

***BOMBUS TERRESTRIS* (HYMENOPTERA: APOCRITA: APIDAE)**

TÜRÜNDE *GLOBIN* GENİ

ÜZERİNE BİYOİNFORMATİK ARAŞTIRMALAR

HABEŞ BİLAL AYDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

2015

T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOMBUS TERRESTRIS (HYMENOPTERA: APOCRITA: APIDAE)
TÜRÜNDE GLOBİN GENİ ÜZERİNE BİYOİNFORMATİK
ARAŞTIRMALAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

H. BİLAL AYDEMİR
(201292021067)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd.Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ

SİVAS
OCAK 2015

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

*Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-403** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*

Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Habeş Bilal AYDEMİR, 2015

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

17.12.2014

Habeş Bilal AYDEMİR

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında maddi manevi yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ' a .ok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının her aşamasında yanımda olan yardımlarını, emeklerini hiç esirgmeden veren başta Merve Nur ÖRDEK, Prof. Dr. H. Hüseyin BAŞIBÜYÜK, Yrd. Doç. Dr. Mahir BUDAK ve B. Seçil DUREL' e teşekkür ederim.

Bu tezin bazı analiz kısımlarında laboratuvarlarını açan ve yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN ve Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR' a teşekkür ederim.

Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi (CÜBAP) tarafından F-403 numaralı projeyle desteklenmiştir.

ÖZET

***Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apocrita: Apidae) Türünde *Globin* Geni Üzerine Biyoinformatik Araştırmalar**

Habeş Bilal AYDEMİR

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç. Dr. Ertan Mahir KORKMAZ

2015, 103 sayfa

Böcekler her ekosistemde hayatta kalmayı başarmış bir canlı grubudur. Böceklerin deniz seviyesinin birkaç bin metre altından birkaç bin metre yükseğine kadar yaşayabiliyor olmaları oksijen taşınmasında ve/veya depolanmasında görevli bir globin proteinin varlığını düşündürmektedir. Bazı böcek takımlarında yapılan *globin* geni karakterizasyonu ve genin ifade profili çalışmaları fonksiyonel olarak *globin* geninin solunum, termoregülasyon, oksijen depolama ve zararlı oksijen türevi bileşiklerin detoksifikasyonu gibi mekanizmalarda rol aldığını göstermiştir.

Ekolojik ve ekonomik açıdan önemli olan *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae: Bombinae), yüksek ve düşük rakımlı habitatlarda geniş bir yayılış gösteren bir türdür. Yükselti ve sıcaklık açısından farklı lokalitelerde yaşayabilmekte ve iyi uçucu olmaları *Bombus* türünde oksijen depolama mekanizmalarının olabileceğine işaret etmektedir.

Bu çalışmada RNA ve DNA tabanlı analizler sonucunda *B. terrestris*'te fonksiyonel olarak bulunan ifade edilen bir *globin* geninin varlığı öngörülmüştür. *B. terrestris* globin geninin açık okuma çerçevesi, amino asit dizisi, 5' ve 3' RACE Sistem ile genin 5' ve 3' ucundaki kodlama yapmayan olası kontrol bölgeleri, transkriptin olası sekonder ve üçüncül yapılarının tahminleri ile gen karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon profillerine bakılarak abdomen(ct=32,72), malpigi tüpü (ct=33,28), testislerde (ct=35,88) ifade edildiği ve olası işlevi hakkında bulgular elde edilmiştir. Veri tabanlarındaki mevcut globin dizileriyle karşılaştırmaları yapılarak nükleotid ve amino asit dizileri üzerinden karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Bütün analizler sonucunda sitoplazmada lokalize olan Protoporfirin IX halkaya sahip bir globin protein olabileceği ve *B. terrestris* türünün malpigi tüpü, testis gibi dokularda oksijen depolanmasında görev alan sitozolik bir protein olabileceği öngörülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Bombus terrestris*, solunum, globin, moleküler karakterizasyon

ABSTRACT

Bioinformatic Researches on *Globin* Gene in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apocrita: Apidae)

Habeş Bilal AYDEMİR

Master thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assistant Professor Doctor Ertan Mahir KORKMAZ

2015, 103 pages

Insects are a group, which can manage to survive at almost all ecosystems. Researchers head towards a possible functional *globin* gene due to their surviving capacity from a few thousand meters below to a few thousand meters above sea level. The molecular characterization studies in some insect orders has shown that the *globin* gene serves for thermoregulation system as well as the transport and storage of O₂. *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae: Bombinae), which is an economically and ecologically important species, exhibits a wide range distribution from low to high altitudes. Its strong-flying capacity and different habitat preferences indicate that alternative oxygen storage mechanisms would be in this species.

Here, a putatively functional *globin* gene in the *B. terrestris* are investigated by using some approaches based on DNA and RNA. We characterized open reading frame and amino acid sequence of the gene using nucleotide information, putatively noncoding control regions at each edge of gene by applying RACE system and secondary as well as tertiary structures of the transcript by using involved bioinformatics approaches. We also observed differences at expression profiles of the *globin* gene in Malpighi tubes (ct= 33.28), abdomen (ct= 32.72) and testicles (ct= 35.88) of the species. The gene was also characterized comparing with the published insect *globin* genes utilizing the nucleotide and amino acid sequence information. All analysis indicate that this protein has Protoporphyrin IX-containing haemoglobin and is predicted to localize in the cytoplasm due to no signal peptide for transmembrane transport.

Key words: *Bombus terrestris*, respiration, *globin*, molecular characterization

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Böcekler.....	1
1.2. Farklı Yaşam Stratejileri.....	2
1.2.1. Termorgülasyon	3
1.3. Solunum Sistemi.....	5
1.3.1. Trake Sistemi	5
1.3.2. Trake Sistemi Bileşenleri.....	5
1.3.3. Miyogloblin ve Hemogloblin	7
1.4. Globinlerin Keşfi ve Evrimi	7
1.4.1. Omurgalı Globinleri.....	9
1.4.2. Omurgalı Hemogloblin ve Miyogloblinleri	10
1.4.3. Nörogloblin ve Sitogloblin.....	12
1.4.4. Omurgasızlarda globinler.....	13
1.4.5. Böceklerde Globinler	14
1.5. Böceklerde Globin Genin Varlığına Yönelik Çalışmalar	14
1.6. Hymenoptera	15
1.6.1. <i>Bombus terrestris</i>	17
1.7. <i>Bombus</i> Kullanılma Nedeni.....	18
2. MATERYAL ve METOD.....	23
2.1. Örneklerin Toplanması ve Teşhisi.....	23
2.2. DNA İzolasyonu	23
2.2.1. Salting-out yöntemiyle DNA İzolasyonu.....	23

2.2.2. DNeasy Blood and Tissue Kit ile DNA İzolasyonu	24
2.2.3. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu	25
2.3. <i>Globin</i> Genin Varlığına Yönelik Nükleotid Düzeyinde Ön Analizler	27
2.3.1 Primer Tasarımı	27
2.3.1.1 T_M Değerinin Hesaplanması.....	30
2.3.2 PZR Uygulamaları	31
2.4. <i>Globin</i> Genin Varlığına Yönelik İfadeleme Düzeyinde Analizler	33
2.4.1. Total RNA İzolasyonu	33
2.4.2. SuperscriptII RT ile Reverse Transkriptaz PZR	34
2.4.3. <i>Real-time</i> PZR.....	35
2.4.4. RACE Sistem	36
2.4.4.1 5' RACE Sistem.....	36
2.4.4.1.1. Tek Zincirli cDNA Sentezi	36
2.4.4.1.2. cDNA' nın S.N.A.P. Kolon İle Saflaştırılması	38
2.4.4.1.3. cDNA' nın TdT Uzatılması	39
2.4.4.1.4. dC Kuyruklu cDNA' nın PZR'ı.....	40
2.4.4.1.5. Yuvalanmış (Nested) Amplifikasyon	41
2.4.4.2 3' RACE Sistem.....	43
2.5. Veri Setlerinin Analizi	44
2.5.1. Nükleotid Düzeyinde Karakterizasyon Analizleri	44
2.5.2. Amino Asit Düzeyinde Karakterizasyon Analizleri	45
2.5.3. Protein Düzeyinde Karakterizasyon Analizleri.....	46
2.5.4. Filogenide Kullanılabilirliğine Yönelik Analizler	46
3. BULGULAR	48
3.1. DNA İzolasyonu	48
3.2. RNA İzolasyonu	50
3.3. RT-PZR	51
3.4. <i>Real-time</i> PZR	52
3.5. RACE Sistem.....	53
3.6. <i>Globin</i> geninin Moleküler Düzeyde Karakterizasyon Çalışmaları.....	54
3.6.1. Nükleotid Düzeyinde Analizler	54
3.6.2. Amino Asit Düzeyinde Analizler.....	57
3.6.3. Amino Asit Sekonder Yapılar Tahmini Ve Analizleri.....	59

3.6.4. Protein 3 Boyutlu Yapı Analizleri	62
3.7. <i>Globin</i> geninin Filogenide Kullanımına Yönelik Analizler	64
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	69
KAYNAKÇA	75
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Böcekler evrimsel tarihleri boyunca geliştirdikleri farklı yaşam stratejileri ..	2
Şekil 2. İnsan globinleri için olası evrim modeli	10
Şekil 3. İnsan globinleri için olası evrim modeli	11
Şekil 4. Klasik bir globin proteinin globüler yapısı ve hem grubunun amino asit dizisindeki amino asitler ile etkileşimi.....	12
Şekil 5. Bazı hymenopteran böceklerin görüntüsü.....	17
Şekil 6. <i>B. terrestris</i> kraliçe arısının fotoğrafı.....	18
Şekil 7. Böcek takımlarının solunum proteinlerinin dağılımı.....	20
Şekil 8. Globin proteinin helikal yapısındaki korunmuş önemli pozisyonlardaki amino asitlerin gösterimi.....	21
Şekil 9. HB2F-HB2R primer çifti ile yapılan PZR' ın % 0,8' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve dizilenen PZR ürünün GenBank' taki nBLAST taraması sonucu.....	49
Şekil 10. GLBRTR4 primeri ile yapılan RT-PZR sonucu elde edilen cDNA' dan yapılan GLBRTF1- GLBRTR4 primerleri ile yapılan standart PZR' ın % 0,8' lik agaroz jel elektroforezi sonucu	51
Şekil 11. cDNA örneklerinden çoğaltılan PZR ürünlerinin dizilerinin GenBank' ta homoloji taraması sonucu	52
Şekil 12. RACE sistem sonucu elde edilen PZR ürünlerinin % 0,8'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	54
Şekil 13. <i>B. terrestris globin</i> geni açık okuma çerçevesi ve nükleotid dizilerinden elde edilen amino asit dizisi	55
Şekil 14. <i>B. terrestris globin</i> geni açık okuma çerçevesi, genin öncesinde ve sonrasında bulunan genin kontrol bölgelerinin nükleotid dizileri.....	56
Şekil 15. 3' RACE sistem ile edilen genin 3' ucundan elde edilen dizinin termodinamik açıdan kararlı sekonder yapısı	57
Şekil 16. Katlanma tipine göre yapılan analizde elde edilen genin amino asit dizisinin sekonder yapısı.....	60
Şekil 17. PROTTER veri tabanında yapılan lokalizasyon analizi sonucu proteinin olası hücredeki konumu	61

- Şekil 18.** *B. terrestris* globin proteininin Cn3D 4.3.1 programı yardımıyla çizilen 3 boyutlu yapısı ve proteinin fonksiyonunda görevleri olan Histidin E7, Histidin F8 amino asitlerin proteindeki olası konumu..... 62
- Şekil 19.** Diptera ve Hymenoptera takımlarına ait *globin* geni belirlenmiş olan dört türün *globin* geninin amino asit dizileri ile bu çalışma kapsamında saptanmış olan *B. terrestris* türü olası *globin* geninin amino asit dizisi CLUSTAL W algoritmasına başvurularak yapılan hizalamaları ve korunan amino asitlerin gösterimi..... 65
- Şekil 20.** Analiz edilen türlerin *globin* geni nükleotid dizisinin kullanılması sonucunda inşa edilen maksimum likelihood (ML) ağacı..... 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1. Primer tasarım aşamasında ve amplifikasyonun etkinliğinde önemli olan özellikler	29
Çizelge 2. <i>Apis mellifera globin</i> geni mRNA dizisi (NCBI erişim numarası NM_001077823.2) referans alınarak tasarlanan primer listesi	31
Çizelge 3. <i>B. terrestris</i> bireylerinden yapılan DNA izolasyonu sonrası nanodropta ölçülen örneklerin konsantrasyonları ve A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} değerleri... 48	48
Çizelge 4. <i>B. terrestris</i> bireylerinden yapılan RNA izolasyonu sonrası nanodropta ölçülen örneklerin konsantrasyonları ve A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} değerleri... 50	50
Çizelge 5. Total bireylerden ve BtA etiketli bireyin farklı dokularındaki elde edilen cDNA'ların <i>globin</i> geni ekspresyon profili.....	53
Çizelge 6. <i>B. terrestris globin</i> geninden elde edilen amino asit dizisinde kullanılan amino asitlerin kullanım yüzdeleri	58
Çizelge 7. Amino asitlerin kodlanmasına yönelik hesaplanan görecel sinonim kodon kullanım eğilimleri	59
Çizelge 8. <i>A. mellifera</i> türüne ait <i>globin</i> geni ile bu çalışma kapsamında elde edilen <i>B. terrestris globin</i> geni arasındaki amino asit değişimlerinin korunmuşluk oranlarının göreceli yer değiştirme sıklığı algoritması kullanılarak (Grantham 1974) hesaplanması	63
Çizelge 9. Analiz edilen türlerin <i>globin</i> geni nükleotid ve amino dizilerinin kullanılması sonucunda elde edilen nükleotid ve amino asit <i>p-distance</i> değerlerinin Çizelgesi	66
Çizelge 10. Analiz edilen bireylerin tamamında, takım bazında yapılan <i>globin</i> geni nükleotid dizileri üzerinden DAMBE programı kullanılarak yapılan doygunluk indeksleri	67
Çizelge 11. <i>Globin</i> geni nükleotid dizi verileri üzerinden transisyonel/transversiyonel mutasyon oranları	68

SİMGELER DİZİNİ

a.a.	Aminoasit
bç/kb	Baz çifti/kilo baz
C	Celcius
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
ms	Milisaniye
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
ns	Nanosaniye
pmol	pikomol
U	Ünite
V	Volt
µL	Mikrolitre
µs	Mikrosaniye
µm	Mikrometre

KISALTMALAR DİZİNİ

AUAP	:	Köprülenmiş evrensel çoğaltma primeri
Cygb	:	Sitogloblin
COI	:	Sitokrom oksidaz I
cDNA	:	Komplementer DNA
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DTT	:	Dithiothreitol
DEPC	:	Dietil pirokarbonat
dNTP	:	Dinükleotid trifosfat
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
Fe⁺²	:	Demir +2 iyonu
FHbs	:	Flavohemoglobinler
GAPDH	:	Gliseraldehit-3-fofat dehidrojenaz
GCSs	:	Globin çifti sensörler
Hem-b	:	Demir (II) Protoporfirin IX
Hb	:	Hemoglobin
LDH	:	Laktat dehidrojenaz
Mb	:	Miyoglobin
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
Ngb	:	Nöroglobin
NO	:	Azotmonoksit
O₂	:	Oksijen Molekülü
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pgbs	:	Protoglobinler
RACE	:	Hızlı, etkili bir şekilde cDNA sonlarının çoğaltılması
RPM	:	Revolution per minutes (dakikadaki dönme sayısı)
RT-PZR	:	Reverse Transkriptaz PZR
SDgb	:	Tek alt birimli globinler
SDSgbs	:	GCSs'in N-terminal ucuna bağlantılı 3/3 tek alt birimli globinler
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
Taq	:	Thermus aquaticus
TE	:	TRİS+EDTA çözeltisi
TBE	:	TRİS-Borik Asit-EDTA çözeltisi
TRİS	:	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UAP	:	Evrensel çoğaltma primeri

1.GİRİŞ

1.1 Böcekler

Böcekler, eklem bacaklılar filumu içerisinde bulunan bir omurgasızlar sınıfıdır. Eklembacaklılar, kitin dış iskelete sahip, vücudu üç parçaya ayrılmış (kafa, toraks ve abdomen) omurgasızlardır. Oynar eklemlere sahip üç birleştirilmiş bacağı, birleşik gözlere ve bir çift antene sahiptirler. Böcekler, hayvanlar aleminin en çeşitli gruplarından biri olup 1 milyondan fazla tanımlanmış tür içerir ve bilinen tüm organizmaların yarısından fazlasıyla temsil edilir (Chapman, 2006; Wilson, 2009). Böceklerin 6 ila 10 milyon arasında yok olmuş türe sahip olduğu (Erwin, 1997; Novotny ve ark., 2002;) ve dünyadaki farklı hayvan yaşam formlarının yaklaşık %90'ını içerdiği düşünülmektedir (Erwin, 1982).

Böceklerin yaşam döngüsü değişse de çoğu yumurtadan çıkmaktadır. Böcek gelişimi elastik olmayan dış iskeletle sınırlandırılmıştır ve deri değiştirme serileri içerir. Gelişimlerinin erken evrelerinde erişkinlerinden yapısal olarak farklıdır ve farklı habitatlarda yetişebilirler. Genelde pasif bir pupa dönemi sonrası tam metamorfoz geçirirler.

Yetişkin böcekler tipik olarak yürüyerek, uçarak veya nadir de olsa yüzerek hareket ederler. Uçmaya evrimleşmiş tek omurgasız sınıfı böceklerdir. Böcekler genelde yalnız yaşayan organizmalardır fakat arılar, karıncalar ve termitlerde olduğu gibi bazıları sosyal yaşam biçimine sahip olup büyük ve iyi organize olmuş koloniler halinde bulunurlar. Bazı böcekler ise anasal bakım sergiler ve yumurtaları ile gençlerini erginleşene kadar korurlar.

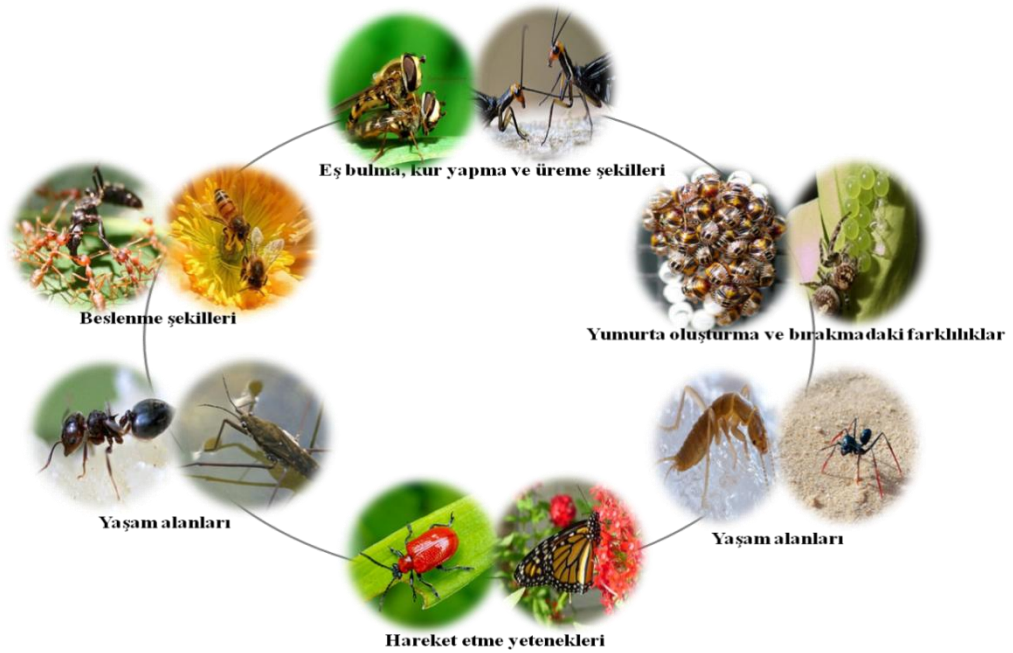
Böcekler birbirleriyle çeşitli yollardan iletişim kurabilirler. Erkek kelebekler, çok uzaklarındaki dişi bir kelebeği feromonlar sayesinde tanıyabilir. Bazı Coleoptera türleri ise ışık yardımıyla iletişime geçmektedir.

Böcekler insanlar tarafından zararlılar olarak görülmektedir ve insanlar böcekleri kontrol altında tutabilmek için böcek zararlıları ve bazı başka teknikleri kullanırlar. Bazı böcekler bitkilere onlardan beslenerek zarar verir. Bazı parazitik türler ise patojen özellikte iken bazıları ise polen dağılımını tetiklerken hastalık yayılımına da

neden olan kompleks ekolojik özellikler sergiler. Polinatör(tozlaştırıcı) böcekler çoğu çiçekli bitki türünün yaşam döngüsü için elzendir. İnsanlar da bu döngüden dolayı olarak etkilenir ve böcekler olmaksızın biyosferin insanları da içeren karasal kısmı zarar görecektir (Wigglesworth, 1984). Diğer bazı böcekler ise ekolojik olarak yararlı kabul edilmektedir. Predatör böcekler doğrudan ekonomik faydalar sağlamaktadır. İpek böceği ve arılar, sırasıyla ipek ve bal üretimi için insanlar tarafından çokça kullanılmaktadır. Bazı kültürlerde ise böcek larvaları veya yetişkinleri insanlarca besin kaynağı olarak kullanılmaktadır.

1.2. Farklı Yaşam Stratejileri

Böcekler, okyanuslarda çok az türle temsil edilse de; okyanuslardan kutuplara, çöllerden yağmur ormanlarına kadar hemen hemen her ekosistemde hayatta kalmayı başarmış, uyumsal özellikleri geniş bir sınıftır. Bunu başarmalarındaki ana etmen, evrimsel tarihleri boyunca geliştirdikleri farklı yaşam stratejileridir (Şekil 1). Bu stratejiler; beslenme, eş bulma, kur yapma, üreme, yumurta oluşturma gibi özellikleri korumak ve konak değişimi, hareket yetisi, ekosistem değişimi ve yaşadıkları alanda sıcaklık, basınç, nem gibi dış etmenlerle mücadele etme zorunluluğu için geliştirilmiştir.



Şekil 1. Böceklerin farklı ekosistemlerde hayatta kalmak için geliştirdikleri yaşam stratejileri.

Böcekler, fitofag (bitkiyle beslenen) ve etçil (parazitoit ve predatör) olmak üzere 2 farklı beslenme davranışı sergilerler. Eş bulma, kur yapma ve üreme gerekliliği, dişi ve erkek böceklerin farklı renklerde ve şekillerde evrimleşmesine neden olmuştur. Bu durum böceklerin nesillerini devam ettirmesi için elzem bir süreçtir. Böceklerin yumurta bırakırken izledikleri stratejiler, yumurtaların beslenebileceği bir konak bulmasından, hayatta kalan bireylerin sayısını artırmak amacıyla bıraktığı yumurta sayısını artırmasına kadar çeşitlilik sergiler. Sucul, karasal, kanatlı ve kanatsız formların yaşadıkları ekosistemin fiziksel özelliklerine uyum sağlamak için farklılaştığı saptanmıştır. Sıcaklık, basınç, nem gibi çevresel etmenlere karşı gösterilen uyumsal özellikler de böceklerin geliştirdikleri stratejilerdendir(Cloudsley-Thompson 1975).

1.2.1 Termoregülasyon

Bu uyumsal özellikler içerisinde sıcaklık, yaşamsal açıdan oldukça önemli bir parametredir. Sıcaklık, böceklerin yayılışını, gelişimini, davranışını, hayatta kalmasını ve üreme başarısını etkileyen çevresel bir faktördür. Yaşamsal faaliyetlerin gerçekleşebilmesi için dış ortam ve vücut sıcaklığının belirli bir aralıkta kararlı olması gerekmektedir. Bazı aşırı koşullara uyum sağlamış organizmalar dışında, yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için gerekli ideal sıcaklık 37 °C`dir. Canlılarda epinefrin ve tiroksin gibi metabolik hızı artırıcı hormonların salınımı, bazal metabolizmanın devamlılığı, kas aktivitesi ve dış ortam sıcaklığı gibi etmenler vücut sıcaklığının artmasına neden olmaktadır. Yayılma, iletim/aktarım ve evaporasyon gibi durumlarda ise vücut sıcaklığı düşmektedir. Böceklerde bu etkilere ek olarak; yaşadığı ortamın iklim koşulları, ortamda stres oluşturabilecek unsurların varlığı ve özellikle uçucu türlerdeki mekanik hareket gibi etkenler vücut sıcaklığının değişmesine yol açmaktadır. Hymenoptera ve Diptera gibi çok hızlı ve uzun süre uçabilen böcek takımlarında, uçuş eylemi sırasında kanatların bağlı olduğu toraks bölgesinde sıcaklığın 45 °C`ye kadar çıktığı saptanmıştır. Kanat çırpma hareketi nedeniyle oluşan ısının ise en çok bu bölgede yoğunlaştığı belirlenmiştir(Heinrich, 1980a, 1980b;Tsubaki ve ark., 1987; Harrison ve ark.,2002; Stabentheiner ve ark., 2012). Yaşadığı ekosistemin sıcaklığına bağlı olarak böceklerin vücut sıcaklıkları benzer değişimler sergilemektedir (Cloudsley-Thompson 1975; Cooper ve ark., 1984; Muratori ve ark., 2006). Ortamda alkali fenolik bileşikler ya da oksijen yetersizliği veya fazlalığı olduğunda, böceklerin vücut sıcaklığının değiştiği ve sonuç

olarak da böceklerin vücut sıcaklıklarını dengelemek için bazı mekanizmaları devreye soktuğu rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2006; Gleixner ve ark., 2008). Vücut sıcaklığındaki herhangi bir artma veya azalmanın canlı için letal etki oluşturabileceği bilinmektedir (Harrison ve ark.,2002). Yaşamın devamlılığı için sıcaklığın dengede tutulması kritik önem arz etmektedir. Sıcaklığın dengede tutulması için ise bazı düzenleme mekanizmalarının uyumsal olarak kazanıldığı bilinmektedir (Bartholomew ve ark., 1984, Prange, 1990, Bechera ve ark., 2010). Kazanılan bu uyumsal mekanizmalara genel olarak *termoregülasyon* adı verilir. Termoregülasyon, vücut ısısının metabolizma ya da davranışsal kontrolle sabit tutulmaya çalışılmasıdır (Clench, 1966; Heinrich ve ark., 1981, 1993). *Davranışsal termoregülasyon*, organizmanın vücut sıcaklığını ayarlamak için içgüdüsel olarak sergilediği davranışların bütünüdür. Kaplan kelebekleri (Cicindelidae), sıcaklığın oldukça düşük olduğu sabahın erken saatlerinde güneş ışınlarını alabilecek şekilde, 45 derecelik açıyla kanatlarını açıp kapatarak ısı oluşumunu sağlarlar. Oluşan bu ısının vücut içerisine aktarılmasıyla vücut ısısı da artırılır. Sıcaklığın arttığı ilerleyen saatlerde ise türler, kanat çırpma yönlerini tam tersi yöne çevirirler ve böylece vücutlarının aşırı ısınmasını engellemeye çalışırlar (Burchsted, 2009). Kelebeklerde yapılan benzer bir diğer çalışmada, ekosistemlerindeki sıcaklığın durumuna bağlı olarak güneş ışınlarını absorbe etmek veya yansıtmak için koyu veya açık renkli vücut yönünde eğilimli olan türlerin varlığı saptanmıştır. Sıcaklığı sabit tutmak için geliştirilen bu adaptif özellikler *davranışsal termoregülasyona* örnektir (Burchsted, 2009). *Apis mellifera* (bal arıları) türleri buldukları kovadaki sıcaklık artışını engellemek için kanat çırpma hareketi sergileyerek hava akışı sağlamaya çalışırlar. Bu davranış, bireyin vücut sıcaklığını arttırsa da kovanın sıcaklığını düşürmektedir (Burchsted, 2009). Ayrıca bal arılarının, su ve bitki nektarını ısı transferi için kullandığına dair bulgular da mevcuttur (Burchsted, 2009). Sıcaklığın sabit tutulması için geliştirilmiş bir diğer adaptif özellik ise *metabolik termoregülasyondur*. *Metabolik termoregülasyon*; artan ya da azalan vücut sıcaklığını optimum hale getirebilmek ve sıcaklık değişiminden minimum düzeyde etkilenmek için böceğin gerçekleştirdiği metabolik süreçlerin genel adıdır. Holometabol böceklerin larval dönemlerini az hareketli, pupal dönemlerini ise hareketsiz geçirdiği göz önüne alındığında değişen sıcaklığa verilen tepkinin yaşamsal önem arz ettiği anlaşılabilir. Az hareketlilik veya hareketsizlikle ilgili bu sorun, yapısal proteinlere şeker gruplarının ve/veya glikol grubununun eklenmesiyle çözülmektedir (Burchsted, 2009).

