miller KW. On the nature of dilute aqueous cholesterol suspensions. J Lipid Res, 1983; 47-51.
- Romi R. *Anopheles labranchiae*, an important malaria vector in Italy, and other potential malaria vectors in Southern Europe. Eur mosq bull, 1999; 8-10.
- Romi R, Sabatinelli G, and Majori G. Could malaria reappear in Italy? Emerg Infect Dis, 2001; 915.
- Rowland M. 2003. Malaria Control During Mass Population Movements and Natural Disasters. Peter B. Bloland & Holly A. Williams. Roundtable on the Demography of Forced Migration Committee on Population, National Research Council. Washington DC: The National Academies Press, 2003. xvi+ 164 pp. Price£ 26.95 (paperback). ISBN 0-309-08615-9. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003; 261.
- Schaffner E, Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J., Rhaïem, A., Brunhes. The Mosquitoes of Europe. [CD-ROM] 2011.
- Schwenk E, and Werthessen NT. Studies on the biosynthesis of cholesterol. III. Purification of C14-cholesterol from perfusions of livers and other organs. Arch Biochem Biophys, 1952; 334-341.

- Sedaghat MM, Linton YM, Nicolescu G, Smith L, Koliopoulos G, Zounos AK, Oshaghi MA, Vatandoost H, and Harbach RE. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. *Syst Entomol*, 2003; 241-256.
- Sevgili E. Türkiye'de *Anopheles maculipennis* kompleksi'nin (Diptera: Culicidae) moleküler karakterizasyonu, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 2009;
- Sevgili E, and Simsek FM. Distribution pattern and molecular identification of *Anopheles maculipennis* complex in eight river basins of Anatolia, Turkey. *North-West J Zool*, 2012; 223-231.
- Sheng R, Chen Y, Yung Gee H, Stec E, Melowic HR, Blatner NR, Tun MP, Kim Y, Källberg M, and Fujiwara TK. Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nat Commun*, 2012; 1-9.
- Simons K, and Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science*, 2000; 1721-1726.
- Simons K, and Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000; 31-39.
- Simsek FM, Ulger C, Akiner MM, Tuncay SS, Kiremit F, and Bardakci F. Molecular identification and distribution of *Anopheles maculipennis* complex in the Mediterranean region of Turkey. *Biochem Syst Ecol*, 2011; 258-265.
- Singarapu KK, Radek JT, Tonelli M, Markley JL, and Lan Q. Differences in the structure and dynamics of the apo-and palmitate-ligated forms of *Aedes aegypti* sterol carrier protein 2 (AeSCP-2). *J Biol Chem*, 2010; 17046-17053.
- Stolowich N, Petrescu A, Huang H, Martin G, Scott A, and Schroeder F. Sterol carrier protein-2: structure reveals function. *Cell Mol Life Sci*, 2002; 193-212.
- Stremmel W, Pohl J, Ring A, and Herrmann T. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids*, 2001; 981-989.
- Şimşek FM, Kaynaş S, Alten B, and Çağlar SS. Laboratory colonization of the malaria vector *Anopheles (Cellia) superpictus* Grassi, 1899 from Şanlıurfa, Turkey. *Journal of European Mosquito Bulletin*, 2005; 26-30.
- Topluoğlu S, Karasartova D, Karaer ZK, and TAYLAN-ÖZKAN A. Şanlıurfa yöresindeki Anofel larvalarının morfolojik tanımlanması ve üreme alanlarının fiziksel ve ekolojik özelliklerinin araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2019; 207.
- Truman JW. Hormonal control of insect ecdysis: endocrine cascades for coordinating behavior with physiology. *Vitam Horm*, 2005; 1-30.
- Truman JW, Rountree DB, Reiss SE, and Schwartz LM. Ecdysteroids regulate the release and action of eclosion hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *J Insect Physiol*, 1983; 895-900.
- van Noort M, Rommerts FF, van Amerongen A, and Wirtz KW. Intracellular redistribution of SCP2 in Leydig cells after hormonal stimulation may contribute to increased pregnenolone production. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 60-65.
- Vyazunova I, Wessley V, Kim M, and Lan Q. Identification of two sterol carrier protein- 2 like genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 2007; 305-314.

- WRBU (2022). Mosquito Identification Resources. Access: [http://wrbu.org/VecID_MQ.html], 22.08.2022.
- Li H, and Tang C-K. Sterol carrier protein 2 in lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, molecular biology, and potential clinical implications. *Metabolism*, 2022; 155:180.
- Xu T, Bowman E, Glass D, and Lambeth J. Stimulation of adrenal mitochondrial cholesterol side-chain cleavage by GTP, steroidogenesis activator polypeptide (SAP), and sterol carrier protein2. GTP and SAP act synergistically. *J Biol Chem*, 1991; 6801-6807.
- Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EP, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, and Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem*, 1996; 16026-16034.
- Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 267-287.
- Yildirim A, Inci A, Duzlu O, Biskin Z, Ica A, and Sahin I. *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Vet. Parasitol*, 2011; 143-147.
- Yun HK, Jouni ZE, and Wells MA. Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002; 1151-1158.
- Zahar A. Review of the ecology of malaria vectors in the WHO Eastern Mediterranean Region. *Bull World Health Organ*, 1974; 427.

ANOPHELES SACHAROVİ NESİLLERİNDE STEROL TAŞIYICI PROTEİN 2 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE EKSPRESYON ANALİZLERİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 11	% 10	% 4	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	www.hindawi.com İnternet Kaynağı	% 1
3	K. C. Krebs. "Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, Aedes aegypti", Insect Molecular Biology, 2/2003 Yayın	<% 1
4	www.bio-rad.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	taxonomicon.taxonomy.nl İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.erdogan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Sümeyye AYGÜN

Uyruğu: T.C.

EĞİTİM

Derece

Kurum

Mezuniyet

Lise

Nevşehir Lisesi

2008-2012

Lisans

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi

2013-2018