Ek olarak hücre membranındaki yağ asitlerinin doyurulmasıyla da hücreden su kaybı azaltılabilir ve sıcaklık dengede tutulabilir (Burchsted, 2009).

Böcekler dışındaki organizmalarda sıcaklığın sabit tutulmasında, O₂'nin kaslara solunum düzeyinde yaptığı desteğin önemi bilinmektedir (Bartholomew ve ark., 1984). Böceklerde solunum, trake sistemiyle gerçekleştirilir. Bu sistemde stigma adı verilen açıklıktan alınan O₂, ağaç dallarına benzeyen ve tüm vücudu kapsayan, trakeol yapısı sayesinde dokulara kadar uzanan borucuk sistemiyle hücrelere iletilir. Bu dalların sayısı ve konumu O₂ ihtiyacına bağlı olarak dokudan dokuya ve/veya bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir (Bartholomew ve ark., 1984; Prange, 1990). Gazın vücuda giriş ve çıkışı çizgili kasların kasılıp gevşemesiyle gerçekleşir. Bu kasılıp gevşeme sistemi, O₂'nin hızlı kullanımı için idealdir fakat verim açısından yetersizdir. Mevcut bağ enerjisinin çoğu ısı enerjisine dönüşür (Bartholomew ve ark., 1984). Bu nedenle açığa çıkan ısı enerjisinin canlıya zarar vermemesi için termoregülasyon mekanizmaları sürekli devrede olmak zorundadır.

1.3. Solunum Sistemi

1.3.1. Trake sistemi

Çoğu hayvan grubunda solunum deri ve akciğer solunumu şeklinde gerçekleşirken, böceklerde solunum; organ, doku ve nihayetinde hücrelere kadar bölünerek artan dallanmaları içeren trake sistemi ile gerçekleştirilir. Böceklerdekine benzer olarak Arachnida, Chilopoda ve bazı Crustacea'lerde olmak üzere diğer Arthropoda gruplarında da trake sistemi mevcuttur. Onychophora ve Diplopoda gruplarında ise işlevselliğini kaybetmiş trake tüpleri mevcuttur. Trake sistemiyle solunum, temel olarak kompleks yapıdaki borucukların daha ince borucuklara ayrılması ve bu ince boruların da nihayetinde hücre gruplarına ulaşmasıyla gerçekleşir. Böceklerdeki bu dallanan borucuklar, omurgalılardaki damar ve kılcal damar dallanmalarına analogdur (Wigglesworth, 1984; Borror, 1989; Chapman, 1998).

1.3.2. Trake Sisteminin Bileşenleri

Böcekler havayı dış ortamdan vücutlarına stigmalar aracılığı ile alır. Stigma, vücudun yanlarında parçalı olarak sıralanmış trake açıklıklarının genel adıdır. Stigma, stigma açıklığı ve atriumdan oluşur ve doğrudan trake sistemine açılır.

Stigmalar bazı gruplarda morfolojik olarak elek şeklindeyken, diğerlerinde tüylerle kaplıdır. Bu yapılar trake sistemine toz ve su gibi yabancı maddelerin girişini engelleyecek şekilde özelleşmiştir. Bazı böcek gruplarında ise stigmalar içten veya dıştan kapaklı olabilir. Karada yaşayan böceklerin çoğu, su kaybını önlemek amacıyla kapak mekanizmasına sahiptir (Chapman, 1998). Trake gövdesinden doku ve organlara hava götürmek amacıyla parçaların herbirinden çok sayıda dal ayrılır. Bu dalların sayısı ve konumu dokunun görevine ve oksijen ihtiyacına göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle vücut içerisindeki dallarda farklı yönelimlerde özelleşme gerçekleşmiştir. Dallardaki herbir segment, kalbe ve dorsal kaslara hava götüren *dorsal dal*, bacaklara, kanatlara, sindirim ve üreme sistemi hücrelerine hava götüren *lateral* veya *visceral dal*, sinir şeridinde ve ventral kaslara hava götüren *ventral pozisyonlu dal* olarak adlandırılan üç ana daldan birinden kökenlenir. Böceğin baş kısmına ise lateral ana daldan ayrılan yan dallardan oksijen taşınır ve başta yer alan anten, beyin, göz ve kas hücrelerine bu şekilde oksijen taşınır (Chapman, 1998).

İnce trakelerin uç kısımları tekrar dallara ayrılarak bir mikron veya daha küçük çaptaki küçük kapiler tüpleri yani *trakeoller* meydana getirir. Doku ve hücreler arası boşlukta dallanarak yayılan trakeoller hücrelere oksijen difüzyonunu sağladığı için trake sisteminin işlevsel kısmını oluşturur. CO₂'nin uzaklaştırılması bu yolun tersi işletilerek sağlanır ve CO₂'nin 1/4'ü vücut yüzeyi üzerinden atılır (Borror, 1989). Trakeler, ektoderm tabakasının vücut içine doğru gelişmesiyle oluştuğu için ektoderm özelliğindedir. Trake sistemi elastik yapıda olup bu esnek yapı sayesinde oksijen girişi ve CO₂ çıkışı sağlanır. Trakelerin defalarca dallanmasıyla oluşan trakeoller trakeol hücresi olarak da bilinen ağimsı hücrelere sahiptir. Trakeollerin bir ucu organ veya doku içerisine girer ve buradan gaz alışverişi sağlanır. Trakeol çeperi gaz alışverişine imkan verecek şekilde ince yapılaşmıştır. Böylece fiziksel ve mekanik etkileşimlerle gaz difüzyonu, dolayısıyla da solunum sağlanır.

Trakeollerin uç kısımlarında yaklaşık 0,2-0,3 µm çapında, içi sıvı dolu sütunlar bulunmaktadır. Dokuya veya organa doğru ilerleyen iç kısımlardaki kılcallanmanın artışı ve oluşan kılcal basınç kuvveti nedeniyle, sıvılar, dokulardan kılcal boru içerisine doğru akma eğilimi sergilerler (Borror, 1989; Wigglesworth, 1984). Bu nedenle trakeollerin iç çeperleri genellikle sıvı ile kaplıdır. Sıvıyı doku içerisinde tutabilmek için tam tersi yönde bir kuvvetin olması gerekmektedir. Trake kılcallarının su tutma kuvveti, etrafını çeviren hemolenfin ozmotik basıncına bağlıdır. Dokudaki oksijen azaldığı zaman yadımlama ürünlerinin miktarı artar ve bu

da hemolenfin ozmotik basıncını yükseltir. Oluşan bu ozmotik basınç sonucunda trakeollerin uç kısmındaki su dokular içine emilir ve böylece oksijen boşalan kılcallara doğru ilerler. Yeterince oksijen alındıktan sonra ozmotik basıncın yükselmesine neden olan yadımlama ürünlerinin oksitlenmesiyle ya da yıkılarak ortamdaki uzaklaştırılmasıyla, ozmotik basınç düşer. Bunun sonucu su, dokulardan kılcal borular içine geçmeye başlar ve hava dışarıya doğru itilir. Sıvının kılcal borular içinde dolaşımıyla oksijen içeren hava döngüsel olarak trakeoller içerisine pompalanır (Chapman, 1998).

Birçok böcek grubunda solunuma yardımcı olan ve hava depolamaya yarayan keselere hava keseleri denir. Havanın geniş lümenli trakelere ve hava keselerine pompalanmasında başka etkenler de rol oynamaktadır. İskeletin kaslar aracılığıyla genişleyip daralmasıyla hava içeriye ve dışarıya pompalanır. Bu durum birçok böcekte abdomenin sırt- karın yönünde açılıp kapamasıyla ya da teleskobik segmentlerin birbirinin içerisine girmesiyle meydana gelmektedir. Ayrıca göğüs birçok böcekte aktif olarak havalandırmaya katılır. Göğüste meydana gelen hacim değişimleriyle hava, stigmalardan içeriye ve dışarıya pompalanır. Bu yapılar trake gövdelerinin genişlemesi ile oluşmuştur. Diptera takımı ile Hymenoptera'nın Apocrita alttakımında olduğu gibi hızlı uçan böceklerde hava keseleri karın boşluğunun önemli bir kısmını doldurur. Özellikle torakstaki kaslar olmak üzere vücut kasları yardımı ile keseler sıkıştırılıp açılarak hava içeriye alınır (Bartholomew ve ark., 1984).

1.3.3. Miyogloblin ve Hemogloblin

En yaygın proteinleri miyogloblin ve hemogloblin olan globin proteinleri, oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiş büyük bir protein ailesidir. Globinler, büyük çeşitlilikteki canlı gruplarında saptanmış ve canlıların %33'ünde varlığı kanıtlanmıştır. Özellikle solunumda, gaz taşınmasında ve geçici süre oksijenin depolanmasında görevli olan miyogloblin ve hemogloblin proteinleri üzerine yapısal ve fonksiyonel çalışmalarla bu proteinler büyük ölçüde tanımlanmıştır. Amino asit dizisinin sekonder ve tersiyer yapısında benzerlik gösteren bu proteinler kuaterner yapısı ve işlevi bakımından çeşitlilik ve farklılık sergiler (Weber ve ark., 2001). Globinlerin birçok canlı grubunda tanımlanmış olması ve yapılan filogenetik araştırmalar bu protein ailesinin ortak atasal bir globin proteininden türediğine işaret

etmektedir. Bu filogenetik işaretine bağlı olarak globin proteinleri, canlı gruplarının evrimsel örüntülerinin saptanmasında da filogenetik bir belirteç olabilir (Terwilliger, 1998; Vinogradov ve ark., 2006).

1.4. Globin Proteinlerinin Keşfi ve Evrimi

Kırmızı kan hücrelerinin Hünefeld (1840) tarafından keşfedilmesinin ardından, hemoglobin benzeri proteinlerin (globinlerin) kas dokusu, sinir hücresi ve gamet yapısı gibi dokuların hücre sitoplazmasında ve hücre dışı sıvısında bulunduğu saptanmıştır (Hünefeld, 1840). Sonrasında devam eden araştırmalar globin proteinlerinin sadece omurgalılarda değil, daha geniş bir canlı topluluğunda bulunduğunu göstermiştir (Hünefeld, 1840; Funke, 1851).

Yaşamın üç ana dalında globin genleri üzerine yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda globin proteininin üç farklı kaynaktan kazanılmış olabileceği öngörülmektedir (Vinogradov ve ark., 2005). Olası ilk kaynak flavohemoglobinler (FHbs) ve tek alt birimli globinler (SDgb), ikinci kaynak globin çifti sensörler (GCSs), protoglobinler (Pgbs) ve GCSs'in N-terminal ucuna bağlantılı 3/3 tek alt birimli globinler (SDSgbs) ve olası üçüncü kaynak ise yaygın bilinen adıyla "kesik uçlu (budanmış)" globinleri (2/2Hbs) kapsar. Bu üç hattın eş zamanlı olarak benzer yönde evrimleşme ihtimalinin çok düşük olması nedeniyle, bu üç kaynağın herhangi bir tanesinin daha atasal olduğu, diğerlerinin ise bu atasal yapıdan türemiş olduğu öngörülmektedir (Vinogradov ve ark., 2005).

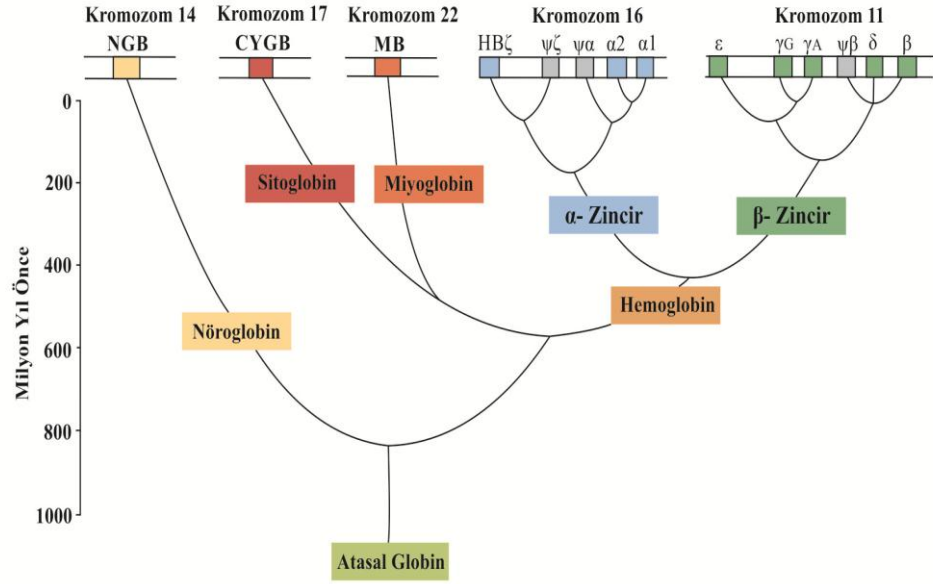
Globinlerin evrimi sıklıkla çalışılan bir alandır ve özellikle yakın geçmişte prokaryotik globinlerin saptanıp analiz edilmesiyle Arke ve bakterilerde protoglobin varlığı bu proteinin atasal olabileceğini göstermektedir (Milani ve ark., 2005; Zöngür, 2009). 1,8 milyar yıl öncemikroorganizmalarda bulunan budanmış globinler, 1,5 milyar yıl önce hayvanlarda ve bitkilerde bulunan globin geninin orjinini ortaya çıkarmıştır. Globinler farklı zamanlarda farklı moleküler evrim sürecindeki çıkış zamanlarına göre şöyle sıralanmıştır; 0,8 milyar yıl önce Nöroglobinler, 0,75 milyar yıl önce Hemoglobinler, 0,5 milyar yıl önce Miyogloblinler ve Sitogloblinler.

Globin proteinleri aerobik canlıların solunum proteini olarak bilinse de, globin proteinlerinin oksijenin atmosferde kullanıma elverişli olmadığı zamanlardan itibaren var olduğu savunulmaktadır (Vinogradov ve ark. 2005, 2007). Bu nedenle atasal globinin zararlı oksijen ve azot radikallerini detoksifiye etmede (Poole ve ark., 2000,

2005), kemotaksi davranışı sergileyerek sensör görevi görmesinde (Freitas ve ark., 2005) ve bu atasal proteine moleküler halde bulunan diğer gazların bağlanabilmesi için oksijene yabancı organizmaların kendini savunmasında ve korumasında kullanılan bir protein olabileceği düşünülmektedir (Terwilliger ve ark., 1998; Weber ve ark., 2001). Ayrıca oksijenin sulu çözeltilerde çok az çözünüyor olması, vücut içerisinde başka herhangi bir güç uygulanmaksızın uzak mesafelere gitmesinin pek mümkün olmaması, amino asit- O₂ etkileşiminin yapı bozucu ve geri dönüşümsüz reaksiyonlara neden olmasından dolayı vücutta serbest oksijen bileşiklerinin bulunmaması gerektiği, serbest Fe²⁺ atomlarının da DNA ve makromoleküllere zarar verebiliyor olması, oksijen taşınmasında ve depolanmasında görevli proteine ihtiyaç duyulacağını ispatlar niteliktedir. Bu sebeplerden dolayı oksijenli solunum yapan canlılarda bu gen ailesinin proteinlerinin bulunması şaşırtıcı değildir. Globinler, “omurgalı globinleri” ve “omurgasız globinleri” olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir.

1.4.1. Omurgalı Globinleri

Omurgalılarda miyogloblin (Mb), hemogloblin (Hb), nörogloblin (Ngb) ve sitogloblin (Cygb) olmak üzere dört çeşit globlin tanımlanmıştır (Şekil 2). Omurgalılarda gen ifadesi sırasında splayz mekanizmalarıyla intronların çıkarılması için kesim bölgeleri bulunmaktadır ve bu bölgeler oldukça korunmuştur (Pesce ve ark., 2002). Hemogloblin ve miyogloblinde bu korunmuş bölge ortak olup B12.2 (İntronun B sarmalının 12. kodonunun 2. ve 3. nükleotidi arasında bulunduğunu simgelemektedir) ve G7.0 gen bölgeleridir (Şekil 3). Nörogloblin ve sitogloblinde ise E11.0 (Ngb) BC11.2 (Cygb) konumlarında fazladan 1 intron pozisyonuna ihtiyaç vardır (Pesce ve ark., 2002; Ergenoğlu, 2012).



Şekil 2. İnsan globinleri için olası evrim modeli; renkli olarak işaretlenen genler fonksiyonel protein ürünü oluşturan bölgelere, gri olarak işaretlenen bölgeler ise ifade edilmeyen genleri temsil etmektedir (Pesce ve ark.,2002).

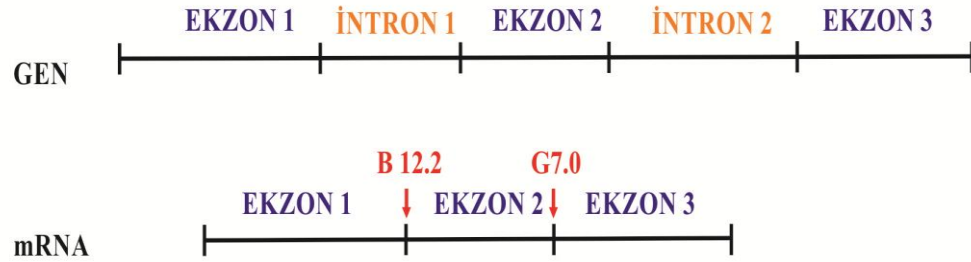
1.4.2. Miyogloblin ve Hemogloblin

Miyogloblin

Genellikle kas hücrelerinde ifade edilen miyogloblin proteini, 150-153 amino asit uzunluğunda ve demir (II) protoporfirin IX (hem-b) kompleksinden oluşur. Sekonder yapısı incelendiğinde sekiz tane α sarmaldan meydana geldiği saptanmıştır. Bu sarmallar A (1. sarmal) dan H (8. sarmal) a kadar harflendirme yapılarak isimlendirilmiştir. A, B ve E sarmal yapıları, hem-b grubunu distal (uzak); F,G ve H α -sarmalları ise hem-b grubunu proksimal (yakın) tarafından çevreler. Bu yapı, tipik globin yapısını oluşturmakta ve 3-3 α -sarmal sandviç modeli olarak adlandırılmaktadır (Kendrew ve ark., 1963; Millikan ve ark., 1939).

Polipeptit zincirindeki hidrofobik grupların oluşturduğu bölgede yer alan hem-b grubunun demir atomu, proteinin F8 konumundaki Histidin aminoasitinin azot atomuyla koordinasyon bağı oluştururken, CD1 fenilalanin birimi, hem-b grubunun konumunu sterik olarak kısıtlayarak yapıyı sağlamlaştırır (Hankeln ve ark., 2005). Miyogloblinin hem-b grubu ligand olmadan beş koordinasyon bağı yapar ve oluşan

bu yapı penta-form olarak adlandırılır. Oksijen bağlanmış durumda ise altı koordinasyon bağı yapar ve oksi-form olarak adlandırılır (Hankeln ve ark., 2005). Oksijen zayıf alan ligandı olduğu için miyoglobinin oksijen bağlaması ancak demirin 2^+ değerlikli olduğu halde gerçekleşir. Demir atomunun çevresindeki grupların elektron verme isteği, oksijenin demir ile $+3$ değerliliğe yükseltgenmeden etkileşmesini sağlar (Wittenberg ve ark., 2003). Miyoglobin proteininin en yaygın özelliği oksijen depolamasıdır. Bunun yanı sıra, bu protein oksijen difüzyonuna yardımcı olup hücre içi oksijen yoğunluğunun sabit ve homojen kalmasını sağlar (Poole ve ark., 2000). Proteinin bilinen bir diğer fonksiyonu da $(NO)^-$ yu $(NO_3)^-$ e yükseltgeyerek detoksifiye etmesidir (Perutz, 1979).

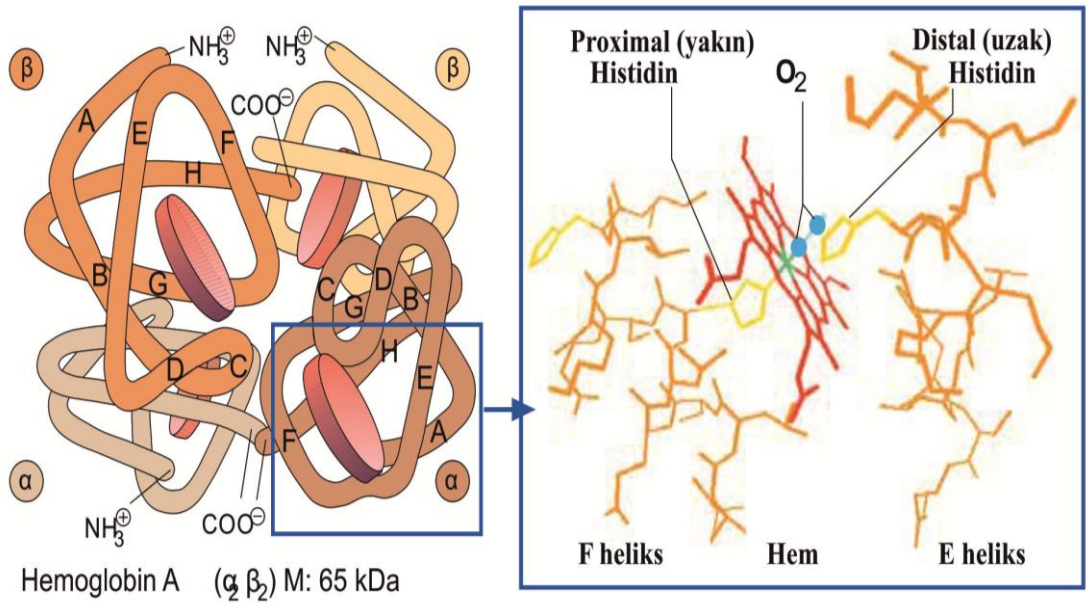


Şekil 3. Hemoglobin ve miyoglobin kesim bölgelerinin şematik gösterimi. B12.2, intronun B sarmalının 12. kodonunun 2. ve 3. nükleotidi arasında bulunduğu kısım; G7.0 ise G sarmalının 7. kodonudur.

Hemoglobin

Hemoglobin, omurgalıların çoğunda oksijenin akciğerden dokulara taşınmasında görevli olan globüler yapıdaki globin ailesi proteinlerinin bir üyesidir (Şekil 4). İnsanda ve diğer omurgalılarda kırmızı kan hücresinde yer alır. α heliks (141 a.a.) ve β tabakalı (146 a.a.) olmak üzere iki çeşit alt birimden oluşan tetramer yapıya sahiptir. Alt birimlerinin her biri miyoglobin benzeri tipik globin yapısı sergiler ve her biri hidrofobik cebinde hem-b grubu içerir (Perutz, 1979). Hemoglobinin tetramer yapısı ona allosterik aktivasyon yetisi kazandırır. Bir oksijen molekülü hemoglobine bağlandığı zaman, $\alpha\beta$ alt ünite`de 15^0 `lik bir konformasyonel değişiklik meydana gelir. Fe^{2+} nin son yörüngedeki elektronları yüksek spinli durumdan düşük spinli duruma geçerek oksihemoglobinin kararlı olmasını sağlar. Oksihemoglobin`den O_2 `nin salınmasında ise, özellikle β zincirde yer alan Lizin82-Histidin2-Histidin143

gibi bazik amino asitlerle etkileşen 2,3-bifosfoglisarat rol oynar. Diğer taraftan, moleküler oksijen hemoglobine bağlandığı zaman demir (II) iyonu protoporfirin grubundaki dört azot atomu arasındaki boşluğa yerleşir ve hem-b grubu tamamen düzlemsel hale gelir. Yapıda meydana gelen bu değişim, diğer alt birimlerin oksijene olan ilgisini önemli ölçüde artıracak bir dizi konformasyonel değişikliğe neden olur. Bu nedenden dolayı miyoglobinin substrat doygunluk eğrisi Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk gösterirken hemoglobin, bu eşitliğe uymaz ve sigmoidal grafik sergiler. Bu farklılık, hemoglobin ile dokulara taşınan oksijenin miyoglobine aktarılmasına yardımcı olur. Ayrıca, kanda CO₂ seviyesinin artması kan pH'ını düşürür ve hemoglobin molekülünün konformasyonunda oksijen bağlama affinitesini azaltacak değişmelere sebep olur (Perutz, 1979).



Şekil 4. Klasik bir globin protein ünitesinin globüler yapısı ve hem grubunun bazı özgül amino asitler ile etkileşimi (Koolman ve Roehm, 2012` den modifiye edilmiştir).

1.4.3. Nöroglobin ve Sitogloblin

Nöroglobin ve sitogloblin, omurgalı globin ailesinin en geç keşfedilmiş iki üyesidir. İlk olarak, sinir hücrelerinde ifadelenen nöroglobin (Burmester ve ark., 2000); hemen ardından da neredeyse bütün memelidokularında ifadelenen sitogloblin keşfedilmiştir (Burmester ve ark., 2002). Nöroglobin ve sitogloblin amino asit dizisi %20 ila 30

civarında benzerlik göstermektedir ve tipik 8 α -sarmal yapıdan oluşan monomerik miyogloblin yapısına sahiptir. Fakat, bu 2 farklı proteinin adaptasyonlar açısından farklılaştığı düşünülmektedir (Burmester ve ark., 2000, 2002). Sitogloblinin dizi analizlerinde N- (amino) ve C- (karboksil) terminal bölgelerinin ikisinde de miyogloblin proteinine göre 20 aminoasitlik uzama saptanmıştır (Burmester ve ark., 2002). Proteinin N- terminalindeki uzama gen motifi duplikasyonlarıyla açıklanırken, balık türleri hariç her türde gözlenen C-terminalindeki uzama, memelilerin evrim süreciyle ilişkilendirilmektedir (Hankeln ve ark., 2005).

Nörogloblin ve sitogloblinin omurgalı globlinlerinden en belirgin farkı hegziformda bulunabilmesidir. Ligandın olmadığı durumlarda hem-b distal kısımdaki E7 histidin birimi demir atomunun altıncı koordinasyonu ile etkileşime girerek hegziform oluşturur. Bu sebeple oksijen dışındaki diğer olası ligandlar bağlanmak için distal histidin ile yarışma içerisindedir (Trent III ve Hargrove, 2002). Hegza koordinasyon sergileyen globlin yapıları bakteri, bitki ve bazı omurgasızlarda belirlenmiştir (Vinogradov, 1985). Hegzaformun bu denli geniş taksonomik kategoride bulunması korunmuş ve fonksiyonel olduğuna işaret etmektedir. Tam olarak aydınlatılmış olmasa da, hegziformun fonksiyonununoglobine daha yüksek afiniteye bağlanabilen CO ve NO gibi canlı için toksik etkili moleküllerin bağlanmasını engellemek olabileceği düşünülmektedir.

1.4.4. Omurgasızlarda Globinler

Globinler omurgasızlarda, bitkilerde, yumuşakçalarda, bakterilerde olmak üzere geniş bir canlı grubunda teşhis edilmiştir (Weber, 1980; Ergenoğlu, 2012). Omurgasızlarda tanımlanan globlinler buldukları doku, görev ve işlev bakımından geniş çeşitlilik göstermektedir. Bu da canlıya, farklı yaşam stratejileri geliştirmede ve yaşadığı ortama adapte olmada avantaj sağlamaktadır (Weber ve ark., 1980). Omurgasız globlinleri, Weber ve Vinogradov (2001) tarafından yapısal olarak beş gruba ayrılmıştır. Bunlar; tek zincirli ve tek aktif bölgesi monomerik globlinler, (hücre içi veya hücre dışı), dimerik ve tetramerik globlinler, molekül ağırlığı 200-800 kDa arasında olan büyük çok alt birimli globlinler, bir veya daha fazla zincirden oluşan, çok sayıda alt birime ve aktif bölgeye sahip globlinler ve hegzagonal, çift katmanlı, hücre dışı dev globlinler olarak sınıflandırılmıştır (Weber ve ark., 2001).

1.4.5. Böceklerde Globinler

Oksijenli solunum yapan böceklerde, solunumun trake adı verilen gelişmiş kanallar sistemi sayesinde gerçekleştirildiği ve bu kanalların hücre mitokondrilerine kadar uzandığı kanıtlanmıştır (Resh ve Carde., 2003). Trake solunum sisteminin yüksek difüzyon hızı ve geniş kapasitesi, iri yapılı bir böceğin bile oksijen ihtiyacını rahatlıkla karşılayabilecek yeterlilikte olduğundan herhangi bir şekilde solunumda görev alan oksijen taşıyan bir proteine ihtiyaç duymayacağı düşünülmektedir. *Chironomid* larvalarıyla başlayan çalışmalar böceklerde de ifade edilen fonksiyonel, canlının yaşadığı ortama adaptasyonunu artıran bir globin proteininin varlığını göstermiştir (Lee ve ark., 2006).

1.5. Böceklerde Globin Geninin Varlığı Üzerine Araştırmalar

Son yıllarda yapılan *globin* geni karakterizasyonu çalışmaları, böceklerde de *globin* geninin fonksiyonel olarak var olduğunu işaret etmektedir (Hankeln ve ark., 2006; Gleixner ve ark., 2008; Lee ve ark., 2006; Kawaoka ve ark., 2009). *A. mellifera* türünde yapılan *globin* geni karakterizasyonu çalışmaları sonucu genin dizisi elde edilmiş, dokulara özgü ekspresyon profili çıkarılmıştır (Hankeln ve ark., 2006). Bu çalışmada globin geninin 171 amino asitlik bir diziyeye sahip olduğu ve sinyal dizisi içermediği saptanmıştır (Hankeln ve ark., 2006). Bu bulgu miyogloblin ile *A. mellifera*'nın globin geninin benzer uzunluğa sahip sitozolde lokalize bir molekül olduğuna işaret etmektedir. Bu bilgiler ışığında dolaşımında serbest olarak hareket eden bir molekül olarak değil, sitogloblin benzeri bir protein olabileceği öngörülmüştür. Genin ifadenin düzeyi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda trake sistemi, testisler ve malpigi tüpünde *globin* geninin diğer dokulara oranla daha fazla ifade edildiği saptanmıştır (Hankeln ve ark., 2006). Bu dokuların sıcaklığın düzenlenmesinde fonksiyonel olan ya da sıcaklıktan doğrudan etkilenen dokular olması, ilgili gen ürününün sıcaklığın düzenlenmesinde görev aldığı hipotezini desteklemektedir (Hankeln ve ark., 2006).

Bombyx mori (Lepidoptera) ve *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera) türlerinde yapılan globin geni karakterizasyonu ve gen ifade düzeylerinin saptanmasına yönelik

araştırmalarda *A. mellifera* türünde yürütölen çalışma ile benzerlik sergilemektedir (Kawaoka ve ark., 2009). Bu benzerlik, genin her iki türde de 170 amino asitlik bir transkripti kodlamasından kaynaklanmaktadır. Genin daha fazla ifade edildiği bölgelerin trake sistemi, malpigi tüpü, yağ doku ve deri olduğu da belirlenmiştir (Kawaoka ve ark., 2009). Bu dokuların doğrudan ve/veya dolaylı olarak vücut sıcaklığının düzenlenmesinde rol aldığı düşünöldüğünde, *globin* gen ürününün termoregölasyonda görevli olabileceği savı güçlenmektedir (Kawaoka ve ark., 2009). Diğer taraftan *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) türünde farklı sıcaklıklara sahip ortamlarda ve hipoksi (oksijence az) ya da hiperoksi (oksijence bol) stres koşullarında globin geninin ifade edilme oranları karşılaştırılmıştır (Lee ve ark., 2006). Bu karşılaştırma sonucunda transkript miktarının artan sıcaklığa bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, globin proteininin sıcaklığın düzenlenmesinde rol aldığı görüşünü kuvvetlendirmektedir. Aynı zamanda hipoksi ortamdan hiperoksi ortama geçerken transkript miktarının da arttığı gözlenmiştir (Lee ve ark., 2006). *Chironomus tentans* türünde yürütölen bir araştırma sonucunda da globin proteininin tıpkı miyoglobinde olduğu gibi, oksijen depolamada görev alabileceği belirtilmiştir (Lee ve ark., 2006). Benzer bir çalışma *Drosophila melanogaster* (Diptera) türünde globin gen ifadesi ile oksijen miktarını ilişkilendirebilmek için yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda da, gen ürününün oksijenin depolanmasında görevli olduğuna işaret eden bulgulara rastlanmıştır (Gleixner ve ark., 2008). Ayrıca *laktat dehidrojenaz (LDH)* geni ile karşılaştırmalı ifade çalışmaları, globin proteininin zararlı reaktif oksijen türevlerinin detoksifiye edilmesinde görevli olabileceğini göstermektedir (Gleixner ve ark., 2006).

1.6. Hymenoptera

Hymenoptera (zar kanatlılar) (Linnaeus, 1758), böcek takımları arasında en geniş çeşitliliğe sahip takımlardan biridir ve yüksek morfolojik ve genetik çeşitlilik barındırmaktadır. Bu takım; testereli arıları, yaban arılarını, arıları ve karıncaları kapsamaktadır. Bu takımın 150.000'i aşkın türü saptanmış ve tanımlanmıştır. Dişi bireyleri tipik olarak konaklarına yumurtalarını bırakabilmek için özelleşmiş iğneli ovipozitörlere sahiptir. Larvaları ise tırtıl benzeri larval evreyi geçirdikten sonra inaktif pupa evresine girer ve sonrasında olgunlaşır. Bu tür gelişim, tam başkalaşım olarak adlandırılır ve tam başkalaşım geçiren böceklere de holometabol böcekler denir.

Evrimi: Hymenoptera takımı Triyasik Dönemde, yaklaşık 200 milyon yıl önce ortaya çıkmıştır ve en eski fosil kayıt Xyelidae familyasına aittir. Sosyal Hymenoptera`lar ise Kretase çağı boyunca ortaya çıkmıştır (Hoell ve ark., 1998).

Anatomisi: Hymenopteran böceklerin vücut büyüklüğü çok küçükten büyüğe çeşitlilik sergilemektedir ve genellikle 2 kanat takımı içermektedir. Ağız parçaları, oldukça gelişmiş mandibullara sahiptir ve çiğnemeye adapte olmuştur. Çoğu türü, nektar gibi sıvıların içilmesini kolaylaştıran daha gelişmiş ağız parçalarına sahiptir. Türleri, tipik olarak 3 tane basit, büyük ve birleşik göz içerir. Kanatların ön kenarı `hamuli` adı verilen çengelli kıllara sahiptir. Bu çengelli kıllar, bir önceki kanata tutunur ve kanatların bir arada durmasını sağlar. Diğer böceklerle karşılaştırıldığında, hymenopteran böceklerin özellikle küçük türlerinin kanatları, daha az sayıda damar içerir.

Daha atasal olan Hymenopteralarda, ovipozitör bıçak benzeridir ve bitki dokularını kesmek üzere evrimleşmiştir. Fakat Hymenoptera`ların büyük çoğunluğunda ovipozitör, delme işlemi için özelleşmiştir. Bazı türlerinde ise ovipozitör iğne şeklindedir ve bu tip ovipozitör tipik olarak hareketsiz avlanan türlerde bulunur ve bazı arılarda ise ovipozitör koruma amaçlı bulunmaktadır (Hoell ve ark., 1998).

Nispeten atasal Hymenoptera`ların larvaları tırtıl görünüşlüdür ve gerçek tırtıllara (Lepidoptera) benzer olarak yaprakla beslenirler. Geniş, çiğneyici mandibullara, toraktik uzuvlara ve çoğu durumda abdominal ön ayaklara sahiptir. Fakat, tırtıllardan farklı olarak, ön ayakları kavrayıcı yapıya sahip değildir ve antenleri yalnızca kalıntı halinde bulunmaktadır. Diğer Hymenoptera`ların larvaları ise kurtçuklara daha fazla benzemektedir ve daha korunmuş bir çevrede yaşamaya adapte olmuştur. Bu korunmuş ortam konak organizmanın vücudu, larva oluşumu için ergin birey tarafından kuluçkaya bırakılmış bir hücre olabilir. Bu tür larvalar uzuv içermeyen yumuşak vücutlara sahiptir.

Beslenme: Hymenoptera`nın farklı türleri geniş çeşitlilikte beslenme alışkanlığı sergilemektedir. Daha primitif formları tipik olarak herbivordur ve yaprakla veya çam iğnesiyle beslenirler. Arılar nektar ve polenle beslenirken, iğneli arılar predatördür ve larvalarını hareketsiz besinler ile beslerler. Türlerden bazıları ise parazitoittir. Erişkinler paralize olmuş konağın içerisine yumurtasını enjekte eder. Bazı türleri konak olarak bir diğer parazitoit böceği kullanır ve bunlara

hiperparazitoit denir. Gal oluşturan veya diğer böcekler yuvalanan çoğu hymenopteran böcekler parazitoit ve herbivor formlara benzer. Besinlerini çalarlar ve nihayetinde konaklarını öldürür ve yerler (Hoell ve ark., 1998).



Şekil 5. Hymenopteran böceklerden bazıları. Soldan sağa sırayla *Rhyssa persuasoria* (Ichneumonidae), *Agapostemon virescens* (Halictidae), *Rhogogaster viridis* (Tenthredinoidea) türü örnekleri verilmiştir.

1.6.1. *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apocrita: Apidea)

Çarpıcı renklere sahip olan ve oldukça iri yapılı *Bombus* türleri, Palearktik, Nearktik, Oriental ve Neotropik bölgelerde sıklıkla rastlanan canlılardır (Cameron ve Williams, 2003). Oldukça gelişmiş kimyasal ve fiziksel termoregülasyon mekanizmaları sayesinde çok düşük sıcaklıklarda vücut ısılarının ortalamasının üzerinde tutarak hayatta kalabilirler. Bu da *Bombus* türlerine diğer arılardan farklı olarak ekstrem sıcaklıklarda maksimum aktivite yetisi sağlar (Heinrich, 1979).

Sarı- kuyruklu *Bombus*lar (buff-tailed bumblebee) veya büyük dünya *Bombus*ları (large-earth bumblebee) olarak da bilinen *Bombus terrestris* türü Avrupa`da bulunan *Bombus* türlerinin en yaygın olanlarından biridir (<http://www.bumblebee.org>). Kraliçe *Bombus terrestris*`ler 2.0- 2.7 cm büyüklüğünde iken, işçiler 1.5- 2.0 cm büyüklüğündedir. Bu arılar kovanlarını 13 km öteden bile bulabilirler. Nisan 2014 ayında Beytepe/Ankara lokalitesinde elma ağacı üzerinde çekilmiş *B.terrestris* kraliçe arısının fotoğrafı Şekil 6` da verilmiştir:



Şekil 6. Nisan 2014 ayında Beytepe/Ankara lokalitesinde elma ağacı üzerinde çekilmiş *B.terrestris* kraliçe arısının fotoğrafı.

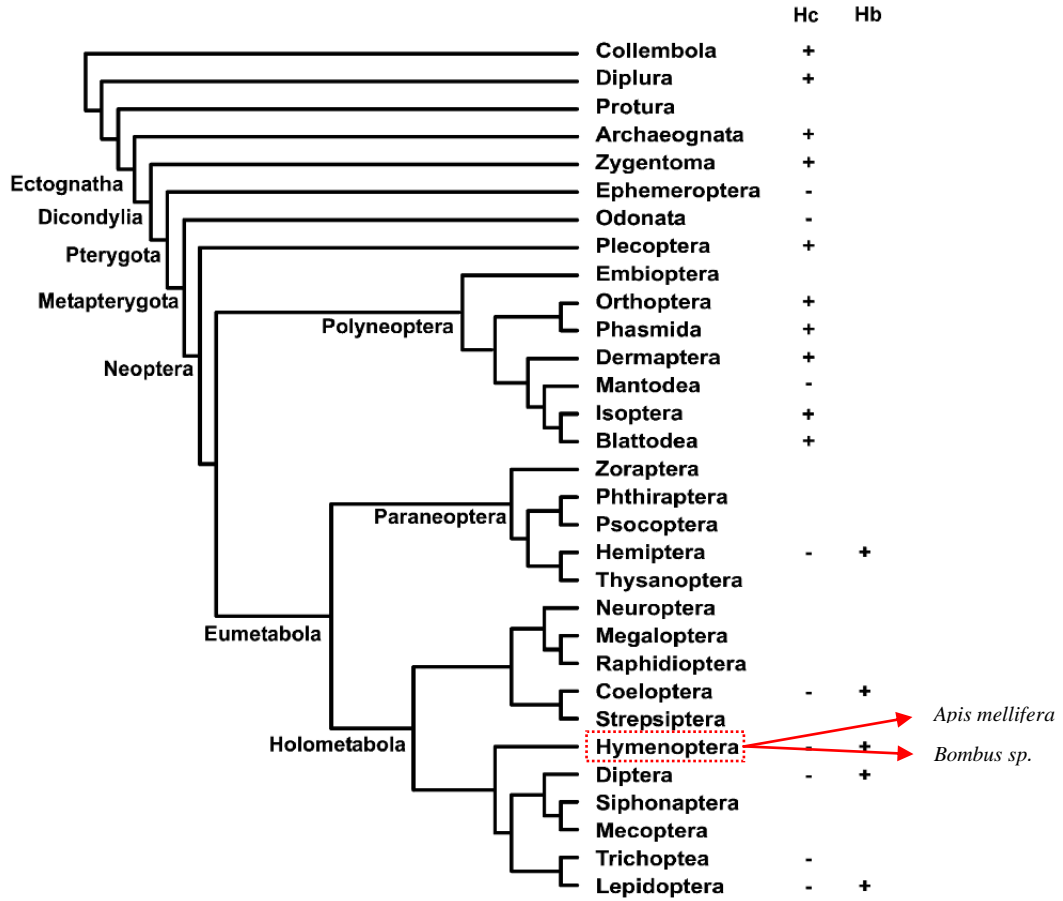
Görülen ilk *B. terrestris*'ler genelde baharda nektar toplamak için ortaya çıkan kraliçe arılardır. Kraliçe arı nektar bulur bulmaz kovan için yer aramaya başlar. Kovanı bulup nektar ve polenlerle oluşturduktan sonra, bir miktar yumurta bırakır. Sonrasında gelişen larvaları nektar ve polen ile besler ve larvalar pupa evresine girerler. Yaklaşık 2 hafta sonra ilk işçi arılar oluşur. İşçi arılar kraliçe arıdan oldukça küçüktür ve sadece birkaç hafta yaşayabilir. Yazın sonlarına doğru kraliçe arı, erkek arıları oluşturacak döllenmemiş yumurtalarını bırakır. Bazı yumurtalar daha fazla besin elde edip yeni kraliçeleri oluşturabilir (Cheung, 2006).

1.7. *Bombus* cinsinin kullanılma nedeni

Bombus (Hymenoptera: Apidae: Bombinae), Avrasya, Kuzey Amerika, Kuzey Afrika ve Güney Amerika olmak üzere yüksek ve düşük rakımlı habitatlarda yaşamını sürdürebilen geniş yayılış gösteren bir cinstir (Williams, 2008). Serin, ılıman ve soğuk habitatlarda hayatta kalmayı başarmış, hızlı ve uzun süre uçabilen türlere sahiptir. Yükselti ve sıcaklık açısından oldukça farklı ekosistemlerde hayatta kalabilirler ve enerji kullanımı açısından zengin olduklarına işaret eden iyi uçuş özelliğine sahiptirler. Bu da *Bombus* cinsi türlerinde farklı ve gelişmiş termoregülasyon mekanizmalarının olabileceğine işaret etmektedir. Böceklerde tanımlanan fonksiyonel *globin* geninin oksijen depolama özelliğinden yola çıkılacak

olursa, oksijen miktarlarının farklı olduğu yüksek ve düşük rakımlı ve sıcaklığın farklı olduğu b6lgelerde yaşayabilmeleri bu hipotezi g6çlendirmektedir.

A.mellifera ile aynı alt familyada bulunan ve bu t6re benzer biçimde hızlı ve uzun s6re uçabilme yeteneğine sahip *Bombus* t6rleri için de uzun s6reli uçma davranışı, bu esnada oluşan sıcaklık artışını tolere edebilme gereksinimi doğurmaktadır. Bu varsayımdan yola çıkıldığında, bu cinsin de, *A.mellifera* da bulunan globin genine benzer fonksiyona sahip gene veya gen kalıntısına sahip olması gerektiği d6ř6n6lebilir. Ayrıca *Bombus* cinsinin serin, ılıman ve soğuk b6lgelerde yaşayabilmesi de sıcaklığı tolere etme yeteneklerinin y6ksek olduğunu g6stermektedir. Bu da bu cinste varsayılan globin proteininin saptanabilme ihtimalini arttırmaktadır. Oksijen miktarının farklı olduğu y6ksek ve alçak kesimlerde yaşayabiliyor olması, oksijen depolamada g6revli yapılarının olduğuna işaret etmektedir. Literat6rdeki fonksiyonel *globin* geninin bu s6relerde rol alıyor olması, *Bombus* cinsinde de bu genin fonksiyonel olabileceğine işaret etmektedir. T6m bunlara ek olarak, *Bombus* cinsinin filogenetik açıdan akraba olduğu t6rlerde fonksiyonel bir *globin* geninin varlığı iyi uçucu b6cek t6r6 için de fonksiyonel olabileceği fikrini g6çlendirmektedir (şekil 7).



Şekil 7. Hennig (1969) ve Wheeler ve ark. (2001) tarafından inşa edilen böcek filogenetik ağacı üzerinde böcek takımlarının solunum proteinlerinin dağılımı. Hc kısaltması hemosiyanin, Hb kısaltması ise hemoglobin ifadelerini karşılamaktadır. İlgili türlerde bu protein ve/veya protein kalıntısının bulunması durumu ise + ve - işaretleriyle gösterilmiştir.

Böcek genomunda bulunan ve fonksiyonel olduğu saptanan *globin* geninin işlevsel olduğunu düşündüren en önemli bulgu, proteinde veya protein öncülünde bulunan E7 ve F8 pozisyonundaki histidin amino asidinin varlığı olmuştur. Bu amino asitler oksijenin geri dönüşümlü bağlanmasında ve oksijen dışında diğer moleküllerin bağlanmasının engellenmesinde önemli role sahiplerdir (Şekil 8).

Türler	A12	B10	CD1	E7	E10	E11	F8
<i>İnsanMb</i>	Trp	Leu	Phe	His	Thr	Val	His
<i>ChironomusHb</i>	Trp/Phe/Tyr	Leu	Phe	His	Arg	Ile/Val	His
<i>G. intestinalis Hb</i>	Trp	Leu	Phe	His	Arg	Ile	His
<i>Drosophila glob1</i>	Trp	Leu	Phe	His	Arg	Ile	His
<i>Drosophila glob2</i>	Trp	Phe	Phe	His	Ala	Met	His
<i>Drosophila glob3</i>	Trp	Phe	Phe	His	Arg	Phe	His
<i>A. mellifera glob1</i>	Trp	Met	Phe	His	Gly	Val	His
<i>A. gambiae glob1</i>	Trp	Phe	Phe	His	Asn	Leu	His
<i>A. gambiae glob2</i>	Trp	Leu	Phe	Gln	His	Ile	His
<i>A. aegypti glob1</i>	Trp	Phe	Phe	His	Asn	Leu	His
<i>A. aegypti glob2</i>	Trp	Met	Phe	His	Asn	Val	His
<i>A. pisum glob1</i>	Trp	Val	Phe	His	Lys	Val	His
<i>A. gossypii glob1</i>	Trp	Phe	Phe	His	Lys	Val	His
<i>D. cervinus glob1</i>	Trp	Leu	Phe	Gln	Ser	Val	His
<i>T. castaneum glob1</i>	Trp	Phe	Phe	His	Asn	Val	His
<i>B. mori glob1</i>	Trp	Leu	Phe	His	Asn	Ile	His
<i>G. morsitans glob1</i>	Trp	Leu	Phe	His	Arg	Ile	His

Şekil 8. Globin proteinin helikal yapısındaki korunmuş önemli pozisyonlardaki amino asitlerin gösterimi (Hankeln ve ark., 2006, Burmester, 2007).

Sıcaklık, böceklerin yayılışını, gelişimini, davranışını, hayatta kalmasını ve üreme başarısını etkileyen belki de en önemli çevresel faktördür (Andrewartha ve Birch, 1954; Gilbert ve Raworth, 1996; Bale ve ark., 2002). İklim değişikliğine dair ülkeler arası panelde (The Intergovernmental Panel on Climate Change) küresel sıcaklığın 1,8 ila 4 °C arasında arttığı kanısına varılmıştır. En büyük artış ise yüksek enlemlerde saptanmıştır (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC 2007). Sıcaklığın artmasında etçil veya otçul böceklerin ve bu böceklerin konaklarıyla ilişkilerinin etkilenmesi olasıdır (Jalali ve ark., 2010; Thomson ve ark., 2010). Önceki çalışmaların bazıları otçul böceklerde sıcaklığın etkisini ve onların bitkilerle etkileşimlerini açıklığa kavuşturmuştur (Steinbauer ve ark., 2004; Dalin, 2011). Bu çalışmalarla tanımlanmış genel duruma göre otçul beslenme ve gelişim oranları gerilemiş olsa bile optimal sıcaklık tekrar sağlandığında otçul beslenme ve gelişim oranları artmaktadır (Logan, 1988; Sandhu ve ark., 2010). Ayrıca yüksek sıcaklıkların ömür uzunluğunu, üreme başarısını, cinsiyet ayrımını, morfolojiyi ve davranışı etkilediği de saptanmıştır (Hance ve ark., 2007).

Tozlaştırıcı böcekler, çiçekli bitkilerin üremesinde ve meyve vermesinde merkezi rol oynamaktadır (Buchmann ve Nabhan, 1996; Accorti, 1990; Al-Ghzaw ve ark., 2003). Çoğu bitki türünde tozlaşma kalitesinin ve sayısının azalması tohum ve yavru verme (Steffan-Dewenter ve Tscharrntke, 1999; Velterop, 2000; Mustajärvi ve ark., 2001; Tomimatsu ve Ohara, 2002) sayısında azalmaya neden olmaktadır. Ekolojik işlev açısından doğal tozlaştırıcı olarak kullanılan *Bombus* cinsi canlılığın devamı ve çeşitliliği açısından kilit bir role sahiptir. Avustralya, Kanada, Amerika, Batı Avrupa ülkeleri başta olmak üzere bir çok ülke *Bombus* cinsinin tozlaştırmada görev alan türlerinin koruma altına almakta ve yaşam örüntüsünü belirleyerek canlılığın devamı için ekolojik sisteme destek sağlamayı amaçlamaktadır. Ekonomik ve ekolojik önemleri yüzünden bu canlılar araştırmaların odak noktası olmuştur. Sıcaklığın küresel olarak değişmesi, böcek yaşamını ve biyoçeşitliliğini tehdit eden çok önemli bir sorundur. Termoregölasyon mekanizmalarında görev alan moleküllerin tespiti ve bunun genetik temeli aydınlatılabilirse, bu tehlike karşısında böcekleri korumak ve biyoçeşitliliğini sürdürmek için yeni stratejiler izlenebilecektir.

2. MATERYAL-METOD

2.1. Örnek Toplanması ve Teşhisi

Bombus terrestris (Linnaeus, 1758) türüne ait bireyler, 2014 yılı Haziran-Ağustos ayları arasında, *Anchusa sp.* (Sığırdili), *Astragalus sp.* (Geven), *Carduus sp.* (Kengerotu), *Cirsium sp.*(Devedikeni) bitkileri başta olmak üzere özellikle çiçekli bitkilerin üzerinden toplanmış ve alkolde saklanmıştır. Deneysel aşamada kullanma yoğunluğunun fazla olması ve ilerideki RNA çalışmalarında taze örneğe ihtiyaç duyulması sebebi ile aynı zamanda ticari olarak koloni siparişi verilerek yeni *B. terrestris* bireyleri Koppert Biological Systems (Antalya) firmasından temin edilmiştir.

Örneklerin teşhisleri, Williams ve Özbek anahtarları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Williams ve ark., 2008; Özbek, 1983). Teşhis aşamasında ayrıca güncel bir yaklaşım olan barkodlama uygulamasına gidilmiştir. Bu amaçla morfolojik teşhisleri sonuçlandırılan örneklerin etiketlemeleri de tamamlandıktan sonra, her bir bireyin sağ arka bacağından *tuzla çöktürme* yöntemi (Miller ve ark., 1988) ve Qiagen firmasının DNeasy Blood & Tissue Kit ile aşağıdaki protokoller kullanılarak total genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sırasında protokollerin santrifüj hızı ve süresinde bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

2.2. DNA İzolasyonu

2.2.1. Tuzla Çöktürme (Salting Out) Yöntemiyle DNA İzolasyonu

1. Alkol içerisinde saklı örneklerden alkol uzaklaştırma işlemi 1 gün boyunca bekletilerek gerçekleştirilmiştir.
2. Daha sonra 1 gece -80 °C de bekletilmiştir.
3. Örnekler tamamen homojenize olacak şekilde ezilmiştir.
4. 300µL TNES (50mM Tris, 400mM NaCl, 20mM EDTA, %0,5 SDS) ve 100 µg/mL proteinaz K ile 37 °C de 18 saat inkübe edilmiştir.

5. İnkübasyon sonrası örneklere 85µl 5M NaCl eklenip 15sn vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
6. 14.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir.
7. Üst faza 1 hacim %100 etanol eklenip 16.000 rpm de 6dk santrifüj edilmiştir.
8. Pelet % 70`lik etanolle yıkanıp 16.000 rpm de birkaç dakika santrifüj edilmiştir. Alkolü tamamen uzaklaştırılan örnekler 35µL 1^x TE (10mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM EDTA)`de çözülmüştür.

2.2.2. DNeasy Blood & Tissue Kit ile DNA İzolasyonu

Alkolde saklanan *B. terrestris* türüne ait bireylerden DNA izolasyonu total birey kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için total birey 1,5 mL`lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Örnek, dokularındaki alkolün tamamen uzaklaştırılması için suyla 3 kez yıkanmış ve oda sıcaklığında tamamen kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandığında ezme işleminin kolay gerçekleştirilebilmesi için örnekler -80°C`de bir gece inkübe edilmiştir.

DNA izolasyonu aşamasında, literatürde böcek dokularından DNA izolasyonu için sıklıkla karşılaşılan Qiagen firmasının DNeasy Blood & Tissue Kit adlı kiti kullanılmıştır. Bu yöntemin laboratuvar ortamında optimizasyonu, kit kapsamında önerilen protokole bazı modifikasyonlar gerçekleştirilerek sağlanmış olup, uygulama aşamaları ise sırasıyla aşağıdaki gibidir:

1. Doku örneklerine statik olmayan mikropestle yardımıyla mekanik ezme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşama, sonraki uygulamalarda başarı elde edilebilmesi açısından maksimum düzeyde öneme sahiptir. Bu nedenle ezme işlemi birey tamamen ezilene kadar devam ettirilmiştir.
2. Mekanik ezme gerçekleştirilen örnek, 250 µl ATL tamponu ile süspansiyon edilmiştir. Üzerine 30 µl proteinaz K eklenip, karıştırılmış ve dokunun tümüyle lizis olması amacıyla 56 °C`de gece boyu çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası homojenat oda sıcaklığına getirilmiştir. Karışım alt-üst edildikten sonrakarışıma 200 µL AL tamponu eklenmiş ve ardından tekrar karıştırma işlemi yapılmıştır. Homojenat üzerine 200 µl soğuk saf etanol eklenerek tekrar karıştırılmıştır.

4. Kısa spin yapılarak tüpün çeperlerinde kalan taneciklerin bir araya getirilmesi sağlanmıştır.
5. Bu karışım DNeasy Mini spin kolon içine aktarılıp ardından 10.000 rpm`de 2 dk santrifüj edilmiştir.
6. DNeasy Mini spin kolonun altında toplanan sıvı uzaklaştırılmış ve kolona 500  L AW1 yıkama tamponu eklenerek 10.000 rpm`de 2 dk santrifüj edilmiştir. Alt kısımda toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır.
7. DNeasy Mini spin kolon bu kez 500  L AW2 tamponu ile yıkanmış ve maksimum hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Alt kısımda toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır.
8. DNeasy Mini spin kolon 2 mL`lik yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilip kolonda kalan alkolün tamamen uzaklaştırılması için maksimum hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Alt kısımda toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır.
9. DNA`nın kolondan elüsyonu amacıyla membran üzerine önceden 65 C`ye getirilmiş 50  L AE tamponu dikkatli bir Şekilde kolonun tam ortasına eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dk inkübasyon sonrası 10.000 rpm`de 3 dk santrifüj edilmiştir.
10. 9. basamak 3 kez daha tekrarlanmıştır. Böylelikle yaklaşık 200  L hacimli total genomik DNA elde edilmiştir.

2.2.3. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

DNA izolasyonu sonrasında örnekler, olası protein kontaminasyonundan arındırılmak için fenol-kloroform ekstraksiyonuyla saflaştırılmıştır. İzlenen protokol aşağıda verilmiştir:

1. Oda sıcaklığına getirilen DNA  rneklerinin hacmi 1^x TE (pH7.5) ile 300  L`ye tamamlanmıştır.
2.  zerine eşit hacimde fenol eklenmiştir. Karışım 30 sn dikkatli bir Şekilde alt üst edilmiş ve 3-5 dk oda sıcaklığında bekletilip 11.000 rpm` de 3 dk santrifüj edilmiştir.
3. Üst faz yeni bir tüpe aktarılıp hacmi tahmin edilmiştir.Eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklenip 30 sn dikkatli bir Şekilde alt üst edilmiş ve 3-5 dk oda sıcaklığındabekletilip 11.000 rpm` de 3 dk santrifüj edilmiştir.

4. Üst faz yeni bir tüpe aktarılıp hacmi tahmin edilmiştir.Eşit hacimde kloroform: izoamil alkol (24:1) eklenip karışım 30 sn dikkatli bir şekilde alt üst edilmiş ve 3-5 dk oda sıcaklığında bekletilip 11.000 rpm` de 3 dk santrifüj edilmiştir.
5. Üst faz yeni bir tüpe aktarılıp hacmi tahmin edilmiştir.Karışıma, hacminin 0,2 katı kadar 10 M Amonyum asetat (pH 5.2) ve hacminin 2 katı kadar da soğuk saf etanol eklenmiştir.
6. Karışım 10-15 dk oda sıcaklığında inkübe edilip 16.000 rpm` de 5 dk santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonrası pelet gözlenmelidir. Eğer pelet görülmezse santrifüj süresi veya hızı arttırılabilir. Santrifüj sonrası pelet görülerek üst faz uzaklaştırılmıştır.
8. Peletin 1000 µL %70`lik etanolde yıkanıp oda sıcaklığında tamamen kuruması sağlanmıştır.
9. Pelet 100 µL 1^xTE (pH8.0)` de çözülmüştür.
10. Saflaştırılan genomik DNA örnekleri saklanmak üzere -20 °C` ye kaldırılmıştır. PZR uygulamaları aşamasında ihtiyaç duyulursa mevcut genomik DNA`nın çözünmesini kolaylaştırmak amacıyla DNA örnekleri sıcak-soğuk şokuna (65 °C` de 10 dk ve -20 °C` de 20 dk) maruz bırakılabilir.

İzolasyonu ve saflaştırma aşamaları tamamlanan örneklerin nanodrop ile konsantrasyon tayinleri ve saflık dereceleri hesaplanmıştır. Yeterli kantite ve kalitede izole edilen DNA örneklerinden evrensel *COI* barkod bölgesi kullanılarak PZR uygulamaları yürütülmüştür. Bu amaçla Hymenoptera evrensel *COI* barkod primerlerine (s1859→GGAACIGGATGAACWGT TTTAYCCICC ve a2590→GCT CCTATTGATARWACATARTGRA AATG) (Simon ve ark., 1994; Normark ve ark., 1999) başvurulmuştur. Her bir PZR reaksiyonu 50 µL son hacimde hazırlanmıştır. 50 µL`lik reaksiyon hacminin içeriğine 0,5 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas, Hanover, MD), 5 µl 10× reaksiyon tampon (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, %0,8 Nonidet P-40), primerlerin her birinden 10 pmol (Macrogen, Hollanda), 0,2 mM her bir dNTP (MBI Fermentas), 1,5 mM MgCl₂ ve 50-100 ng kalıp DNA eklenmiştir. PZR reaksiyonları bir DNA Biorad T100 termalcyclus aletinde aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir:

Başlangıç denatürasyonu	: 94 °C	2 dakika	
Denatürasyon	: 94 °C,	45 saniye	} 35 döngü
Primer bağlanma (Annealing)	: 57,5 °C	1 dakika	
Uzama- Sentez (Extension)	: 72 °C	30 saniye	
Son Uzama (Final Extension)	: 72 °C,	5 dakika	

Hymenoptera evrensel barkodlama primerleri ile yapılan standart PZR ürünleri dizilendikten sonra .ab1 uzantılı dizi sonuç dosyası CodonCode Aligner programında açılmış; ileri ve geri yönlü olmak üzere çift yönlü okutulan dizilerin anotasyonları yapılarak ham diziler işlenmiştir. İşlenen diziler FASTA formatında kaydedilerek saklanmıştır. İşlenen diziler *nucleotide BLAST* (Blast Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ve BOLD (Barcode of Life Database) (<http://www.boldsystems.org/>) veritabanlarında karşılaştırılmıştır.

2.3. Globin Geninin Varlığına Yönelik Nükleotid Düzeyinde Ön Analizler

2.3.1. Primer Tasarımı

Primer tasarımında en önemli nokta özgünlüktür ve özgünlük her bir primer çiftinin kalıp DNA`da hedef diziye kararlı olarak bağlanmasıyla sağlanır. Hedef bölgeye bağlanma açısından bakıldığında oligonükleotid uzunluğu arttıkça özgünlük de artar. Rastgele dizilmiş nükleotidler içeren DNA dizi bölgesinde şans eseri olarak bir başka dizinin tamamen eşleşme olasılığı aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$K=[g/2]^{G+C} \times [(1-g)/2]^{A+T}$$

K , ilgili dizide gerçekleşmesi beklenen eşleşme frekansı; g , ilgili bölgedeki göreceli G+C içeriği; G , C , A , T , oligonükleotid sayısıdır. Nükleotid sayısı N olan bir çift zincirli genom için, beklenen oligonükleotid-bölge eşleşmesini sağlayan nükleotid sayısı $n=2NK$ dir.

Oligonükleotid tasarımından önce, DNA veritabanlarından ilgilenilen dizinin sadece istenilen gene özgü olduğu ve istenmeyen bir gen bölgesinde ya da tekrarlı

elementlerin içinde olmadığı kontrol edilmelidir. Tüm bunlara ek olarak primer tasarlanırken dikkat edilmesi gereken diğer aşamalar ise Çizelge 1`de sunulmuştur.

Çizelge 1. Primer tasarım aşamasında ve amplifikasyonun etkinliğinde önemli olan özellikler

Özellik	Optimal dizayn
<i>Baz içeriği</i>	% G+C, % 40-60 arasında olmalıdır ve tüm bazlar primer boyunca homojen dağılmalıdır. Polipürin veya polipirimidin bölgeler ve dinükleotid tekrarlar içermemelidir.
<i>Uzunluk</i>	Primerlerin kalıpta eşleştiği bölge 18-25 nükleotid uzunluğunda olmalıdır. Forward ve reverse primer arasındaki uzunluk farkı 3 bç`yi geçmemelidir.
<i>Tekrarlı ve kendine eşleşen diziler</i>	İnversiyona uğramış tekrarlı diziler ya da kendine eşleşen diziler primerin içinde 3 bç`den uzun olmamalıdır. Bu tür diziler saç tokası yapısı oluşturmaya elverişlidir ve bu yapı PZR şartları boyunca stabil kalırsa oligonükleotidin kalıp DNA`ya bağlanmasını engelleyebilir.
<i>Primer çiftlerinin birbirleri ile eşleşmesi</i>	Bir primerin 3` terminal dizisi diğer primerin herhangi bir bölgesine bağlanmamalıdır. Primer çiftleri arasındaki zayıf etkileşimler bile hibrit formasyonu oluşumuna neden olur, bunun sonucunda ise primer dimerlerinin sentezi ve amplifikasyonu gerçekleşir. Eğer primer dimerleri PZR ürününden önce oluşursa kalıp DNA ile polimeraz, primer ve dNTP rekabetine girer dolayısıyla hedef DNA`nın amplifikasyonunu baskılar.
<i>Erime sıcaklıkları (T_m)</i>	Primer çiftleri için hesaplanan T _M değerleri arasındaki fark 5 °C`den fazla olmamalıdır. Amplifiye edilen ürünle primer çiftlerinin T _M değerleri arasındaki fark 10 °C`den fazla olmamalıdır. Bu özellik PZR uygulamasının her denatürasyon aşamasında ampikonun denatürasyonunu garantiler.
<i>3` uç</i>	Primerlerin 3` uçları kritik öneme sahiptir. Eğer mümkünse her iki primerde de 3` terminal baz G veya C olmalıdır. Fakat 3` ...NNCG veya ...NNGC olan primerler önerilmez. Çünkü terminal GC bazlarının yükselttiği ΔG değeri saç tokası yapıların veya primer dimerlerinin oluşumunu tetikleyebilir.

2.3.1.1. T_M (Meltin=Erime Sıcaklığı) Değerinin Hesaplanması

1) Wallare kuralı: Ampirik ve geleneksel hesaplama yöntemidir. Yüksek iyonik konsantrasyona sahip (1M NaCl) çözücülerde 15-20 nükleotid uzunluğundaki dizilerin T_M değerlerinin hesaplanmasında kullanılır.

$$T_M = 2(A+T) \times 4(G+C)$$

2) Baldino algoritması: İyonik konsantrasyonu 0,4 M veya daha az olan çözücülerde 14-70 nükleotidlik dizilerin T_M değerlerini hesaplamada kullanılır.

$$T_M = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log[K^+]) + 0,41(\%GC) - (650/n)$$

n , oligonükleotiddeki baz sayısıdır.

Bu eşitlik nükleotid dizisi ve sayısı bilinen ampikonların T_M değerlerinin hesaplanmasında da kullanılır. PZR amplifikasyonu standart koşullarda gerçekleşiyorsa, amplifiye edilmiş ürünün T_M değeri 85°C 'den büyük olmamalıdır. Böylece denatürasyon boyunca çift zincirin tamamen ayrılması garantilenmiş olur. Tipik olarak %50 G+C içeriğine sahip bir bölgenin denatürasyonu için 92°C yeterlidir.

3) En yakın komşu (Nearest-neighbour) yaklaşımı: Termodinamik eşitliklerini kullanarak T_M değerinin hesaplanmasıdır.

$$T_M = \Delta H \times [\Delta S - R \times \ln(\text{çift zincirli nükleik asitin başlangıç derişimi}/2)]^{-1}$$

Tasarlanan primer çiftlerinin uygunluğu, saç tokası yapısı, kendine bağlanma özellikleri ile erime ve bağlanma sıcaklıkları gibi primer özellikleri *OligoCalc* online programı (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) kullanılarak sınanmıştır. Ayrıca veri tabanında bu primer çiftlerinin homoloji sergilediği bölge ve/veya bölgelerin sınanması amacıyla da *nucleotide BLAST* veri tabanına (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) başvurulmuştur. Bu bilgiler eşliğinde *Apis mellifera globin* geni mRNA dizisi (NCBI erişim numarası NM_001077823.2) referans alınarak tasarlanan primer listesi Çizelge 2`de verilmiştir:

Çizelge 2. *Apis mellifera globin* geni mRNA dizisi (NCBI erişim numarası NM_001077823.2) referans alınarak tasarlanan primer listesi.

DNA DİZİSİ	%GC	T_M
<i>İleri yönlü primerler</i>		
GGATTTTCGTCATCGGACGA	53	51,1
ACAGGATCGATCAGGCGACAG	57	56,3
CCGAGAGGCAGAAGAAATTG	50	51,8
GACACTCCCTTGAACGAATTG	48	52,4
ACTTTACCGCTTTCATGGAC	45	49,7
ACGGTTTCAAGCTCATTG	44	45,8
TCATTGTGCCGGCGTAATTACC	50	54,8
TGCACGACCCGGGATTAATG	55	53,8
<i>Geri yönlü primerler</i>		
TCAAGAAGCGAAAACCTGA	42	46,8
TTCCCGAACATCATGTCCA	47	48,9
CGAACATCATGTCCAAAGT	42	46,8
ACTTCCGGCGTGTATTGC	56	50,3
TGGCGAAGAACTTCCAACA	47	48,9
GAACTTCCAACATTACTTC	37	44,6

2.3.2. PZR uygulamaları

Amplifikasyonlar Applied Biosystems ProFlex ve BioRad T100 olmak üzere iki farklı PZR aletinde gerçekleştirilmiştir. PZR uygulamalarına geçilmeden önce, liyofilize halde ticari olarak sentezletirilen primer çiftlerinin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu amaçla tüpler içerisindeki liyofilize primerlerin bir araya toplanması için kısa spin yapılmış ve alınan firma tarafından belirlenen miktarlarda 1^x TE (10 mM Tris-Cl, pH8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) tamponunda çözdürülmüştür. Sonrasında 100 pmol/μL konsantrasyona getirilen stok primerlerden PZR uygulamaları rutin kullanımı için 10 pmol/μL konsantrasyonda seyreltmeler yapılmıştır. Bunun yanı sıra 10 mM dNTP setlerinden PZR uygulamalarında rutin kullanım için 2,5 mM konsantrasyonda seyreltmeler yapılmış ve -80°C'de saklanmıştır. Stok ve seyreltilmiş kimyasalların hazırlanması dışında olası PZR inhibitörlerinden reaksiyonu korumak amacıyla kullanılacak enhansırlara da karar verilmiştir. Bunun için ise BSA (4 mg/mL), TritonX-100 (%1'lik), DMSO (%10'luk) ve Betain (1,2mM) enhansırlarının farklı bileşimlerinden ve konsantrasyonlarından kombinasyonları hazırlanmış ve mitokondriyal *COI* bölgesinde farklı PZR setlerinde denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Her bir PZR reaksiyonu sırasında primer bağlanma (annealing) sıcaklığı (T_A), her bir primerin T_M değerlerinden hareket edilerek hesaplanmıştır. Bu aşamada öncelikli olarak her bir primer çifti için tahmin edilen T_M değerlerinden ortalama 3-4°C altına inilmiş ve bu sıcaklığa $\pm 4^\circ\text{C}$ lik bir gradiyent uygulanmıştır.

Tüm standart PZR reaksiyonları 50 μl son hacimde hazırlanmıştır. 50 μl 'lik reaksiyon hacminin içeriğine 0,5 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Hanover, MD), 5 μl 10^x reaksiyon tamponu (100 mMTris-HCl, pH 8,8; 500 mMKCl, %0,8 Nonidet P-40), primer çiftlerinin her birinden 10 pmol (Macrogen), 0,25 mM her bir dNTP (MBI Fermentas), 3 mM MgCl_2 , 1,2 M betain, %1'lik TritonX-100 ve 100-500 ng kalıp DNA eklenmiştir. Standart PZR uygulamaları aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir:

Başlangıç denatürasyonu:	94 °C`de 3 dk	} 35 döngü
Denatürasyon:	94 °C`de 45 sn	
Bağlanma:	T_A `da 30 sn	
Uzama:	72 °C`de 45 sn	
Son uzama:	72 °C`de 10 dk	
Son sıcaklık:	4 °C	

Her bir PZR %0,8`lik agaroz jel ortamında DNA belirteçleri eşliğinde görüntülenmiştir. Sonuç alınamayan PZR`lar için çeşitli optimizasyon denemeleri yürütülmüştür. Bunun için uygulanan tekniklerden birkaçı verilmiştir: *Touchdown* PZR uygulaması, MgCl_2 gradiyenti, kullanılan enhansırların değiştirilmesi, primerkonsantrasyonlarının değiştirilmesi, kalıp DNA gradiyenti, denatürasyon süresinin kısaltılması, denatürasyon sıcaklığının düşürülmesi, bağlanma süresinin arttırılması, uzama sıcaklığının düşürülmesi gibi modifikasyonlar yapılarak PZR reaksiyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir.

PZR ürünleri için iki yönlü dizileme, ileri ve geri yönlü primerler ile hizmet alımı kapsamında Macrogen firmasına yaptırılmıştır. Gelen dizilerin CodonCode Aligner programında anotasyonları yapılmış ve ham diziler işlenerek FASTA formatına dönüştürülmüştür. Daha sonra veriler *nucleotide BLAST* veri tabanında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) karşılaştırılmıştır. GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanında bulunan diğer *globin* geni mRNA dizileri ile MEGA v 5.2 (Tamura ve

ark., 2012) programında hizalamaları yapılarak homoloji gösterip göstermediğine bakılmıştır.

2.4. Globin Geninin Varlığına Yönelik İfadeleme Düzeyinde Analizler

2.4.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için QiagenRNeasy Mini Kit kullanılmıştır. Örnekler arazi çalışmasında toplanır toplanmaz RNA Later solüsyonuna alınmış olup -20 °C ve -80 °C` de saklanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce RNA izolasyonunda kullanılacak laboratuvar ekipmanları otoklavlanıp, UV Crosslinker` da sterilize edilmiştir. Sterilize edilen ekipman ayrıca DEPC (Dietilpirokarbonat) içeren suyla yıkanmış ve olası RNaz kontaminasyonu engellenmiştir. Daha sonra örnekler buz üzerinde ezilmiş ve dokuların fiziksel olarak tamamen parçalanması sağlanmıştır. Dokulardan RNA izolasyonu için uygulanan protokol şu şekildedir:

1. 30mg`dan fazla olmayacak şekilde doku tartılmıştır ve üzerine eşit hacimde RLT tamponu (liziz) eklenmiştir.
2. Daha sonra lizat hazırlanmıştır. Bu amaçla doku yüksek oranda RNaz içerdiği için RLT tamponun içerisine RNazinaktivasyonunu sağlamak için 10µL β-merkaptoetanol ve 20µL 2M`lık DTT eklenmiştir. Lizat maksimum hızda(16.000 rpm) santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
3. Lizatın hacmi kadar %70`lik etanol eklenmiş ve pipet yardımı ile karıştırılmıştır.
4. Etanol içeren lizat, kolonlu tüplere alınıp 15 sn 10.000 rpm`de santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki sıvı atılmıştır.
5. Bu basamakta DNaz I muamelesi yapılmıştır.
6. 350 µL RW1 tamponu eklenip 15 sn 10.000 rpm`de santrifüj edilmiş ve alt taraf atılmıştır.
7. Kolona aşağıdaki gibi hazırlanan DNaz I solüsyonu eklenmiştir;
 - 1µL 0,5M EDTA(son konsantrasyonu 5mM), 10 µL 10^xDNazI reaksiyon tamponu, 2U DNazI eklenip hacmi 100 µL`ye tamamlanmıştır.
 - Karışım kolona aktarılıp 37 °C`de 20 dk inkübe edilmiştir.
 - 75 °C`de 10 dk beklenerek enzim inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

8. 350 µL RW1 tamponu eklenip 15 sn 10.000 rpm`de santrifüj edilip alt taraf uzaklaştırılmıştır.
9. 500 µL RPE tamponu eklenip 15 sn 10.000rpm`de santrifüj edilip alt taraf uzaklaştırılmıştır.
10. 500 µL RPE tamponu eklenip 2 dk 12.000rpm`de santrifüj edilip alt taraf uzaklaştırılmıştır.
11. RPE tamponunda bulunan alkolün kolondan tamamen uzaklaştırılması için maksimum hızda 1 dk santrifüj edilmiştir.
12. Son olarak elüsyon basamağında RNaz içermeyen 40 µL saf su ile RNA elde edilmiştir.

Total RNA ekstraksiyonu sonrası µL`sinde kaç nanogram RNA olduğunu saptamak için spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiş ve konsantrasyon tayinleri yapılmıştır. İzole RNA`lar -80 °C`de muhafaza edilmek üzere saklanmıştır. Saklamak için kullanılan laboratuvar ekipmanlarının tümü otoklavlanmış ve UV Crosslinker aletinde sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra DEPC`li su ile muamele edilmiştir. RNA` dan cDNA sentezi için İnvitrogen firmasının Superscript II RT ile ReverseTranskriptaz PZR kitleri kullanılarak RNA` dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

2.4.2. Superscript II RT ile ReverseTranskriptaz PZR

Çoğunlukla gen ifadesi çalışmaları için gerçekleştirilen RT-PZR, genellikle RNA virüslerinden elde edilen Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak ortamda var olan RNA moleküllerini komplementer DNA`ya (cDNA) dönüştürmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca real-time PZR ile kombine bir şekilde floresan işaretli boyalar kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması ile gen ifade düzeyi çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

Bileşenler:

- Superscript II RT
- 5^x First Strand Buffer (250mM TRIS-Cl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)
- 0,1 M DTT

Protokol:

Bileşen		Hacim (µL)
OligodT ₍₁₂₋₁₈₎ (500 µg/mL)	}	1 µL
Randomprimer (50-250 ng)		
Gene Özgü Primer (GSP) (2 pmol)		
1 ng-5 µg total RNA	}	5 µL
1-500 ng mRNA		
dNTP karışımı (her birinden 10mM)		1 µL

Son hacim ddH₂O ile 12µL` ye tamamlanmıştır.

1. Karışım 65°C` de 5 dk inkübe edilip hemen buz üstüne alınmıştır.
2. 4 µL 5^x First Strand Buffer ve 2 µL 0,1M DTT eklenmiştir ve karışım dikkatli bir şekilde karıştırılarak 42°C` de 2 dk inkübe edilmiştir.
3. 1 µL (200 ünite) Superscript II RT eklenip karıştırılmış ve son hacim 20 µL` ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.
4. 42°C` de 30 dk inkübe edilmiştir.
5. Reaksiyonu durdurmak ve enzimi inaktive edebilmek için 70°C` de 15 dk reaksiyon karışımı bekletilmiştir.
6. RT-PZR` nin başarılı olup olmadığını ölçmek için genin ekzon dizilerinden tasarlanan primerler ile standart PZR yapılmıştır.

2.4.3. Real-Time PZR

Total bireylerden ve bireylerin farklı dokularından elde edilen total RNA`lardan sentezlenen cDNA örneklerinin kantitatif analizi için SYBER Green I boyasının floresan ışımaya özelliği kullanılarak *real-time PZR* gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Bioneer Exicycler 96 cihazıyla uyumlu *Accupower Green Star qPCR Premix* kullanılmıştır. Standart PZR`da olumlu sonuç alınmış primerler ve rapörtör gen olarak da *GAPDH* geni primerleri kullanılarak prosedür aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir;

- | | |
|--------------------------------|-------|
| 1. İleri yönlü primer (10pmol) | 2 µl |
| Geri yönlü primer(10pmol) | 2 µl |
| Kalıp DNA(cDNA) | 10 µl |

DEPC` lidistile su 20 µl` ye tamamlanır

2. Hazırlanan karışım Accupower GreenStar qPCR Premix` in içine konur ve dikkatlice karıştırılmıştır.
3. Karışımın üzeri optik yapışkan film ile kapatılmıştır.
4. Tamamen süspanse olması için 30 sn vortekslenmiştir.
5. 3.000 rpm` de 2 dk santrifüj edilmiştir.
6. Daha sonra *real-time* PZR aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada;

Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5dk
Denatürasyon	95°C	20 sn
Bağlanma / Uzama } Belirleme (Tarama) }	50°C	45 sn
Erime		

7. Reaksiyon tamamlandıktan sonra veriler analiz edilmiştir.

2.4.4. RACE Sistem

2.4.4.1. 5` RACE Sistem

İlgili genin kodlama yapan dizisinin tamamını elde edebilmek ve genin öncesinde ve sonrasında bulunan genin kontrol bölgelerinin dizisine ulaşabilmek adına RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) Sistem yaklaşımına başvurulmuştur (Frohman ve ark., 1988). Bu yaklaşım genlerin moleküler ölçekte karakterizasyonu çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaçla *globin* geninin moleküler karakterizasyon aşamaları için tercih edilen RACE Sistem için uygulanan aşamalar şu şekildedir:

2.4.4.1.1. Tek zincirli cDNA sentezi

Bu aşama 1-5 µg total RNA içeren ortamdan spesifik RNA dizi veya dizilerinin tek zincirli cDNA`ya dönüştürülmesi için tasarlanmıştır. Genellikle 100-500 ng total RNA, 5` RACE sistem ile düşük kopyalı mesajların amplifikasyonu için yeterli materyali sağlayabilir. Bu protokolle oldukça nadir mesajları zenginleştirebilmek için poly (A) RNA`lar kullanılabilir de bu düzeyde bir saflık genelde gerekli değildir.

Örneklerin RNaz kontaminasyonunu engelleyebilmek için ekstrem çaba sarf edilmiştir. Prosedür boyunca enzim buz üzerinde bekletilmiştir. Her bileşen kullanılmadan önce karıştırılmış ve kısa spin yapılmıştır. Total RNA konsantrasyonu

80-358 ng/ μ L arasında olduğu için komponentler ve Superscript II miktarında modifikasyona ihtiyaç duyulmamıştır.

1. Aşağıdaki bileşenler 0,5 mL mikrosantrifüj tüpüne eklenmiştir. Thermalcycler kullanıldığı için ince duvarlı PCR tüpü tercih edilmiştir.

Bileşen	Miktarı
GSP1	2,5 pmol
Örnek RNA(yaklaşık 10-25 ng)	1-5 μ g
DEPC ile muamele edilmiş distile su son hacim	15,5 μ L

2. Karışım RNA'yı denatüre edebilmek için 70°C`de 10 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında 1 dk buzda bekletilmiştir. İçeriği birleştirebilmek adına dikkatli bir şekilde kısa spin yapıp aşağıdaki bileşenler eklenmiştir.

Bileşen	Hacim (μL)
10 ^x PCR tamponu	2,5
25 mM MgCl ₂	2,5
10 mM dNTP karışımı	1,0
0.1 M DTT	2,5
Son hacim	8,5 μ L

1. ve 2. basamak sonrası total hacim 24 μ L olacak şekilde hesaplanmıştır.

3. Dikkatli bir şekilde karıştırılıp kısa spinle çeperlerde kalan karışım bir araya toplanmıştır. 42°C`de 1 dk inkübe edilmiştir.
4. 1 μ L SuperScript II RT eklenip dikkatli bir şekilde karıştırılıp 42°C`de 30 dk inkübe edilmiştir.

Not: Kısa mRNA` lar için (< 4 kb) 30 dk inkübasyon genelde yeterlidir. Daha uzun transkriptlerin longPCR`da cDNA`nın yeterli sinyali oluşturabilmesi için en az 50 dk`ya ihtiyaç duyulacaktır. Tahmin edilen transkriptin büyüklüğü 900bp olduğu için 30 dakika inkübasyon yapılmıştır.

Reaksiyonun son kompozisyonu:

- 20 mM Tris-HCl (pH8,4)
 - 50 mM KCl
 - 2.5 mM MgCl₂
 - 10 mM DTT
 - 100 nM cDNA primer (GSP1)
 - 400 µM her bir dNTP
 - 1-5 µg (yaklaşık 40 ng/µL) RNA
 - 200 ünite SuperScript II RT
5. Reaksiyonu sonlandırmak için 70°C`de 15 dk inkübe edilmiştir.
 6. 10-20 sn santrifüj edilip reaksiyon ortam sıcaklığı 37°C`ye getirilmiştir.
 7. RNaz karışımının 1 µL`si eklenip dikkatlice ve tümüyle karışması sağlanmıştır. Bu karışım 37°C`de 30 dk inkübe edilmiştir.
 8. Kısa spin yapılarak reaksiyon ortamı bir araya toplanıp buz üzerine alınmıştır.

2.4.4.1.2. cDNA`nın S.N.A.P. kolon saflaştırması

1. Bağlanma solüsyonunu oda sıcaklığında dengelenmiştir.
2. Saflaştırılacak her bir örnek için yaklaşık 100 µL steril distile su 9. basamakta kullanılmak üzere 65°C`de dengelenmiştir.
3. Birinci zincir reaksiyonuna 120 µL bağlanma solüsyonu (6M NaI) eklenmiştir.
4. cDNA/NaI solüsyonu S.N.A.P. kolona aktarılmıştır. 13.000 g (10770 rpm) hızda 20 sn santrifüj edilmiştir.
5. Kolondan süzülen sıvı, bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp cDNA kazanımı doğrulanıncaya dek bu solüsyon saklanmıştır. Toplama tüpü tekrardan kolona takılmıştır.
6. Kolona 0,4 mL soğuk (+4°C) 1^x yıkama tamponunu eklenip 13.000 g (10770 rpm)`de 20 sn santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu yıkama basamağı üç kez tekrarlanmıştır.
7. Kolon 400 µL soğuk (+4°C) %70`lik etanol ile 6.basamakta tanımlandığı gibi iki kez yıkanmıştır.

8. Son etanol yıkamasıda uzaklaştırıldıktan sonra kolon 13.000 g`de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Kolon yeni bir kazanım tüpüne aktarılıpüzerine önceden 65°C olarak ısıtılmış olan steril distile sudan 50 µL eklenmiştir. cDNA 13.000 x g hızda 20 sn santrifüjlenerek çözülmüştür.
10. Bu aşamadan hemen sonra örnek -20 °C`de saklanmıştır.

NOT: 1^x yıkama tamponu ve %70`lik etanol mutlaka kullanılmadan hemen önce hazırlanmalı ve soğuk kullanılmalıdır. Etkili bağlanma için bağlanma solüsyonu oda sıcaklığında olmalıdır. Alkolün tamamının uzaklaştırılmasındaki başarısızlık DNA`nın zayıf kazanımıyla sonuçlanabilir. DNA`nın kazanımını arttırmak için distile suyun 65°C sıcaklıkta olması oldukça önemlidir.

2.4.4.1.3. cDNA`nın TdT uzatılması

TdT -tailing reaksiyonunda S.N.A.P. kolon saflaştırmasından elde edilen cDNA`nın farklı miktarları kullanılabilir. İlk zincir reaksiyonunda kullanılan RNA miktarı ve istenen mRNA`nın reaksiyondaki nispi miktarı gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Eğer istenirse, cDNA havuzu liyofilizasyon uygulamasıyla konsantre edilir ve bu içeriğin tamamı tailing reaksiyonunda kullanılır. Oligo-dC kuyrukla gerekli amplifikasyonun özgünlüğünü değerlendirebilmek için, TdT`nin kontrol reaksiyon olarak kullanılması önerilir.

NOT: 5^x tailing tamponu MgCl₂ içermektedir. Ayrıca eklenmemelidir. TdT 5` RACE sistem için optimize edilmiştir. Tailing reaksiyonunda TdT`nin fazla miktarları PCR`ı inhibe edebilir.

Uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir;

1. Aşağıdaki bileşenler her bir tüpe eklenip iyice karıştırılmıştır.

Bileşen	Hacim (µL)
DEPC ile muamele edilmiş su	6,5
5 ^x Tailing Buffer	5,0
2 mM dCTP	2,5
S.N.A.P. ile saflaştırılmış cDNA örnekleri	10,0
Son hacim	24,0 µL

2. Reaksiyon 94°C`de 2-3 dk inkübe edilmiştir. Dikkatli bir şekilde santrifüjlenerek karışım bir arada tutulmuş ve buza alınmıştır.
3. 1 µL TdT eklenip iyice karıştırılmış ve 37°C`de 10 dkinkübe edilmiştir.
4. 65 °C`de 10 dk inkübasyonla TdT inaktive edilmiştir. Dikkatli bir şekilde santrifüjlenerek karışım bir arada tutulup buz üzerine alınmıştır.
5. Bu aşamadan sonra örnek -20°C`de saklanmıştır.

2.4.4.1.4. dC-kuyruklu cDNA`nınPZR`ı

Önceki protokollerden elde edilen kuyruklu cDNA doğrudan PCR ile amplifiye edilebilir. Tailing reaksiyonların 5 µL`den büyük hacimlerinin PCR`da amplifikasyonu tampon, MgCl₂ ve dNTP konsantrasyonu için ayarlama gerektirebilir.

1. Termal cycluser blokları 94°C`ye getirilip çoğu durumda `iyi başlanmış` prosedür spesifik amplifikasyon ürünleri oluşturur. Bazı hedef ve primer setleri için `hot start` yöntemine başvurulduğu takdirde reaksiyonun spesifikliğini arttırdığı rapor edilmiştir.
2. Buz üzerinde 0,2 veya 0,5-ml hacimli PCR tüpüne aşağıdaki bileşenler eklenmiştir:

Bileşen	Hacim (µL)
Sterilize edilmiş distile su	31,5
10 ^x PCR tamponu [200 mM Tris-Cl (pH 8.4), 500 mM KCl]	5,0
25 mM MgCl ₂	3,0
10 mM dNTP karışımı	1,0
Nested GSP2 (10 µM solüsyon olarak hazırlanmış)	2,0
AbridgedAnchorPrimer (10 µM)	2,0
dC-kuyruklandırılmışcDNA	5,0
Son hacim	49,5 µL

Not: Spesifik olmayan bağlanmalardan ve primer uzamalarından kaçınmak için reaksiyon karışımının buzda tutulması oldukça önemlidir.

3. Karıştırmadan önce hızlıca 0,5 µL Taq DNA polimeraz (5 U/µL) eklenmiştir.
4. Karışım iyice karıştırılıp mineral yağ eklenmiştir.

Reaksiyonun son kompozisyonu:

- 20 mM Tris-Cl (pH8.4)
 - 50 mM KCl
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 400 nM GSP2
 - 400 nM Abridged Anchor Primer
 - 200 µM her bir dNTP kuyruklu cDNA
 - 2,5 U Taq DNA polimeraz
5. Tüpler buzdan alınıp doğrudan önceden 94°C'ye getirilen termal cycler cihazına aktarılmıştır.
6. 30-35 döngü PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. ≥1kb cDNA'nın amplifikasyonu için başvurulan protokol aşağıdaki gibidir:
- Başlangıç Denatürasyonu: 94 °C`de 1-2 dk
- Döngü:
- | | | |
|--------------|------|----------|
| Denatürasyon | 94°C | 0.5-1 dk |
| Bağlanma | 55°C | 0.5-1 dk |
| Uzama | 72°C | 1-2 dk |
| Son Uzama: | 72°C | 1-2 dk |
7. 5-20 µL 5` RACE sistem ürünü agaroz jelde görüntülenmiştir.

2.4.4.1.5. Yuvalanmış (Nested) Amplifikasyon

25-35 döngüden oluşan bir PZR reaksiyonu genelde etidiyumbromür ile saptanabilecek kadar spesifik ürün oluşturmaz. PZR süresince döngü sayısını arttırmak spesifik olmayan ürün oluşumunu artırır ve bu nedenle de önerilmez. Benzer olarak yüksek hedef miktarı da spesifik olmayan ürün oluşumunu arttırabilir ve PZR ürünlerinde sürüntülerin oluşmasına neden olabilir. Bunun yerine, PZR ürününün seyreltilmesi (%0,1- 0,05) AUAP veya UAP aracılığıyla yuvalanmış GSP ile yeniden amplifikasyon sağlanabilir. Eğer yuvalanmış GSP dizaynı için gerekli dizi bilgisine sahip değilseniz, UAP veya AUAP ile orijinal GSP kullanılarak amplifiye edilmiş PZR ürünleri jelden izole edilerek yeniden amplifiye edilebilir. Bu amplifikasyon 5` RACE sistem ürününün güçlendirilmesi için yeterli olacaktır.

1. 5 µL ilkin PZR ürünü 495 µL 1^xTE tamponunda [10 mM Tris-Cl (pH8.0); 1mM EDTA] çözülmüştür.
2. Termal cycler blok sıcaklığı 94°C`ye getirilmiştir.
3. Buz üzerinde 0,2 ya da 0,5 ml hacimli PZR tüpüne aşağıdaki bileşenler eklenmiştir:

Bileşen	Hacim (µL)
Sterilize edilmiş distile su	33,5
10 ^x PZR tamponu [200 mM Tris-Cl (pH8,4), 500 mM KCl]	5,0
25 mM MgCl ₂	3,0
10 mM dNTP karışımı	1,0
Nested GSP2 (10 µM solüsyon olarak hazırlanmış)	1,0
AUAP veya UAP (10 µM)	1,0
Seyreltilmiş ilkin PZR ürünü	5,0
Son hacim	49.5 µL

Not: Spesifik olmayan bağlanmalardan ve primer uzamalarından kaçınmak için reaksiyon karışımının buzda tutulması oldukça önemlidir.

4. Karıştırmadan hemen önce 0,5 µL Taq DNA polimeraz (5 U/µL) eklenmiştir.
5. Karışım iyice karıştırılıp mineral yağ eklenmiştir.

Reaksiyonun son kompozisyonu:

- 20 mM Tris-Cl (pH8,4)
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 400 nM GSP2
- 400 nM UAP veya AUAP
- 200 µM her bir dNTP
- Seyreltilmiş ilkin PZR ürün
- 2,5 U Taq DNA polimeraz

Buz üzerindeki tüpler önceden 94 °C`ye getirilen termal cycler`a aktarılmıştır.

6. 30-35 döngü PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

7. 5-20 µL amplifiye edilmiş örneği agaroz jel elektroforeziyle analiz edildi.

2.4.4.2. 3` RACE Sistem (Frohman ve ark., 1988)

Bileşenler

- 10^x PZR Tamponu (200mM Tris-Cl pH8.4, 500mM KCl)
- 25mM MgCl₂
- 10mM dNTP karışımı (her birinden 10mM)
- 0,1 M DTT
- Superscript II Reverse transkriptaz (RT, 200 U/µL)
- Adapter primer (AP, 10 µM)
- Evrensel amplifikasyon primeri (UAP, 10 µM)
- Köprülenmiş evrensel amplifikasyon primeri (AUAP, 10 µM)
- *E. coli* RNaz H (2 U/µL)
- DEPC`li su
- Kontrol RNA (50 ng/µL)
- Kontrol gene spesifik primer (GSP, 10 µM)

Protokol;

1. Bileşenler kullanılmadan önce kısa spin edilmiştir.
2. Yaklaşık 50ng mRNA DEPC`li su kullanılarak 11 µL` ye tamamlanmıştır.
3. 1 µL AP eklenip dikkatlice karıştırılmıştır.
4. 70°C`de 10 dk inkübe edilmiştir. Buz üstüne alınıp 1-2 dk beklenmiş ve sonrasında üzerine diğer bileşenler eklenmiştir. Diğer bileşenler ise;

Bileşen	Hacim (µL)
10 ^x PZR tamponu	2
25mM MgCl ₂	2
10 mM dNTP karışımı	1
0,1 M DTT	2

5. Karışım iyi bir şekilde karıştırılmış ve 42°C`de 5 dk inkübe edilmiştir.
6. 1 µL Superscript II RT` den eklenip 42°C`de 40 dk inkübe edilmiştir.
7. 70°C`de 15 dk bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

8. Buz üzerine alınıp 1 µL RNaz H eklenmiş ve 20 dk 37°C`de inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra hedef cDNA`nın amplifikasyonu basamağına geçilmiştir.

Bileşen	Son Konsantrasyonları	Hacim (µL)
10 ^x PZR Tamponu	20 mM Tris-Cl pH 8.4, 50 mM KCl	5,0
25 mM MgCl ₂	1,5 mM	3,0
ddH ₂ O		36,5
10mM dNTP karışımı	200 µM	1,0
GSP (GLBRT F1)	200 nM	1,0
AUAP	200 nM	1,0
Taq DNA Polimeraz	0,04-1 U	0,5
Kalıp cDNA		2,0
	Son hacim	50,0 µL

Başlangıç Denatürasyonu:	94°C`	3 dk
Döngü:		
Denatürasyon	94°C	1 dk
Bağlanma	46,5°C	1 dk
Uzama	72°C	1 dk
Son Uzama:	72°C	1 dk

} 35 Döngü

Amplifikasyon sonrasında örnekler 50 µL kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz yeni bir tüpe alınmış ve örneğin 10 µL`si % 0,8`lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

2.5. Veri Setlerinin Analizleri:

2.5.1. Nükleotid Düzeyinde Karakterizasyon Analizleri

Dizileme sonucunda elde edilen *B.terrestris* türüne ait *globin* geninin ileri ve geri yönlü nükleotid dizi verileri, CodonCode Aligner v 5.1.4 programı ile kontrol edilmiştir. Dizi MEGA v 5.2 (Tamura ve ark., 2012) programıyla aminoasit dizisine çevrilmiştir. Sonrasında nükleotid ve aminoasit dizilerinin doğruluğu nBLAST ve pBLAST homoloji taramalarıyla kontrol edilmiştir. Referans dizi olarak kullanmak ve karşılaştırma yapabilmek için *D. melanogaster* (Erişim numarası:

NM_001300414), *A. mellifera* (Erişim numarası: NM_001077823), *A. gambiae* (Erişim numarası: AM182453), *C. thummi thummi* (Erişim numarası: M17691) türlerine ait globin gen dizileri GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanından indirilmiştir. Doğruluğu kanıtlanan *B. terrestris* türünün *globin* dizi verisi bu türler ile karşılaştırılmak amacıyla MEGA v5.2 programı (Tamura ve ark., 2012) kullanılmıştır. Dizilerin ikili ve çoklu hizalaması için IUB DNA Ağırlık Matriksi kullanılarak (diğer parametreler standart programın değerleri kullanılarak) analiz yapılmıştır. CLUSTAL W hizalamaları yapılmıştır. Buradaki amaç dizilerin homoloji gösterip göstermediğini test etmektir. DNA verisi üzerinden ilgili türde varlığı saptanan genin 5` RACE ve 3` RACE Sistem ile elde edilen PZR ürünlerinin dizileri de benzer şekilde CodonCode Aligner programında işlendikten sonra FASTA formatında kaydedilmiştir. Elde edilen diziler için öncelikle genin Açık Okuma Çerçevesinin bulunması için başlama kodunu gözle taranmıştır. Ayrıca ORF dizisinin doğruluğunu kanıtlanmak adına "Sequence Manipulation Suite" (<http://www.bioinformatics.org/>) veri tabanında ORF Finder (Stothard, 2000) programı kullanılmıştır ve genin açık okuma çerçevesi belirlenmiştir. Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) ve Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) (Li ve Dahiya, 2002) programları kullanılarak genin 5` ucuna yakın dizilerde CpG adaları GC yoğunluğunun % 50`nin üzerinde olduğu dizilerin bulunduğu bölgeler üzerinden araştırılmıştır. 3` ucunda ise sonlanma kodonu/ kodonlarının taranmasına ek olarak 5-20 baz uzunluğunda olası poliA yapıların varlığı da araştırılmıştır.

2.5.2. Amino asit Düzeyinde Karakterizasyon Analizleri

Türün *globin* geninin açık okuma çerçevesi MEGA 5.2 programı (Tamura ve ark., 2012) ile standart genetik kod kullanılarak protein dizisine çevrilmiştir. Öncelikle kodon kullanım eğilimleri hesaplanarak her bir amino asitin protein içerisindeki yüzde varlığı saptanmıştır. Termodinamik açıdan kararlı, sabit basınç ve sıcaklık koşullarında protein katlanması reaksiyonunun kendiliğinden gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini tahmin etmek amacıyla 1D Protein Structure Prediction Server (<http://biomine.ece.ualberta.ca/1D/1D.html>) (Chen ve Kurgan, 2007) ve PSIPRED v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Buchan ve ark., 2013) programları kullanılmıştır. Bu programlarda serbest Gibbs Enerji değeri (ΔG) en düşük olan protein katlanma modeli kabul edilmiştir. 1D Protein Structure Prediction Server

(Chen ve ark., 2008) ile ayrıca yapısal sınıflandırma tahmini yapılarak aminoasitlerin katlanma motifleri (α heliks veya β tabakalı) saptanmıştır. PredictProtein veri tabanı (<https://www.predictprotein.org/>) kullanılarak *globin* proteinin sekonder yapısının heliks, düz zincir ve loop içeriği belirlenmiştir. Görece yer değiştirme algoritmasından (Grantham, 1974) yararlanılarak *B. terrestris* ile aynı takımda bulunan (yakın akraba) *A. mellifera* türünün *globin* geni amino asit dizisi karşılaştırılıp amino asit değişimlerinin korunmuşlukları araştırılmıştır. Amino asit dizisinde sinyal peptidinin varlığı PredictProtein veritabanı ile araştırılmıştır. PROTTER veritabanı (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) (Omasits ve ark., 2014) kullanılarak proteinin zardaki olası katlanmaları çıkarılmıştır.

2.5.3. Protein Düzeyinde Karakterizasyon Analizleri

Proteinin moleküler ağırlığı, izoelektrik noktası (pI), hidropati indeksi (GRAVY) Sequence Manipulation Suite veritabanı kullanılarak hesaplanmıştır. NCBI veritabanı içerisinde bulunan üç boyutlu yapı çizme programı Cn3D v4.3.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) (Wang ve ark., 2000) kullanılarak *D. melanogaster* ve *A. mellifera* türlerinin *globin* proteinlerinin üç boyutlu yapısı referans alınarak *B. terrestris* türünün *globin* proteinin olası üç boyutlu yapısı çizilmiştir. *Globin* proteinin fonksiyonelliğinde önemli rollere sahip amino asitler (HisF8- HisE7-PheCD1) bu üç boyutlu yapı üzerinde gösterilmiştir.

2.5.4. Filogenide Kullanılabilirliğine Yönelik Analizler

Hymenoptera ve Diptera takımlarından *globin* geni karakterize edilmiş türlerin *globin* geni amino asit dizileri, EMBL-EBI veri tabanı içerisinde ClustalW2-Phylogeny servisi (http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/) kullanılarak hizalanmıştır. Türlerin *globin* proteinlerinin takım düzeyindeki homolojisi saptanmıştır. *Globin* gen dizileri kullanılarak maksimum olasılık ağacı 500 bootstrap kullanımıyla çizilerek türlerin filogenetik ilişkilerinin *globin* gen verisi ile de sağlanabilirliği kontrol edilmiştir. Türlerin nükleotid ve amino asit dizileri üzerinden MEGA v5.2 (Tamura ve ark., 2012) programıyla p-distance değerleri hesaplanmış, proteinin seçilim baskısında olup olmadığına dair işaretler aranmıştır. Analiz edilen türlerin *globin* geni nükleotid dizileri ile DAMBE programı (Xia, 2000) kullanılarak doygunluk indeksleri de hesaplanmıştır. $I_{ss} \geq I_{ss,c}$ değerleri karşılaştırılarak olası değişimlerin veya mutasyonların etki düzeyi

belirlenmiştir. Analize dahil olan türlerin *globin* geni nükleotid dizilerinin transisyonel/transversiyonel mutasyon oranları, MEGA v5.2 (Tamura ve ark., 2012) programında "general time reversible model" ile gamma dağılımı (GTR+G) kullanılarak hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu

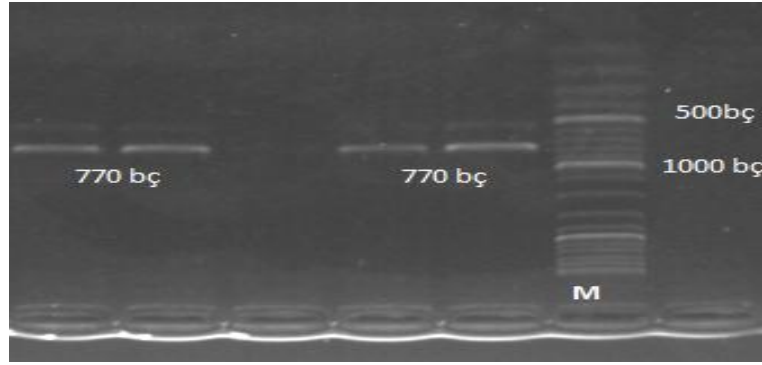
Çalışma kapsamında *B. terrestris* bireylerinden DNA izolasyonu amacıyla başvuru olan yöntemin (QiagenDNeasy Blood & Tissue kiti ile DNA izolasyonu) laboratuvar optimizasyonu, kit kapsamında önerilen protokolde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında örneklerin DNA konsantrasyonlarını ve saflıklarını ölçmek için A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3). Buna göre izolasyonu başarı ile tamamlanan örneklerin DNA konsantrasyonları 227,53 ng/ μ L ile 782,68 ng/ μ L arasında olup, saflıkları ise 1,71-2,13 değerleri arasında hesaplanmıştır. Saflık açısından A_{260}/A_{280} oranı 1,8 olarak kabul görmekte olup bu değerden sapma gösteren bireyler için fenol-kloroform ekstraksiyonu uygulamasına başvurulmuştur. Fenol kloroform ekstraksiyonu sonrası örneklerin saflık oranları 1,8 ya da 1,8` e yakın değerlere ulaşmıştır.

Çizelge 3. *B. terrestris* bireylerinden yapılan DNA izolasyonu sonrası nanodropta ölçülen örneklerin konsantrasyonları ve $A_{260}, A_{280}, A_{260}/A_{280}$ değerleri.

Örnekler	Konsantrasyon	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
<i>BtA</i>	227,53 ng/ μ L	5.579	2.613	2,13
<i>BtB</i>	897,66 ng/ μ L	22.553	12.079	1,86
<i>BtC</i>	588,23 ng/ μ L	14.654	8.564	1,71
<i>BtD</i>	677,82 ng/ μ L	14.123	7.458	1,89
<i>BtE</i>	782,68 ng/ μ L	19.156	10.699	1,79

Bireylerin moleküler teşhisi için başvuru olan barkodlama yaklaşımı (evrensel *COI* barkod bölgesinin kullanılması) başarı ile sonuçlanmış olup, elde edilen dizilerin veri tabanlarında karşılaştırmaları yapılarak morfolojik teşhislerin doğruluğu moleküler olarak gösterilmiştir.

B. terrestris bireylerinde globin geninin varlığına yönelik ilkin denemelerde *A.mellifera* türüne ait *globin* geni nükleotid dizi bilgisi referans alınarak tasarlanan primer çiftlerinden yararlanılmıştır. Özellikle HB2F 5`-GCACGAAG AACGAGTAGTCG-3` ve HB5R 5`-GGATAAACTCGTCTCGTTCT-3` ile HB2R 5`-CGTTACGACGAAGGTTATCGAT-3` primerleri ile gerçekleştirilen standart PZR sonuçlarında başarı elde edilmiştir (Şekil 9). Bu primer çiftlerinden yararlanılarak yapılan PZR sonuçları beklenen uzunlukta bir fragmanın (yaklaşık 770 bç) *B. terrestris* türü genomundan çoğaltıldığını göstermiştir. Aynı zamanda bu PZR örneklerinin hizmet alımı kanalıyla dizileme ve hizalama sonuçları elde edilen fragman nBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) veri tabanında homoloji tabanlı araştırılmıştır. Analiz sonucunda tahmini olarak GenBank'a yüklenen *B. terrestris* sito-2-globin geni ile % 99 düzeyinde homoloji sergilemiştir



Download v GenBank Graphics

PREDICTED: *Bombus terrestris* cytoglobin-2-like, transcript variant 2 (LOC100647462), mRNA
Sequence ID: [reflXM_003396785.1](#) Length: 1756 Number of Matches: 1

Range 1: 379 to 812 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
778 bits(421)	0.0	430/434(99%)	2/434(0%)	Plus/Plus

```

Query 27  TGACGGA-CAACAGAAG-AATTAGTGCAAAACACGTGGGCCGTTATCAGAAAGGACGAGG 84
Sbjct 379  TGACGGAGAAACAGAAGAAATTAGTGCAAAACACGTGGGCCGTTATCAGAAAGGACGAGG 438
Query 85  TGGCTTCCGGGATTGCCGTGATGACCACATTCTTTAAAACATATCCAGAAATATCAGCGAT 144
Sbjct 439  TGGCTTCCGGGATTGCCGTGATGACCACATTCTTTAAAACATATCCAGAAATATCAGCGAT 498
Query 145  ATTTTAGCGCTTTCGCGGACGTTCCGTTTCGACGAATTGCCGGCTAATAAACGGTTTTCAAG 204
Sbjct 499  ATTTTAGCGCTTTCGCGGACGTTCCGTTTCGACGAATTGCCGGCTAATAAACGGTTTTCAAG 558
Query 205  CTCATTGTGTCAGCGTAATTACGGCCTTAAATAGTGTATCGATTCTTGCACGACCCAG 264
Sbjct 559  CTCATTGTGTCAGCGTAATTACGGCCTTAAATAGTGTATCGATTCTTGCACGACCCAG 618
Query 265  GATTAATGGAGGCGAGCCTAATCAGCTTGGGCGAGAGGCATAAAAAGACGTGGCCAAACGA 324
Sbjct 619  GATTAATGGAGGCGAGCCTAATCAGCTTGGGCGAGAGGCATAAAAAGACGTGGCCAAACGA 678
Query 325  AAGAAGAATTTGAGAATTTGAAAGGAGTAGTGTGAAAGTGCTTTCTCAAGCACTAGGGA 384
Sbjct 679  AAGAAGAATTTGAGAATTTGAAAGGAGTAGTGTGAAAGTGCTTTCTCAAGCACTAGGGA 738
Query 385  AACCAATACACACCGGAAGTGGCCGAAGCGTGGAGCAAAACCTTGGACGGGGTATTTGCGA 444
Sbjct 739  AACCAATACACACCGGAAGTGGCCGAAGCGTGGAGCAAAACCTTGGACGGGGTATTTGCGA 798
Query 445  AGATATATCAGGTT 458
Sbjct 799  AGATATATCAGGTT 812

```

Şekil 9. HB2F-HB2R primer çifti ile yapılan PZR`ın % 0,8` lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (Belirteç: Thermo Scientific Gene Ruler DNALadder Mix #SM0331) ve dizilenen PZR ürünün GenBank veri tabanındaki nBLAST taraması sonucu.

3.2. RNA İzolasyonu

Örneklerden RNA izolasyonu uygulamaları iki şekilde yürütülmüştür. RNA Later solüsyonunda -80 °C`de saklı olan arazi örnekleri doğrudan, ticari olarak temin edilen örnekler ise canlı halde alınarak hızlı bir şekilde RNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir. İzolasyon tüm birey, toraks, abdomen, bacak ve kafa olmak üzere beş farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnekler hızlı ve etkili bir şekilde fiziksel olarak parçalanmıştır. Total RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Mini Kit ile firma tarafından önerilen protokol uygulanarak yürütülmüştür. İzole edilen RNA`ların konsantrasyonu ve saflığı A_{260} , A_{280} ve A_{260}/A_{280} değerleri üzerinden hesaplanmıştır (Çizelge 4). Buna göre izolasyonu başarı ile tamamlanan tüm birey örneklerinde RNA konsantrasyonları 44,38 ng/ μ L ile 226,02 ng/ μ L arasında olup, saflıkları ise 2,02-2,20 değerleri arasında hesaplanmıştır. Ayrıca en fazla RNA örneği, toraks kısmından (78,07 ng/ μ L), en düşük oranda ise bacaklardan (15,73 ng/ μ L) izole edilmiştir (Çizelge 4).

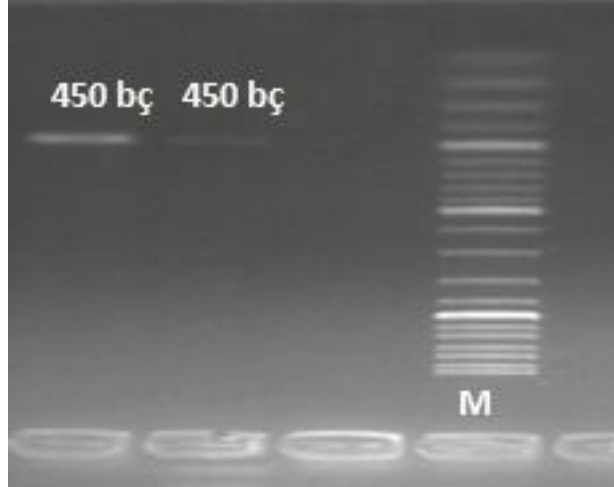
Çizelge 4. *B. terrestris* bireylerinden yapılan RNA izolasyonu sonrası nanodropta ölçülen örneklerin konsantrasyonları ve A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} değerleri.

Örnekler	Konsantrasyon (ng/ μ L)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
<i>BtA</i>	44,38 ng/ μ L	1.109	0.539	2,05
<i>BtB</i>	78,07 ng/ μ L	1.952	0.965	2,02
<i>BtC</i>	83,07 ng/ μ L	2.077	0.945	2,19
<i>BtD</i>	226,02 ng/ μ L	5.650	2.674	2,11
<i>BtE</i>	218,96 ng/ μ L	5.125	2.323	2,20

Örnekler	Konsantrasyon (ng/ μ L)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
<i>BtToraks</i>	78,07ng/ μ L	1.952	0.824	2,36
<i>BtAbd</i>	41,80 ng/ μ L	1.045	0.593	1,76
<i>BtBacak</i>	15,73 ng/ μ L	0.393	0.278	1,41
<i>BtKafa</i>	34,09 ng/ μ L	0.852	0.770	1,10

3.3. RT-PZR (ReverseTranskriptaz PZR)

RNA izolasyonları sonrasında örneklerin konsantrasyonlarına göre RNA miktarında modifikasyonlar yapılarak total RNA` dan komplementer DNA (cDNA) çoğaltımları yapılmıştır. Bu amaçla gene özgü primer (GSP) olarak GLBRT R4 5`- TCAAG AAGCGAAAACCTGA-3` primeri kullanılarak SuperscriptII RT ile RT-PZR gerçekleştirilmiştir. RT-PZR sonucunda cDNA` nın çoğaltılıp çoğaltılmadığının kontrolü *A. mellifera globin* geni mRNA dizisi referans alınarak tasarlanan primerlerden GLBRTF1 ve GLBRTR4 primer çifti yardımıyla gerçekleştirilmiştir. cDNA ürünü kalıp olarak kullanılan PZR sonuçlarının jel görüntüleri Şekil 10`da gösterilmiştir. PZR sonucunda 458 uzunluğunda fragman elde edilmiştir.



Şekil 10. GLBRTR4 primeri ile yapılan RT-PZR sonucu elde edilen cDNA` dan yapılanGLBRTF1- GLBRTR4 primerleri ile yapılan standart PZR` ın % 0,8` lik agaroz jel elektroforezi sonucu (Belirteç: Thermo Scientific Gene Ruler DNA Ladder Mix #SM0331).

cDNA örneklerinden çoğaltılan PZR ürünleri hizmet alımı kanalıyla dizilemeye gönderilmiş ve gelen sekans sonuçlarının hizalama işlemleri sonrasında nBLASTtaramaları yapılmıştır. Homoloji tarama sonucunda GenBank veri tabanına aktarılmış olan XM_003396785 erişim numaralı ve *B. terrestris cytoglobin-2-like* adlı dizi ile %99 oranında homoloji göstermiştir (Şekil 11). Böylelikle örneklerden izole edilen mRNA üzerinden RT-PZR yaklaşımıyla *B. terrestris* türünde *globin* geninin varlığı doğrulanmıştır. Buna ek olarak çalışma kapsamında farklı dokulardan

izole edilen RNA örneklerinde diferansiyel gen ifadenme profilini belirlemek için *real-time* PZR aşamasına geçilmiştir.

Download v GenBank Graphics					
PREDICTED: <i>Bombus terrestris</i> cytoglobin-2-like, transcript variant 2 (LOC100647462), mRNA					
Sequence ID: reflXM_003396785.1 Length: 1756 Number of Matches: 1					
Range 1: 379 to 812 GenBank Graphics					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
778 bits(421)	0.0	430/434(99%)	2/434(0%)	Plus/Plus	
Query 27	TGACGGA-CAACAGAAG-AATTAGTGCAGAACACGTGGGCCGTTATCAGAAAAGGACGAGG				84
Sbjct 379	TGACGGAGAACAGAAAGAAATTAGTGCAGAACACGTGGGCCGTTATCAGAAAAGGACGAGG				438
Query 85	TGGCTTCCGGGATTGCGGTGATGACCACATTCTTTAAAACATATCCAGAATATCAGCGAT				144
Sbjct 439	TGGCTTCCGGGATTGCGGTGATGACCACATTCTTTAAAACATATCCAGAATATCAGCGAT				498
Query 145	ATTTTAGCGCTTTCGCGGACGTTCCGTTTCGACGAATTGCCGGCTAATAAACGGTTTCAAG				204
Sbjct 499	ATTTTAGCGCTTTCGCGGACGTTCCGTTTCGACGAATTGCCGGCTAATAAACGGTTTCAAG				558
Query 205	CTCATTGTGTGTCAGCGTAATTACGGCCTTAAATAGTGTTATCGATTCTTGCACGACCCAG				264
Sbjct 559	CTCATTGTGTGTCAGCGTAATTACGGCCTTAAATAGTGTTATCGATTCTTGCACGACCCAG				618
Query 265	GATTAATGGAGGCGAGCCTAATCAGCTTGGGCGAGAGGCATAAAAGACGTGGCCAAACGA				324
Sbjct 619	GATTAATGGAGGCGAGCCTAATCAGCTTGGGCGAGAGGCATAAAAGACGTGGCCAAACGA				678
Query 325	AAGAAGAATTTGAGAATTTGAAAGGAGTAGTGTTGAAAGTGCTTTCTCAAGCACTAGGGA				384
Sbjct 679	AAGAAGAATTTGAGAATTTGAAAGGAGTAGTGTTGAAAGTGCTTTCTCAAGCACTAGGGA				738
Query 385	AACAATACACACCGGAAGTGGCCGAAGCGTGGAGCAAAACCTTGGACGGGGTATTTGCGA				444
Sbjct 739	AACAATACACACCGGAAGTGGCCGAAGCGTGGAGCAAAACCTTGGACGGGGTATTTGCGA				798
Query 445	AGATATATCAGGTT	458			
Sbjct 799	AGATATATCAGGTT	812			

Şekil 11. cDNA örneklerinden çoğaltılan PZR ürünlerinin dizilerinin GenBank` ta homoloji taraması sonucu.

3.4. *Real-time*PZR

B.terrestris türünde tüm bireylerden ve bireylerin farklı dokularından (kafa, bacak, toraks, abdomen, malpigi tüpü, testisler) elde edilen total RNA`lardan sentezlenen cDNA örneklerinin kantitatif analizi için SYBER Green I boyasının floresan ışığa özelliği kullanılarak *real-time* PZR uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Bioneer Exicycler 96 cihazıyla uyumlu *Accupower GreenStar qPCR Premix* kullanılmış ve standart PZR sonrasında olumlu sonuç alınmış GLBRTF1 - GLBRTR4 primerleri ve rapörtör gen olarak da *GAPDH* primerleri kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. *Real-time* PZR` da genel olarak anlamlı floresan işaret kaçınıcı döngüden itibaren sayaçlar tarafından algılanabiliyorsa o değer üzerinden kantitatif olarak hedef nükleotid dizisinin miktarı hakkında yorum yapma imkanı oluşur. Reaksiyon sonrası elde edilen ct (cycle treshold) değerlerinin yorumlanması şu şekildedir; Ct değeri 29` dan küçük ise reaksiyon oldukça başarılıdır, örnek içerisinde hedef nükleotid dizisi oldukça fazla, ct değeri 30-37 arasında ise reaksiyon

başarılıdır, hedef nükleotid dizisi orta seviyede mevcut, ct değeri 38-40 arasında ise reaksiyon başarılı sayılamaz, ortamda herhangi bir kontaminasyon ya da çok az miktarda hedef nükleotid dizisi vardır. *B. terrestris* cDNA örneklerinden GLBRTF1-GLBRTR4 primerleri ile yapılan Real-time PZR sonrası elde edilen ct değerleri Çizelge 5`te gösterilmiştir. Buna göre örneklerde globin transkriptinin en çok bulunduğu BtA bireyinin farklı dokularının gen ifade profilinin çıkarılması sonucu abdomen, malpigi tüpü, testislerinde anlamlı miktar olarak az olsa da anlamlı derecede traskriptin miktarı belirlenmiştir. En çok abdomen de transkript bulunmuştur, daha sonra malpigi tüpü ve testislerde miktar olarak varlığı saptanmıştır.

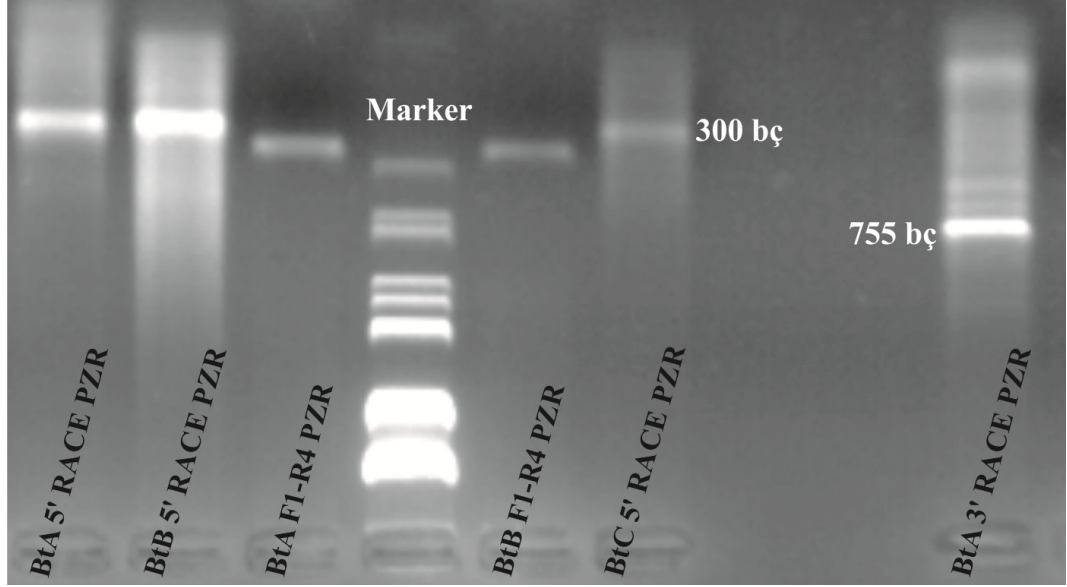
Çizelge 5. Total bireylerden ve BtA etiketli bireyin farklı dokularındaki elde edilen cDNA`ların *globin* geni ifadenme profili.

Örnek	Ct Değerleri	Örnek	Ct Değerleri
<i>BtA</i>	32,99	<i>BtAToraks</i>	Belirlenemedi
<i>BtB</i>	33,59	<i>BtA Abdomen</i>	32,72
<i>BtC</i>	35,82	<i>BtAMalpigi Tüpü</i>	33,28
<i>BtD (Nested)</i>	10,25	<i>BtA Testis</i>	35,88
<i>BtE</i>	31	<i>BtA Bacak</i>	Belirlenemedi
<i>GAPDH</i>	29.15	<i>BtA Kafa</i>	Belirlenemedi
		<i>GAPDH</i>	28.68

3.5. RACE Sistem

Çalışma kapsamındaki türde genin varlığı ve ifadenme örüntüsü belirlendikten sonra genin moleküler karakterizasyonuna yönelik analizler için 5` ve 3` RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) sistemine başvurulmuştur. Bu kapsamda GLBRTF1 ve GLBRTR4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen 5` RACE sistemde 300 bç uzunluğunda, 3` RACE sistemde ise 755 bç uzunluğunda PZR ürünleri elde edilebilmiştir (Şekil 12). Elde edilen PZR ürünlerinin dizilemeleri hizmet alımı kanalıyla gerçekleştirildikten sonra hizalama uygulamaları CodonCodeAligner programı ile yapılmıştır. Diziler işlendikten sonra anotasyon işlemleri yapılarak *globin* geninin kodlama yapan bölgesinin tamamına ve genin öncesinde ve sonrasında bulunan olası kontrol elementlerinin (CpG adası, PolyT kuyruğu, TATA

kutusu benzeri yapılar, birden fazla sonlanma sinyali) dizisine ulaşılmıştır. Sonuç olarak RACE sistem yardımıyla *globin* genine ait toplamda 1055 bç uzunluğunda bir nükleotid dizisi elde edilmiştir.



Şekil 12. RACE sistem sonucu elde edilen PZR ürünlerinin % 0,8'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri (Belirteç: Thermo Scientific Lambda DNA / EcoRI Marker).

3.6. *Globin* Genin Moleküler Düzeyde Karakterizasyonu

3.6.1. Nükleotid Düzeyinde Analizler

RACE sistem yaklaşımı ile elde edilen 1055 bç uzunluğundaki nükleotid dizisi içerisinde genin ATG (Methionin) kodonu ile başlayan ve TGA (stop kodonu) kodonu ile son bulan 516 bç uzunluğunda açık okuma çerçevesine sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 13). Açık okuma çerçevesindeki nükleotid dizilerinden amino asit dizisine dönüştürülmesi sonucunda 171 amino asit uzunluğunda amino asit zinciri belirlenmiştir.

>*Bombus terrestris* globin Geni Açık Okuma Çerçevesi ve Amino Asit Dizisi

Sekans : ATGGGAACGTTTCCTTCGTTTTTTTCGGATTCTCGTCATCGGACGATAACAGAATCGATGAAGCTACAGGGT
A. a. dizisi: M G T F L R F F G F S S S D D N R I D E A T G

Sekans : TGACGGAGAAACAGAAGAAATTAGTGCAGAACACGTGGGCCGTTATCAGAAAGGACGAGGTGGCTTCC
A. a. dizisi: L T E K Q K K L V Q N T W A V I R K D E V A S

Sekans : GGGATTGCCGTGATGACCACATTCTTAAAACATATCCAGAATATCAGCGATATTTAGCGCTTTCGCGGA
A. a. dizisi: G I A V M T T F F K T Y P E Y Q R Y F S A F A D

Sekans : CGTTCGGTTCGACGAATTGCCGGCTAATAAACGGTTTCAAGCTCATTGTGTCAGCGTAATTACGGCCTTA
A. a. dizisi: V P F D E L P A N K R F Q A H C V S V I T A L

Sekans : AATAGTGTATCGATTCTTGCACGACCCAGGATTAATGGAGGCGAGCCTAATCAGCTTGGGCGAGAGG
A. a. dizisi: N S V I D S L H D P G L M E A S L I S L G E R

Sekans : CATAAAAGACGTGGCCAAACGAAAGAAGAAATTTGAGAATTTGAAAGGAGTAGTGTGAAAGTGCTTTC
A. a. dizisi: H K R R G Q T K E E F E N L K G V V L K V L S

Sekans : TCAAGCACTAGGGAAACAATACACACCGGAAGTGGCCGAGGCGTGGAGCAAAACCTTGGACGGGGTA
A. a. dizisi: Q A L G K Q Y T P E V A E A W S K T L D G V

Sekans : TTGCGAAGATATATCAGGTTTTCTCTCTTGA
A. a. dizisi: F A K I Y Q V F S S *

Şekil 13. *B. terrestris* globin geni açık okuma çerçevesi ve nükleotid dizilerinden elde edilen amino asit dizisi

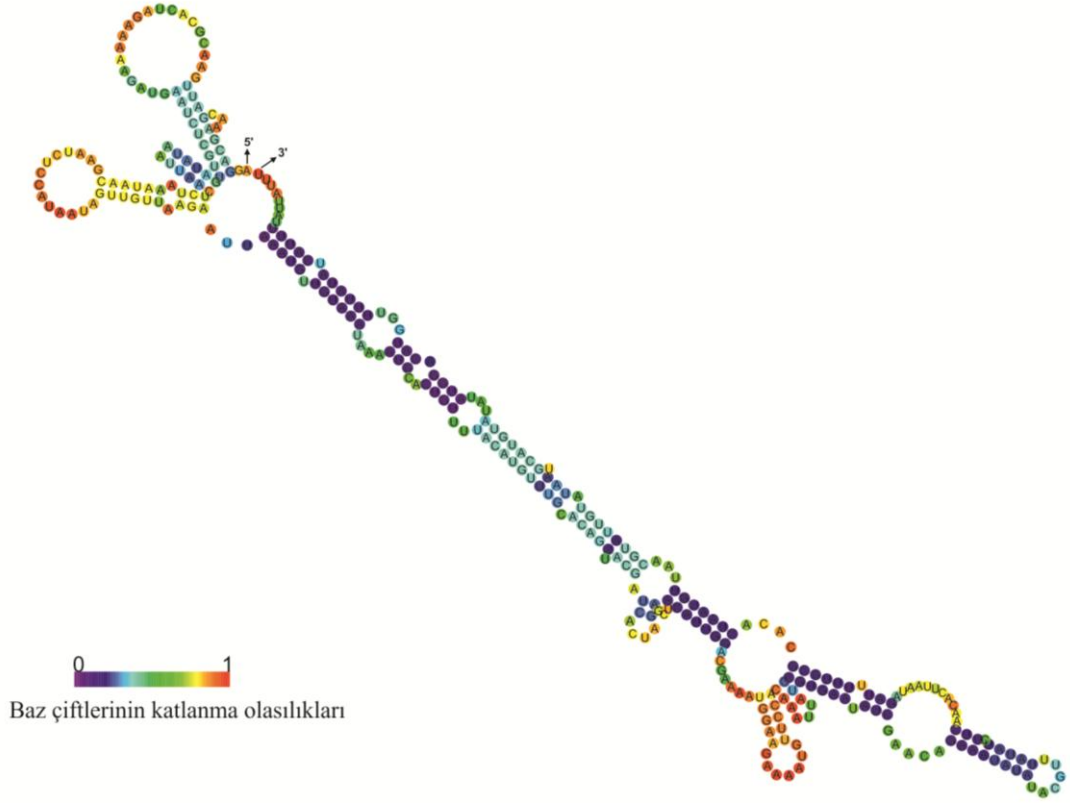
Gen dizisinin öncesinde ve sonrasında bulunan ve genin kontrol elementleri olarak kabul edilen CpG adaları, PoliA yapısı gibi motifler nükleotid dizi bilgisi üzerinden "Sequence Manipulation Suite" ve "The LiLab Department of Urology, UCSF, Meth Primer" veritabanlarındaki analizlerle standart değerler kullanılarak tahmin edilmiştir (Şekil 14). Buna göre 41. ve 191. bazlar arasında minimum %50 GC içeriğine sahip transkripsiyon başlama sinyali motifi belirlenmiştir. 231. baz ile 744. bazlar arasında kalan bölgenin açık okuma çerçevesini içeren bölge olduğu belirlenmiştir.

ACCGCGTGGTATTAGTAGTACATAGCGACGATCAAGCGGAGGGGTGGATTTAAAAATAGCATTAGATACAT
AGGCAGTGCCGTCAGTCGGACTCGAAGAACGAGTAGTCGTTCGTCCAACCGTGTCAGCGATTGAGCGAATT
GAAACGACAGTACGTGGCACGTGACATATCATACAGAATTACGGGTTTCGTTCTTTTTCGACGATATCTG
 GCCACCGAACATGGGAACGTTCCTTCGTTTTTTTCGGATTCTCGTCATCGGACGATAACAGAATCGATGAA
GCTACAGGGTTGACGGAGAAAACAGAAGAAATTAGTGCAGAACACGTGGGCCGTTATCAGAAAAGGACGAGG
TGGCTTCCGGGATTGCCGTGATGACCACATTCTTTAAAACATATCCAGAATATCAGCGATATTTTAGCGC
TTTCGCGGACGTTCCGTTTCGACGAATTGCCGGCTAATAAACGGTTTCAAGCTCATTGTGTCAGCGTAATT
ACGGCCTTAAATAGTGTTATCGATTCCTGCACGACCCAGGATTAATGGAGGCGAGCCTAATCAGCTTGG
GCGAGAGGCATAAAAAGACGTGGCCAAACGAAAGAAGAATTTGAGAATTTGAAAGGAGTAGTGTGAAAAGT
GCTTTCTCAAGCACTAGGGAAACAATACACACCGGAAGTGGCCGAGGCGTGGAGCAAAAACCTTGGACGGG
GTATTTGCGAAGATATATCAGGTTTTCTTCTTGAAGGACGAAACGATTGAACGCACTAGAAAAAGATG
AATCTCGTTGATATAATTAACTCTAAATAACCGAATCTCCATAATAGTTGTTAAGAATTAAATGTTGTAAA
TAAAATGCACTGTTTTACATGTTTGCACAGTTACGATCACTAGAGCTACATTGGACGAAAATGGAAGAAA
ATGTTCCACAAATTATCCGTGAATATCGAACAGAAATATATACGTTTATATCTTCAACACTTAATAGATTTTTGC
GCACACTAATGTTAACGTATTGTATAATGCATGTATATATGGACATGGTTTTATATCATTTTATTATTTT

- | | |
|---|---|
| Olası CpG Adaları | Sonlanma Kodonu |
| Başlama Kodonu | Poly A Benzeri Yapılar |
| Açık Okuma Çerçevesi | |

Şekil 14. *B. terrestris globin* geni açık okuma çerçevesi, genin öncesinde ve sonrasında bulunan genin kontrol bölgelerinin nükleotid dizileri.

3` RACE sistem ile elde edilmiş DNA bölgesinin Serbest Gibbs Enerjisi bakımından kararlı olası sekonder yapısı RNAfold Web Server ile çizilmiştir. -41.30 kcal/mol minimum serbest enerjisine sahip nokta-virgül (dot-bracket) anotasyonu ile çizilen optimal sekonder yapının anlamlı bir yapı sergilediği belirlenmiştir. Çizilen sekonder yapı Şekil 15`te verilmiştir.



Şekil 15. 3` RACE sistem ile edilen genin 3` ucundan elde edilen dizinin termodinamik açıdan kararlı sekonder yapısı.

3.6.2. Amino asit Düzeyinde Analizler

Nükleotid düzeyinde genin karakterizasyonuna yönelik analizlere ek olarak genin amino asit dizisi ise standart kodon çizelgesi kullanılarak saptanmıştır (Çizelge 6). Amino asit dizisi belirlendikten sonra gende kodlanan amino asitlerin sayısı ve yüzdesi hesaplanmış olup en çok alanin (14, % 8,19), lösin (14, % 8,19), serin (14, % 8,19) ve valin (14, % 8,19) amino asitlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 6). Bu amino asitler toplamda gendeki amino asitlerin % 32,76`lık bir kısmına denk gelmektedir. Diğer taraftan olası globin geninde en az oranda temsil edilen amino asitler ise sistein (1) ve triptofan(2) amino asitleri olup temsil oranları sırasıyla % 0,58ve % 1,17 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 6. *B. terrestris* globin geninden elde edilen amino asit dizisinde kullanılan amino asitler, zincirde bulunma sayıları ve kullanım yüzdeleri

Amino Asit	Zincirde Bulunma Sayısı	Yüzdesi
Ala(A)	14	8,19
Cys(C)	1	0,58
Asp(D)	9	5,26
Glu(E)	12	7,02
Phe(F)	13	7,60
Gly(G)	10	5,85
His(H)	3	1,75
Ile(I)	7	4,09
Lys(K)	13	7,60
Leu(L)	14	8,19
Met(M)	3	1,75
Asn(N)	5	2,92
Pro(P)	5	2,92
Gln(Q)	8	4,68
Arg(R)	8	4,68
Ser(S)	14	8,19
Thr(T)	11	6,43
Val(V)	14	8,19
Trp(W)	2	1,17
Tyr(Y)	5	2,92
Toplam: 171 a.a.		%100

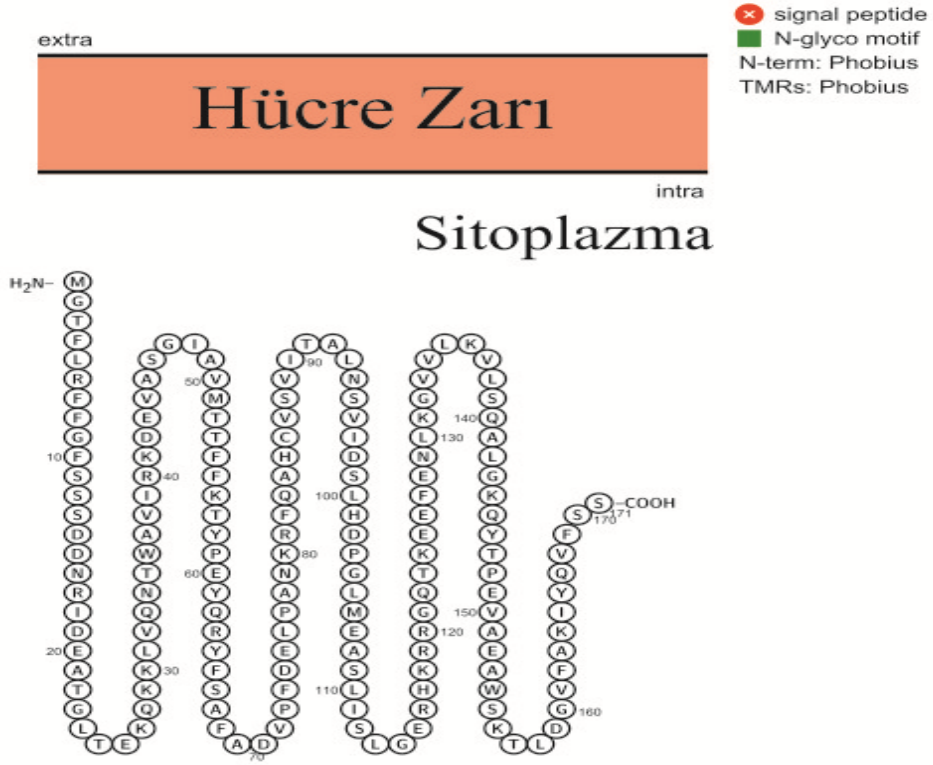
Amino asitlerin kodlanmasına yönelik hesaplanan görecel sinonim kodon kullanım eğilimleri Çizelge 7`de verilmiştir. Buna göre en çok kullanılan amino asit UUC kodonu (7 kez) ile Fenilalanin amino asididir. Valin (V), Aspartik Asit (D), Glutamik Asit (E) 6 kez ifade edilerek en çok kullanılan kodonlardandır.

Çizelge 7. Amino asitlerin kodlanmasına yönelik hesaplanan görecel sinonim kodon kullanım eğilimleri.

Göreceli Sinonim Kodon Kullanımı(RSCU)											
Kodon	Sayı	RSCU	Kodon	Sayı	RSCU	Kodon	Sayı	RSCU	Kodon	Sayı	RSCU
UUU(F)	6	0,92	UCU(S)	3	1,29	UAU(Y)	4	1,6	UGU(C)	1	2
UUC(F)	7	1,08	UCC(S)	2	0,86	UAC(Y)	1	0,4	UGC(C)	0	0
UUA(L)	3	1,29	UCA(S)	1	0,43	UAA(*)	0	0	UGA(*)	1	3
UUG(L)	7	3	UCG(S)	2	0,86	UAG(*)	0	0	UGG(W)	2	1
CUU(L)	2	0,86	CCU(P)	0	0	CAU(H)	2	1,33	CGU(R)	2	1,5
CUC(L)	0	0	CCC(P)	0	0	CAC(H)	1	0,67	CGC(R)	0	0
CUA(L)	2	0,86	CCA(P)	2	1,6	CAA(Q)	4	1	CGA(R)	1	0,75
CUG(L)	0	0	CCG(P)	3	2,4	CAG(Q)	4	1	CGG(R)	1	0,75
AUU(I)	2	0,86	ACU(T)	0	0	AAU(N)	3	1,2	AGU(S)	1	0,43
AUC(I)	4	1,71	ACC(T)	2	0,73	AAC(N)	2	0,8	AGC(S)	5	2,14
AUA(I)	1	0,43	ACA(T)	4	1,45	AAA(K)	10	1,54	AGA(R)	3	2,25
AUG(M)	3	1	ACG(T)	5	1,82	AAG(K)	3	0,46	AGG(R)	1	0,75
GUU(V)	4	1,14	GCU(A)	5	1,43	GAU(D)	3	0,67	GGU(G)	0	0
GUC(V)	1	0,29	GCC(A)	4	1,14	GAC(D)	6	1,33	GGC(G)	2	0,8
GUA(V)	3	0,86	GCA(A)	1	0,29	GAA(E)	6	1	GGA(G)	4	1,6
GUG(V)	6	1,71	GCG(A)	4	1,14	GAG(E)	6	1	GGG(G)	4	1,6

3.6.3. Amino Asit Sekonder Yapı Tahmin ve Analizleri

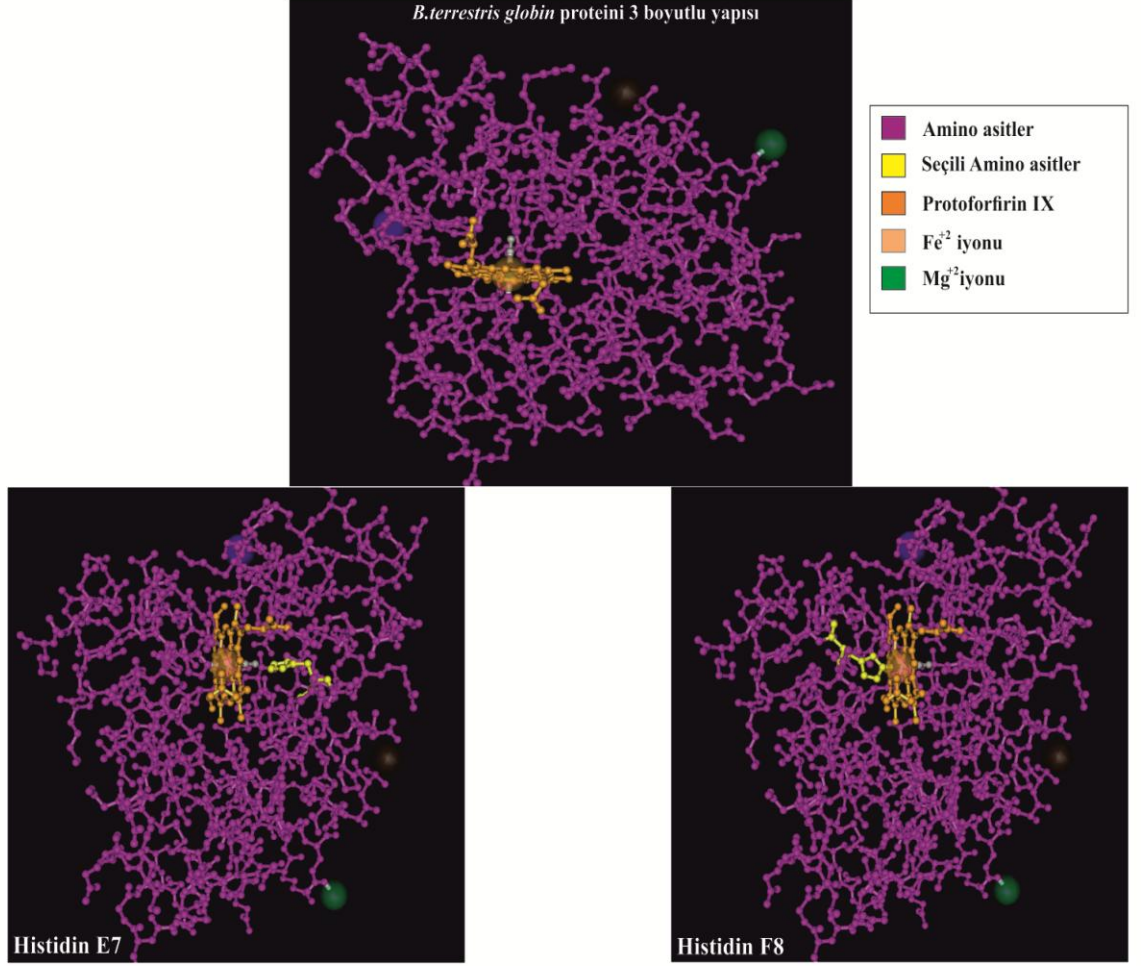
Olası globin geninin kodon kullanım eğilimine ek olarak amino asit dizisinin sekonder yapı tahminleri ise "1D Protein Structure Prediction Server" ve "UCL Department of Science Bioinformatics Group" veritabanları yardımıyla analiz edilmiştir. Katlanma tipine göre yapılan analizler sonucunda çalışma kapsamındaki genin *globin* benzeri bir gen olduğu saptanmıştır (Şekil 16). Yapısal sınıflandırma analizlerine göre sekonder yapısının α -helikslerden oluştuğu ve heliks sayısının ise 8 olduğu belirlenmiştir. Zincirin sekonder yapı kompozisyonunda heliks, düz zincir ve loop oranları sırasıyla heliks = %67,3; düz zincir = % 2,9; loop= % 29,8 olarak tahmin edilmiştir.



Şekil 17. PROTTER veri tabanında yapılan lokalizasyon analizi sonucu proteinin olası hücredeki konumunun sitoplazma olabileceğinin şekilsel gösterimi.

Çalışma kapsamında *B. terrestris* türünden elde edilen olası *globin* geni ürününün 19,27 kDa ağırlığında bir protein olduğu ve proteinin izoelektrik (pI) noktasının ise pH= 7.60 olduğu saptanmıştır. Proteinin GRAVY (Grand average of hydropathicity index) değeri -0,241 olarak hesaplanmıştır. GRAVY değeri sıfırdan küçük olduğu için (Kyte ve Doolittle, 1982) proteinin genel olarak hidrofilik karakterde bir protein olduğu belirlenmiştir. *Bu globin* proteinin olası 3 boyutlu yapısı ise *D. melanogaster* ve *A. mellifera* globin proteinleri kullanılarak karşılaştırılmalı olarak Cn3D 4.3.1 programı yardımıyla çizilmiştir. Proteinin fonksiyonu belirlemede önemli görevleri olan Histidin E7, Histidin F8, Prolin, Fenilalanin gibi amino asitlerin konumu 3 boyutlu yapısında belirtilmiştir (Şekil 18).

3.6.4. Protein 3 Boyutlu Yapı Analizleri



Şekil 18. *B. terrestris* globin proteininin Cn3D 4.3.1 programı yardımıyla çizilen 3 boyutlu yapısı ve proteinin fonksiyonunda görevleri olan Histidin E7 ve Histidin F8 amino asitlerin proteindeki olası konumu.

Ayrıca 3 boyutlu yapı çalışmalarında proteinin yüzeyinde olası etkileşim bölgeleri PredictProtein veritabanında ISIS (interaction sites identified from sequence)(Ofran ve Rost, 2007) yöntemiyle belirlenmiştir. Genin amino asit dizisindeki 1. ve 5. amino asitler arası (Met, Gly, Thr, Phe, Leu), 7.(Phe), 15. (Asp), 42. (Asp), 57. (Thr), 115. (Glu) amino asitler ve 118. (Lys)ve 120. amino asitlerin (Arg) protein yüzeyinde olası etkileşim ve bağlanma bölgesi olduğu belirlenmiştir.

Analizlerde referans alınan *A. mellifera* türüne ait *globin* geni ile bu çalışma kapsamında elde edilen *B. terrestris*globin geni arasındaki amino asit değişimlerinin korunmuşluk oranları göreceli yer değiştirme sıklığı algoritması kullanılarak

(Grantham, 1974) hesaplanmıştır. İki *globin* geninin karşılaştırılması sonucunda gözlenen korunmuş ve radikal amino asit değişimleri *D değeri* üzerinden hesaplanmıştır (Çizelge 8). *D değeri*, $D_{ij} = [\alpha (c_i - c_j)^2 + \beta (p_i - p_j)^2 + \gamma (v_i - v_j)^2]^{1/2}$ (c = kompozisyon, i çerik, p = polarite, and v = moleküler hacim) formülü ile hesaplanabilen bir değer olup amino asitler arasında uzaklığa dayanan bir metottür. Hesaplamalara göre $D_{cpv} = 100$ değeri eşik kabul edilmiştir ve standart bir çizelge oluşturularak amino asitlerin birbirine dönüşümünün korunmuş mu, yoksa radikal bir değişiklik mi olduğu belirlenerek standartize edilmiştir. *D değeri* 100` den küçük ise değişim korunmuş, büyük ise radikal bir değişim olarak kabul edilir. Buna göre iki türün genleri arasında toplamda 29 amino asit değişimi belirlenmiş olup bu değişimlerden 25 tanesi korunmuş amino asit değişimleri şeklindedir. Bu durum iki türün *globin* genleri arasında gözlenen amino asit değişimlerinin büyük çoğunluğunun proteinin karakterinde önemli bir değişime neden olmayacağına işaret etmektedir. Ancak, amino asit değişimleri arasında proteinin karakterinde olası farklılıklara yol açabilecek radikal değişimler ise dört tane olup serin ile fenilalanin, glisin ile valin, serin ile arjinin ve glisin ile metionin arasında oldukları belirlenmiştir.

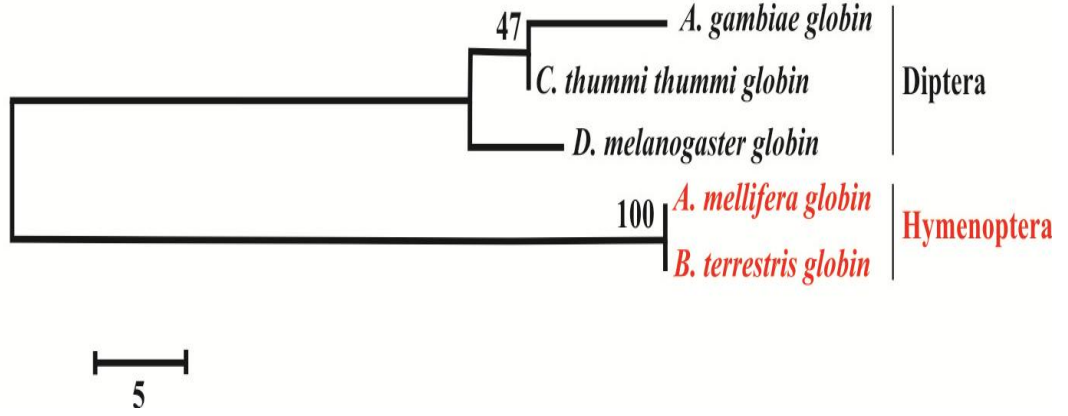
Çizelge 8. *A. mellifera* türüne ait *globin* geni ile bu çalışma kapsamında elde edilen *B. terrestris* *globin* geni arasındaki amino asit değişimlerinin korunmuşluk oranlarının göreceli yer değiştirme sıklığı algoritması kullanılarak (Grantham, 1974) hesaplanması (sarı renk ile işaretlenen değişimler radikal değişim olarak gösterilmiştir).

<i>B.terrestris</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>D değeri</i>
F (Phe)	L (Leu)	22
F (Phe)	I (Ile)	21
E (Glu)	Q (Gln)	29
K (Lys)	R (Arg)	26
I (Ile)	V (Val)	29
T (Thr)	A (Ala)	58
T (Thr)	K (Lys)	78
S (Ser)	T (Thr)	58
A (Ala)	M (Met)	84
V (Val)	T (Thr)	69
F (Phe)	L (Leu)	22
D (Asp)	N (Asn)	23
V (Val)	A (Ala)	64

S (Ser)	G (Gly)	56
S (Ser)	N (Asn)	46
S (Ser)	F (Phe)	155
S (Ser)	G (Gly)	56
G (Gly)	V (Val)	109
R (Arg)	K (Lys)	26
E (Glu)	Q (Gln)	29
G (Gly)	E (Glu)	98
V (Val)	M (Met)	21
K (Lys)	E (Glu)	56
S (Ser)	R (Arg)	110
S (Ser)	N (Asn)	46
G (Gly)	M (Met)	127
V (Val)	M (Met)	21
A (Ala)	G (Gly)	60
S (Ser)	A (Ala)	99

3.7. Filogenide Kullanımına Yönelik Analizler

Bu amaçla Hymenoptera ve Diptera takımlarına ait *globin* geni belirlenmiş olan dört türün *globin* geninin amino asit dizileri ile bu çalışma kapsamında saptanmış olan *B. terrestris* türü olası *globin* geninin amino asit dizisi CLUSTAL W algoritmasına başvurularak hizalanmıştır (Şekil 19). Hizalama sonucunda açığa çıkan örüntü üzerinden *globin* proteinin karakteristik bölgelerinin korunmuşluk düzeyi farklı renklendirmeler kullanılarak şekil üzerinde gösterilmiştir. Buna göre türler arasındaki korunmuşluk düzeyinin belirlenmesine ek olarak, fonksiyonel anlamda önemli bir bulgu olarak kabul edilebilecek bir diğer korunmuş motif ise genin protoporfirin halkası ile ilgilidir. Beş türün *globin* geni amino asit dizilerinin hizalanması sonucunda proteinin protoporfirin halkasına oksijen (O₂) molekülünün oksidasyonla değil oksijenasyonla bağlanmasını sağlayan histidin E7 ve histidin F8 amino asitlerinin korunmuş olduğu belirlenmiştir (Şekil 19). Aynı zamanda proteinin üç boyutlu yapısının oluşmasında görev alan fenilalaninve prolin amino asitlerinin korunmuşluğu da bu hizalama sonucunda açığa çıkmıştır (Şekil 19).



Şekil 20. Analiz edilen türlerin *globin* geni nükleotid dizisinin kullanılması sonucunda inşa edilen maksimum likelihood (ML) ağacı.

B. terrestris türünde *globin* geninin fonksiyonel olup olmadığının çıkarılmasına yönelik analizlere ek olarak gen üzerine seçilim baskısının işleyip işlemediği de araştırılmıştır. Bu amaçla beş farklı tür arasında hem nükleotid hem de amino asit dizileri üzerinden *p-distance* değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 9).

Çizelge 9. Analiz edilen türlerin *globin* geni nükleotid ve amino dizilerinin kullanılması sonucunda elde edilen nükleotid ve amino asit *p-distance* değerlerinin çizelgesi.

Globin Geni Karşılaştırılan Tür Çiftleri		<i>p-distance</i>(Nükleotid Düzeyinde)	<i>p-distance</i>(Amino asit Düzeyinde)
<i>D.melanogaster</i>	<i>A.mellifera</i>	0,526	0,718
<i>D.melanogaster</i>	<i>B.terrestris</i>	0,533	0,710
<i>A.mellifera</i>	<i>B.terrestris</i>	0,143	0,191
<i>D. melanogaster</i>	<i>A.gambiae</i>	0,602	0,779
<i>A.mellifera</i>	<i>A.gambiae</i>	0,558	0,656
<i>B.terrestris</i>	<i>A.gambiae</i>	0,543	0,679
<i>D. melanogaster</i>	<i>C.thummi</i>	0,551	0,748
<i>A.mellifera</i>	<i>C.thummi</i>	0,568	0,748
<i>B.terrestris</i>	<i>C.thummi</i>	0,568	0,786
<i>A.gambiae</i>	<i>C.thummi</i>	0,615	0,779

Analiz edilen bireylerin *globin* geni nükleotid dizileri üzerinden DAMBE programı kullanılarak doygunluk indekslerine bakılmıştır (Çizelge 10). Observed saturation index (Gözlenen doygunluk indeksi, I_{ss}) ve Critic index value (Kritik indeks değeri, $I_{ss,c}$) parametrelerinin $I_{ss} \geq I_{ss,c}$ karşılaştırması yapılarak olası değişimlerin veya mutasyonların etki düzeylerini belirlemeye yönelik analizler yapılmıştır. Analiz iki takım arasında ve takımlar içerisinde yürütülmüştür. Diptera ve Hymenoptera takımlarının tüm bireyleri ($0,8343 \geq 0,7776$) ve sadece Diptera takımının bireyleri ($0,9594 \geq 0,8048$) analiz edildiğinde ciddi yer değiştirme doygunluğu olduğu, Hymenoptera takımının bireylerinde ($0,1921 \geq 0,8205$) ise genin doygunluğa ulaşmadığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 10. Analiz edilen bireylerin tamamında, takım bazında yapılan *globin* geni nükleotid dizileri üzerinden DAMBE programı kullanılarak yapılan doygunluk indeksleri.

Doygunluk indeksi (Tüm bireyler)	
I_{ss}	0,8343
$I_{ss,c}$	0,7776

Doygunluk indeksi (Hymenoptera)	
I_{ss}	0,1921
$I_{ss,c}$	0,8205

Doygunluk indeksi (Diptera)	
I_{ss}	0,9594
$I_{ss,c}$	0,8048

Globin geni nükleotid dizi verileri üzerinden transisyonel/transversiyonel mutasyon oranları "general time reversible model" ile gama dağılımı kullanılarak yapılan analiz sonucu Çizelge 11`de verilmiştir. Transisyonel mutasyon oranlarının [A-G (17,0929), G-A (17,7906), T-C (11,5327), C-T (11,6078)] yüksek; transversiyonel mutasyonların ise [A-T (1,5037), A-C (5,7081), T-A (1,8181), T-G (4,1337), C-A (4,9464), C-G (9,8678), G-T (3,5585), G-C (8,4398)] düşük oranda olduğu saptanmıştır. En fazla değişiminin G-A değişimi, en az değişiminin ise A-T olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 11. *Globin* geni nükleotid dizi verileri üzerinden transisyonel/transversiyonel mutasyon oranları

	A	T	C	G
A	-	1,5037	5,7081	17,0929
T	1,8181	-	11,5327	4,1337
C	6,9464	11,6078	-	9,8678
G	17,7906	3,5585	8,4398	-

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

B. terrestris total bireylerinden yapılan RNA izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen RT-PZR ve real-time PZR uygulamalarıyla genin mRNA düzeyinde ifade edilip edilmediği araştırılmıştır. Böylece genin ilgili türün genomunda kalıntı halinde, atıl olarak mı bulunduğu yoksa fonksiyonel olarak ifade mi edildiği araştırılmıştır. Farklı PZR teknikleriyle gen ifadesinin varlığının ve düzeyinin araştırılması sonucunda, genin transkribe olduğu ve fonksiyonel bir mRNA ünitesine dönüştürüldüğü öngörülmüştür (Şekil 10) . Gen ifadesinin varlığı saptandıktan sonra, genin hangi dokularda ifade edildiğinin belirlenebilmesi için türün farklı vücut kısımlarından RNA izolasyonları yapılmış ve sonrasında RT-PZR ve real-time PZR uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama için; enerji, dolayısıyla da oksijen ve solunum ihtiyacının fazla olduğu toraks kısmından, termoregülasyonla ilişkili testis, malpigi tüpü gibi dokuları içeren abdomen kısmından ve geriye kalan baş kısmından ayrı ayrı her bir uygulama tekrarlanmıştır. Bu uygulamaların sonucunda türün abdomen kısmında, bu kısmın da yoğun yağ dokusu, malpigi tüpü ve testis gibi vücut ısısının korunmasında görevli doku ve organlarda genin ifade edildiği belirlenmiştir (Çizelge 5). Metabolik olarak aktivitenin yüksek olduğu dokularda ve oksijenin depolanma ihtiyacının yüksek dokularda ifade edilmesinin bu transkriptin ya da proteinin oksijen depolanmasında görevli olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Diğer dokularla yapılan uygulamaların sonucunda ise genin vücudun bu kısımlarında ya ifade edilmediği ya da belirlenemeyecek düzeyde az ifade edildiğinden saptanamadığı kanısına varılmıştır (Çizelge 5). İfadeleme düzeylerinin az miktarda bulunmasının globin proteinin sitoplazmada hegz-form olarak bulunduğu için proteinin yarılanma ömrünün uzun olduğu ve bu nedenle transkripsiyonun eser miktarda olduğunu söyleyebiliriz (Trent III ve ark., 2002). Ayrıca Hegza formun yapının ısı ve pH kararlılığını artırdığı için globinin hücre içi ve sıcaklık ve pH değişiminin neden olduğu ekstrem koşullarda dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir (Hamdane ve ark., 2003; Picotti ve ark., 2009). Bu bilgiler doğrultusunda globin proteinin termoregülasyonda etkili bir protein olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular ile tutarlı olarak, *A. mellifera* türünde yapılan *globin* geni ifadeleme profili çalışmaları sonucunda trake sistemi, testisler ve malpigi tüpünde *globin* geninin diğer dokulara oranla daha fazla ifade edildiği saptanmıştır (Hankeln ve ark., 2006). Bu

dokuların sıcaklığın düzenlenmesinde ya da sıcaklıktan doğrudan etkilenen dokular olması, ilgili gen ürününün sıcaklığın düzenlenmesinde görev aldığı hipotezini desteklemektedir (Hankeln ve ark., 2006). *Bombyx mori* (Lepidoptera) ve *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera) türlerinde yapılan *globin* geni karakterizasyonu ve gen ifade düzeylerinin saptanmasına yönelik araştırmalar (Kawaoka ve ark., 2009) da, *A. mellifera* türünde yürütülen çalışma ile benzerlik sergilemektedir. İki Lepidoptera türünde de 170 amino asitlik bir transkriptin kodlandığının saptanması, Hymenoptera ve Lepidoptera türleri *globin* genlerinde önemli bir benzerliğe işaret etmektedir. Bu çalışmada ayrıca, genin daha fazla ifade edildiği bölgelerin trake sistemi, malpigi tüpü, yağ doku ve deri olduğu belirlenmiştir (Kawaoka ve ark. 2009). Bu dokuların doğrudan ve/veya dolaylı olarak sıcaklık parametresinin düzenlenmesinde rol aldığı göz önünde bulundurulduğunda *globin* gen ürününün termoregülasyonda ve oksijen depolamada görevli olabileceği savı güçlenmektedir (Kawaoka ve ark., 2009). Diğer taraftan *C. tentans* (Diptera) türünde farklı sıcaklıklara sahip ortamlarda ve hipoksi (oksijence az) ya da hiperoksi (oksijence bol) stres koşullarında *globin* geninin ifade edilme oranları karşılaştırılmıştır (Lee ve ark., 2006). Bu karşılaştırma sonucunda, transkript miktarının artan sıcaklığa bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgu globin proteininin sıcaklığın düzenlenmesinde rol aldığı görüşünü desteklemektedir. Aynı zamanda hipoksi ortamdan hiperoksi ortama geçerken transkript miktarının da arttığı gözlenmiştir (Lee ve ark., 2006). Bu da, *C. tentans* globin proteinin tıpkı miyoglobinde olduğu gibi oksijen depolamada görev alabileceği düşüncesini oluşturmuştur (Lee ve ark., 2006). Benzer şekilde, *D. melanogaster* (Diptera) türünde de oksijen miktarına bağlı olarak *globin* geni ifadesi çalışmasıyla gen ürününün oksijenin depo edilmesinde görevli olduğuna işaret edilmiştir (Gleixner ve ark., 2006). Ayrıca *laktat dehidrojenaz (LDH)* geni ile karşılaştırmalı ifade çalışmaları, globin proteininin zararlı reaktif oksijen türevlerinin detoksifiye edilmesinde görevli olabileceğine işaret etmiştir (Gleixner ve ark., 2006). Literatürde yapılan *globin* geni ifade ve moleküler karakterizasyon çalışmaları ile *B. terrestris globin* geni üzerine yapılan bu çalışma benzer sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar da, ilgili türün *globin* geninin diğer böcek *globin* genleriyle paralel yapı ve fonksiyonda olduğunu göstermiştir. Buna göre, *B. terrestris* türü *globin* gen ürünü termoregülasyon, oksijen depolanması, zararlı oksijen bileşenlerinin detoksifiye edilmesi gibi fonksiyonlara sahip olabilir. Doku düzeyinde yapılan ifadeye yönelik bulgularımız da bu düşüncayı destekler nitelikte sonuçlar vermiştir (Çizelge 5).

5` ve 3` RACE sistem ile genin açık okuma çerçevesinin saptanmasıyla beraber, genin öncesinde ve sonrasında bulunan olası kontrol bölgelerinin dizilenmesi sonucunda CpG adaları, olası sonlanma sinyallerinin saptanması sağlamıştır. Bu komşu bölgelerin saptanmasıyla, gen ifadesinin kontrolünde fonksiyonel olabileceği düşünülen sekonder yapılar da açığa çıkarılmıştır (Şekil 15). Bu sayede gen dışındaki DNA dizilerinin kodlama yapmayan atıl DNA olduğu düşüncesinin aksine, bir protein ürünü oluşturmasa da gen ifadesinin ve bu ifade düzeyinin kontrolünü sağlayan DNA dizileri olabileceği düşüncesi desteklenmektedir. Bu dizilerin bir genin susturulması, aktive edilmesi, ifade oranının değiştirilmesi, replikasyon ve transkripsiyon sırasında görev alan protein ve komplekslerin olası etkileşim bölgelerini içermesi; bu DNA dizilerinin, genin açık okuma çerçevesi, amino asit dizisi ve proteini kadar önem arz eden bölgeler olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle bir genin moleküler karakterizasyonu çalışmalarında bu yapılar dikkate alınmalı ve beraber değerlendirilmelidir.

Kontrol bölgelerini içeren bu yapıların belirlenmesine yönelik RACE sistem uygulamaları sonrasında, ilgili türün *globin* geninin ORF bölgesi dışında 5` ucundan 225 baz, 3` ucundan ise 314 baz dizilenebilmiştir. 5` ucunda yaklaşık % 50 G+C içeriğine sahip transkripsiyon başlamasında ve transkripsiyonun kararlı bir şekilde devam edebilmesinde fonksiyonel, olası CpG adalarının saptanması genin ifade edildiğine dair bir bulgu sunmuştur (Şekil 14). Buna göre, geni çevreleyen transkripsiyon elemanlarının bulunması genin ifade edildiğini ispatlar niteliktedir. 3` ucunda ise transkripsiyonun sonlanmasında sinyal görevi görebilecek diziler aranmıştır. 3` ucundaki 314 bazlık bölgenin olası sekonder yapısı çizildiğinde büyük bir çoğunluğu sarmallardan oluşan, az sayıda loop içeren, termodinamik açıdan oldukça kararlı bir yapının varlığı öngörülmüştür (Şekil 15). Bu yapının, transkripsiyonun sonlanmasında bir sinyal görevi görebileceği, RNA polimeraza ve/veya transkripsiyonda görevli protein veya komplekslere engel oluşturarak transkripsiyon çatal bariyeri olabileceği düşüncesini oluşturmuştur. Böylece, bu DNA bölgelerine gelindiğinde transkripsiyon sterik olarak engellenecek ve bu nedenle de sonlanacaktır. Genin 5` ucundaki CpG adacıkları ve 3` ucundaki olası sinyalleri, bu genin fonksiyonel olabileceği ve bir protein ürünü kodlayabileceği düşüncesini büyük ölçüde destekler niteliktedir. Fakat bulgunun kesin olarak

savunulabilmesi için çalışmanın protein tabanlı analizlerle de yürütülmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Olası transkripsiyon birimi saptandıktan sonra, genin kodlama yapan yani ORF bölgesi incelenmiştir. Öncelikle genin başlama ve sonlanma kodonları belirlenerek 513 bazlık bir açık okuma çerçevesine ve 171 amino asitlik olası bir protein ürününe sahip olabileceği öngörülmüştür (Şekil 13). Bu bulgu, *B.terrestris* türü *globin* proteini ile *A. mellifera* türü *globin* proteininin aynı büyüklükte olduğunu göstermiştir (Hankeln ve ark., 2006). Amino asit kompozisyonu bakımından Serin amino asidinin oranının fazla olması bu proteinin zara yakın veya zarla ilişkili olabilecek bir glikoprotein olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada referans alınan *A. mellifera* türü *globin* geninin amino asit dizisi, göreceli yer değiştirme algoritması kullanılarak değişimlerin korunmuşluğu açısından incelenmiştir. Buna göre *A. mellifera* türü *globin* gen ürününde aminoasit değişimlerinin korunmuş olduğu saptanmıştır (Çizelge 8). Buna göre, değişen aminoasitlerin bulunduğu konuma aynı karaktere sahip amino asitlerin atanması yönünde bir eğilim olduğu söylenebilir. Diğer bir ifade ile yüklü bir amino asidin yerine, değişen amino asidin de aynı karakterde olduğu ya da hidropatik özellik açısından değişen amino asitlerin aynı karakterde olduğu saptanmıştır. Bu da aminoasit düzeyindeki protein korunmuşluğunu arttırmaktadır. Protein korunmuşluğunun artması da proteinin fonksiyonel olduğuna dair öngörüler sunmaktadır. Aynı analizin *B. terrestris* türü *globin* geninin aminoasit dizisi üzerinden yapılmasıyla, *A. mellifera* ve *B.terrestris* globinleri arasında sadece 4 amino asidin korunmuş olamayacağını belirlemiştir (Çizelge 8). Bu değişimler; Ser-Phe (helikslerde yer almıyor), Gly-Val (F5), Ser-Arg (G17), Gly-Met (H15) değişimleridir. Bu farklılıkların proteinin 3 boyutlu yapısında aktif bölgenin oldukça uzağında yer alması, ilgili değişimlerin proteinin karakterine etki etme olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir. Oldukça eski bir evrimsel geçmişe sahip olan *globin* proteinin Hymenoptera takımının bireylerinde hem DNA hem de amino asit dizisi üzerinden yapılan korunmuşluk analizleriyle yüksek korunmuşluk değerlerinin elde edilmesi, bu proteinin ilgili takım içerisinde doyumluğa ulaştığına işaret etmektedir (Çizelge 10). Genin doyumluğa ulaşmış olması ve diğer böcek takımlarında da saptanmış olması bulguları birlikte değerlendirildiği zaman, genin böceklerin en yakın ortak atası tarafından kalıtıldığı, divergent evrim sayesinde fonksiyonel olarak bulunduğu ve olası atasal globin

genleriyle benzer fonksiyona sahip yüksek seçilim baskısı altında bir gen olduğu söylenebilir. Bu çalışma sonucunda genin kalıntı bir form olmaktan ziyade fonksiyonel olduğuna yönelik hem nükleotid hem de ifadelenme yaklaşımlı analiz sonuçları, genin yüksek korunma eğilimine ve ayıklayıcı seçilim baskısına maruz kalması gerektiği savını güçlendirmiştir. Gen üzerine işleyen seçilim baskısı aynı zamanda nükleotid düzeyindeki farklılaşmadan ziyade amino asit düzeyindeki farklılaşmaların daha fazla çıkması ile de doğrulanmaktadır (Çizelge 9).

Kodon kullanım eğrilerinin hesaplanmasının ardından Kyte ve Doolittle (1982)'a göre hidropati indeksi değerinin hesaplanmasıyla GRAVY değerinin (-0,241<0) sıfırdan küçük olması nedeniyle proteinin göreceli olarak hidrofilik karakterde olduğu öngörülmüştür. Proteinin amino asit dizisinde sinyal peptidinin olmaması ile hidrofilik karakterde bir protein olması durumu birlikte değerlendirildiğinde, sitoplazmada lokalize olmuş tıpkı miyogloblin ve sitogloblin gibi bir globin proteini olduğu düşünülmektedir (Hankeln ve ark., 2006; Kawaoka ve ark., 2009).

D. melanogaster ve *A. mellifera* globin proteinleri ile karşılaştırmalı olarak çizilen *globin* proteinin 3 boyutlu yapısında bir globin proteinin karakteristik özelliklerinin korunduğu belirlenmiştir. Genel anlamda 3 boyutlu yapının oksijen bağlanmasında ve taşınmasında görev alan hem grubunda (Protoporfirin IX) oksijenin oksidasyon (kimyasal bağ) yerine oksijenasyonla (fiziksel bağ) bağlanmasını sağlayan belli basınç değerlerinde oksijenin rahatlıkla ayrılmasına ve bağlanmasına imkan veren Histidin E7, Histidin F8, Fenilalanin CD1 amino asitlerinin korunmuşluğu *B. terrestris* türünde de *globin* proteininin oksijen taşınmasında ve özellikle de depolanmasında görevli bir protein olduğu düşüncesini güçlendirmektedir.

Filogenetik Analizler

Literatürde yer alan Diptera ve Hymenoptera takımlarına ait türlerin (*C. thummi thummi*, *A. gambiae*, *D. melanogaster*, *A. mellifera*, *B. terrestris*) *globin* geni amino asit dizileri CLUSTALW algoritması ile hizalandıklarında yapı ve katlanmada önemli yer tutan Prolin, Lösin, Fenilalanin amino asitleri ve oksijen bağlanmasında ve ayrılmasında sterik engel oluşturan Histidin amino asitleri bu iki takımın bireylerinde büyük ölçüde korunmuştur (Kawaoka ve ark., 2009). Nükleotid dizi verisi üzerinden maksimum likelihood algoritması (500 bootstrap) ile yapılan filogenetik ağaçta, Diptera ve Hymenoptera takımına ait bireylerin takım şeklinde

kümelendikleri tespit edilmiştir (Şekil 20). Bu da, ilgili protein ürününü kodlayan genin ilgili takımların en yakın ortak atasından kazanıldığı kanısını oluşturmaktadır. Bu türlerin filogenisi ile globin geni ile yapılan ağacın paralel olması takımların evrimsel tarihleriyle birlikte globin geninin de zamanla değişerek farklılaştığını göstermiştir. Özellikle Hymenoptera takımında yeterli temsili tür ile analiz yapılamamış olsa da, *B.terrestris* ve *A. mellifera*'nın farklı tribuslerde olmasına rağmen *globin* geninin yüksek derece korunmuş olması, bu genin Hymenoptera takımında potansiyel bir moleküler belirteç olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan tüm bireylerde, sadece Diptera türlerinde ve sadece Hymenoptera türlerinde *globin* geni nükleotid dizileri üzerinden doygunluk indekslerine bakıldığında, Observed saturation index (Gözlenen doygunluk indeksi, I_{ss}) ve Critic index value (Kritik indeks değeri, $I_{ss,c}$) parametrelerinin ($I_{ss} \geq I_{ss,c}$) karşılaştırılması sonucu tüm bireyler ve sadece Diptera bireylerinde genin doygunluğa ulaştığı öngörülmüştür (Çizelge 10). Ancak familya içerisinde genin henüz doygunluğa ulaşmadığı öngörülmüştür. Bu ilkin ve çok az sayıda birey üzerinden gerçekleştirilen analiz sonuçları globin geninin familya düzeyinde ideal bir filogenetik belirteç olabileceğine işaret etmektedir. Ancak bu öngörü çok sayıda örnek üzerinden çalışılarak yeniden değerlendirilmelidir.

5. KAYNAKÇA

- Aamodt, R.M.** (2008). The Caste-And Age-Specific Expression Signature Of Honeybee Heat Shock Genes Shows An Alternative Splicing Dependent Regulation Of Hsp90. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129, 632-637.
- Accorti, M., Nannelli, R.** (1990). Oviposition Sequence And Developmental Time Of The Offspring of *Varroa jacobsoni* On Drone Brood Of *Apis mellifera ligustica*. *Apicoltura*, 6, 153-168.
- Al-Ghzaw, A.A., Zaittoun, S.T., Makadmeh, I., Al-Tawaha A.M.** (2003). The Impact Of Wild Bees On The Pollination Of Eight Okra Genotypes Under Semi-Arid Mediterranean Conditions. *International Journal of Agricultural and Biology*, 5, 408–410.
- Anderson, N.H., Cummins, K.W.** (1979). Influences Of Diet On The Life Histories Of Aquatic Insects. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36, 335-342.
- Anderson, T.D., Jin-Clark, Y., Begum, K. Starkey, S.R., Yan Zhu, K.** (2008). Gene Expression Profiling Reveals Decreased Expression Of Two Hemoglobin Genes Associated With Increased Consumption Of Oxygen in *Chironomus tentans* Exposed To Atrazine: A Possible Mechanism For Adapting To Oxygen Deficiency. *Aquatic Toxicology*, 86, 148–156.
- Andrewartha, H.G., Birch, L.C.** (1954). The Distribution And Abundance Of Animals. *University of Chicago Press*, 622-645p, Chicago.
- Bale, J.S., Masters, G.J., Hodkinson, I.D.** (2002). Herbivory In Global Climate Change Research: Direct Effects Of Rising Temperature On Insect Herbivores. *Global Change Biology*, 8, 1–16.
- Bartholomew, G.A., Heinrich, B.** (1978). Endothermy In African Dung Beetles During Flight, Ball Making, And Ball Rolling. *J. Exp. Biol.*, 73, 65-83.
- Bartholomew, G.A., Barnhart, M.C.** (1984). Tracheal Gases, Respiratory Gas Exchange, Body Temperature And Flight in Some Tropical Cicadas. *J. Exp. Biol.*, 111, 131-144.

- Bechera, M.A., Hildenbrandt, H., Hemelrijk, C.K., Moritza, R.F.A.** (2010). Brood Temperature, Task Division And Colony Survival In Honeybees: A model. *Ecological Modelling*, 221, 769-776.
- Borror, D.J., Johnson, N.F., Triplehorn, C.A.** (1989). Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. *Saunders College Publishing*, 875p, Philadelphia.
- Buchan, D.W.A., Minnici, F., Nugent, T.C.O., Bryson, K., Jones D. T.** (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41, 340-348.
- Buchmann, S.L., Nabhan, G.L.** (1996). Nature's Services: Societal Dependence On Natural Ecosystems. *Island Press*, 133-150p, Washington D.C.
- Burchsted A.** (2009). Thermoregulation in Insects.
(<http://suite101.com/article/thermoregulation-in-insects-a130365>).
- Erişim Tarihi: 16.09.2014
- Burmester, T., Weich B., Reinhardt, S., Hankeln, T.** (2000). A Vertebrate Globin Expressed in The Brain. *Nature*, 407, 520-523.
- Burmester, T., Ebner B., Weich, B., Hankeln, T.** (2002). Cytoglobin: A Novel Globin Type Ubiquitously Expressed in Vertebrate Tissues. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 416-421.
- Burmester, T., Hankeln, T.** (2007). The Respiratory Proteins Of Insects. *Journal of Insect Physiology*, 53, 285-294.
- Cameron, S.A., Williams, P.H.** (2003). Phylogeny Of Bumble Bees in The New World Subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): Congruence Of Molecular And Morphological Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28, 552-563.
- Chapman, R.F.** (1998). The Insects: Structure and Function. *Cambridge University Press*, 788p, Cambridge.
- Chapman, J.W., Reynolds, D.R., Brooks, S.J., Smith, A.D., Woiwod, I.P.** (2006). Seasonal Variation In The Migration Strategies Of The Green Lacewing Chrysoperla Carnea Species Complex. *Ecological Entomology*, 31, 378-388.

- Chen, K., Kurgan, L.A., Ruan, J.** (2008). Prediction of Protein Structural Class Using Novel Evolutionary Collocation Based Sequence Representation. *Journal of Computational Chemistry*, 29 (10), 1596-1604.
- Chen, K., Kurgan, L.A.** (2007). PFRES: Protein Fold Classification by Using Evolutionary Information and Predicted Secondary Structure. *Bioinformatics*, 23 (21), 2843-2850.
- Cheung, D.K.B., Marshals, A. L., Webb, D.W.** (2006). Mecoptera of Ontario, Canadian. *Journal of Arthropod Identification*, 1, 1-13.
- Clench, N.S.** (1966). Behavioral Thermoregulation in Butterflies. *Ecology*, 47, 1021–1034.
- Cloudsley-Thompson, J.L.** (1975). The Living Earth Desert Life. *The Danbury Press*, 324p, London.
- Cooper, S.D.** (1984). Prey Preferences And Interactions Of Predators From Stream Pools. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh.*, 22, 1853-1857.
- Dalin P.** (2011). Diapause Induction And Termination in A Commonly Univoltine Leaf Beetle (*Phratora vulgatissima*). *Insect Science*, 18, 443–450.
- Ergenoğlu B.** (2012). *Anopheles gambiae* ve *Apis mellifera* Globinlerinin Klonlanması ve Ön Karakterizasyonu. *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı* (Yüksek Lisans Tezi), 81s, Trabzon.
- Engelhard, E. K., Kam-Morgant, L.N.W., Washburn, J. O., Volkman, L.E.** (1994). The Insect Tracheal System: A Conduit For The Systemic Spread Of Autographa Californica M Nuclear Polyhedrosis Virus. *PNAS*, 91, 3224-3227.
- Erwin, T. L.** (1982). Tropical Forests: Their Richness In Coleoptera And Other Arthropod Species. *The Coleopterists Bulletin*, 36, 74-75.
- Erwin, T.L.** (1997). Biodiversity at its Utmost: Tropical Forest Beetles in Reaka-Kudla, M.L., D.E. Wilson, and E.O. Wilson, Biodiversity II. *Joseph Henry Press*, 27-40p, Washington D.C.
- Ewing, B., Green, P., Wendl, M.C., Green, P.** (1998). Basecalling Of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, 8, 186–194.

- Ewing, B., Hillier L., Wendl, M., Green P.** (1998). Basecalling Of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8, 175–185.
- Freitas, T.A., Saito, J.A., Hou, S., Alam, M.** (2005). Globin-Coupled Sensors, Protoglobins, And The Last Universal Common Ancestor. *J Inorg Biochem.*, 99, 23-33.
- Frohman M.A., Dush M. K., Martin G.R.** (1988). Rapid Production Of Full-Length Cdnas From Rare Transcripts: Amplification Using A Single Gene-Specific Oligonucleotide Primer. *PNAS*, 85, 8998.
- Funke, O.** (1851).Über Das Milzvenenblut. *Z Rat Med*, 1, 172-218.
- Gilbert, N., Raworth, D.A.** (1996). Insects And Temperature A General Theory. *The Canadian Entomologist*, 128, 1–13.
- Gleixner, E., Abriss, D., Adryan, B., Kraemer, M., Gerlach, F., Schuh, R., Burmester T., Hankeln T.** (2008). Oxygen-Induced Changes in Hemoglobin Expression in *Drosophila*. *The FEBS Journal*, 275, 5108-5116.
- Grantham, R.** (1974). Amino Acid Difference Formula To Help Explain Protein Evolution. *Science*, 185, 862–864.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B.N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L., Marden, M.C.** (2003). The Redox State of the Cell Regulates the Ligand Binding Affinity of Human Neuroglobin and Cytoglobin. *J. Biol. Chem.*, 10, 1074.
- Hance, T., Baaren, J.V., Vernon, P., Boivin, G.** (2007). Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *The Annual Review of Entomology*, 52, 107–26.
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T.L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M.C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., AviviA., Weber, R.E., Fago, A., Burmester, T.** (2005). Neuroglobin And Cytoglobin in Search Of Their Role in The Vertebrate Globin Family. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 110-119.

- Hankeln, T., Klawitter, S., Kramera, M., Burmester, T.** (2006). Molecular Characterization Of Hemoglobin From The Honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 52, 701–710.
- Harrison, J.F., Fewell, J.H.** (2002). Environmental And Genetic Influences On Flight Metabolic Rate in The Honeybee, *Apis Mellifera*, *Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133, 323–333 .
- Heinrich, B.** (1979). Bumblebee Economics. *Harvard University Press*, Cambridge, MA.
- Heinrich, B.** (1980). Mechanisms Of Body Temperature Regulation in Honeybees, *Apis mellifera* I Regulation Of Head Temperature. *J. Exp. Biol.*, 85, 61–72.
- Heinrich, B.** (1980). Mechanisms Of Body Temperature Regulation in Honeybees, *Apis mellifera* II Regulation Of Thoracic Temper-Ature At High Air Temperature. *J. Exp. Biol.*, 85, 73–87.
- Heinrich, B.** (1981). Insect Thermoregulation. *John Wiley & Sons Incorporation*, 328p, New York.
- Heinrich, B.** (1993). The Hot-Blooded Insects: Strategies And Mechanisms Of Thermoregulation. *Harvard University Press*, 601p, Cambridge, Massachusetts.
- Henning, W.** (1969). Stammesgeschichte der Insekten. *Waldemar Kramer and Co*, 227p, Frankfurt.
- Hoell, H.V., Doyen, J.T., Purcell, A.H.** (1998). Introduction to Insect Biology and Diversity. *Oxford University Press*, 320p, Oxford.
- Hünefeld F.L.** (1840). Die Chemismus in Der Thierischen Organization. *Leipzig*, 125p.
- Jalali, M., Tirry, L., De Clercq, P.** (2010). Effect Of Temperature On The Functional Response Of *Adalia Bipunctata* to *Myzus persicae*. *Journal of the International Organization for Biological Control*, 55, 261–269.
- Kawaoka, S., Katsuma, S., Meng, Y., Hayashi, N., Mita, K., Shimada, T.** (2009). Identification And Characterization Of Globin Genes From Two Lepidopteran Insects, *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini*. *Gene*, 431, 33–38.
- Kendrew, J.C.** (1963). Myoglobin And The Structure Of Proteins. *Science*, 139, 1259.

- Koolman, J., Roehm, K.H.** (2012). Color Atlas of Biochemistry. *Thieme Stuttgart*, 322p, New York.
- Kovac, H., Stabentheiner, A., Schmaranzer, S.** (2010). Thermoregulation Of Water Foraging Honeybees-Balancing Of Endothermic Activity With Radiative Heat Gain And Functional Requirements. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1834-1845.
- Kovac, H., Stabentheiner, A.** (2012). Does Size Matter? Thermoregulation Of `Heavyweight` And `Lightweight` Wasps (*Vespa crabro* and *Vespula* sp). *Biology Open*, 1, 848–856.
- Kyte, J., Doolittle, R.** (1982). A Simple Method For Displaying The Hydrophobic Character Of a Protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132.
- Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J.** (2006). Expression Of Heat Shock Protein And Hemoglobin Genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) Larvae Exposed To Various Environmental Pollutants: A Potential Biomarker Of Freshwater Monitoring. *Chemosphere*, 65, 1074–1081.
- Li, L.C., Dahiya, R.** (2002). MethPrimer: Designing Primers For Methylation Pcrs. *Bioinformatics*, 18 (11), 1427-31.
- Logan, J.** (1988). Toward An Expert System For Development Of Pest Simulation Models. *Environmental Entomology*, 17, 359–376.
- May M.L.** (1979). Insect Thermoregulation. *Annual Review Entomology*, 24, 313-49.
- Milani, M., Pesce, A., Nardini, M., Ouellet, H., Ouellet, Y., Dewilde, S., Bocedi, A., Ascenzi, P., Guertin, M., Moens, L., Friedman, J.M., Wittenberg, J.B., Bolognesi, M.** (2005). Structural bases for hrmr binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.*, 99, 9-109.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F.** (1988). A Simple Salting Out Procedure For Extracting DNA From Human Nucleated Cells, *Nucleic Acid Research*, 16 (3).
- Millikan, G.A.** (1939). Muscle Hemoglobin. *Physiol Rev.*, 19, 503–523.

- Muratori, F., Le Ralec, A., Lognay, G., Hance, T.** (2006). Epicuticular Factors Involved in Host Recognition For The Aphid Parasitoid *Aphidius rhopalosiphi*. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 579-593.
- Mustajärvi, K., Siikamäki, P., Rytönen, S., Lammi, A.** (2001). Consequences Of Plant Population Size And Density For Plant–Pollinator Interactions and Plant Performance. *Journal of Ecology*, 89, 80–87.
- Normark, B.B., Jordal, B.H., Farrel, B.D.** (1999). Origin Of Haplodiploid Beetle Lineage. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 26, 2253-2259.
- Novotny, V., Basset, Y., Miller, S. E., Drozd, P., Cizek, L.** (2002). Host Specialisation Of Leaf Chewing Insects in A New Guinea Rainforest. *Journal of Animal Ecology*, 71, 400-412.
- Okada, O.M., Sasaki, I.M.** (1987). Heat Production By Balling in The Japanese Honeybee, *Apis cerana japonica* as a Defensive Behavior Against The Hornet, *Vespa simillima xanthoptera* (Hymenoptera: Vespidae). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 43, 1031–1034.
- Omasits, U., Ahrens, C.H., Müller, S., Wollscheid, B.,** (2014). Protter: Interactive Protein Feature Visualization And Integration With Experimental Proteomic Data. *Bioinformatics*, 30, 884-886.
- Özbek, H.** (1983). Doğu Anadolu'nun Bazı Yörelerindeki Bombinae (Hymenoptera: Apoidea, Bombidae) Türleri Üzerinde Taksonomik ve Bazı Biyolojik Çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, 70s, Erzurum.
- Peck, K.J.** (1991). Fossil History And Evolution Of Hexapod Structures. *The Insects of Australia*, 141-179.
- Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., Burmester, T.** (2002). Neuroglobin And Cytochrome b. Fresh Blood For The Vertebrate Globin Family. *EMBO Rep.*, 3, 1146-1151.
- Perutz, M.F.** (1979). Regulation of Oxygen Affinity of Hemoglobin: Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron. *Annual Review of Biochemistry*, 48, 327-386.

- Picotti, P., Dewilde, S., Fago, A., Hundahl, C., De Filippis, V., Moens, L., Fontana, A.** (2009). Unusual Stability Of Human Neuroglobin At Low Ph--Molecular Mechanisms And Biological Significance. *FEBS J.*, 276, 7027-7039.
- Poole, R.K., Hughes, M.N.** (2000). New Functions for The Ancient Globin Family: Bacterial Responses to Nitric Oxide and Nitrosative Stress. *Mol. Microbiol.*, 36, 775-783.
- Poole, R.K.** (2005). Nitric Oxide And Nitrosative Stress Tolerance in Bacteria. *Biochem. Soc. Trans.*, 33, 176-180.
- Prange, H.D.** (1990). Temperature Regulation By Respiratory Evaporation In Grasshoppers. *J. Exp. Biol.*, 154, 463-474.
- Resh, V.H., Cardé, R.T.** (2003). Encyclopedia Of Insects. *Academic Press*, 92,101-4495.
- Sabir, F., Sangwan, N.S., Chaurasiya, N.D., Misra, L.N., Tuli, R., Sangwan, R.S.** (2007). Micro-Propagation Of *Withania somnifera L.* Accessions From Axillary Meristem For Rapid Propagation And Withanolide Production. *Journal of Herbs Spices and Medical Plants*, 13, 118-128.
- Sandhu, H.S., Nuessly, G.S., Webb, S.E., Cherry, R.H., Gilbert, R.A.** (2010). Temperature-Dependent Development of *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on Sugarcane Under Laboratory Conditions. *Environmental Entomology*, 39, 1012–1020.
- Schmaranzer, S.** (2000). Thermoregulation Of Water Collecting Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* , 46, 1187-1194.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A.** (1994). Evolution, Weighting And Phylogenetic Utility Of Mitochondrial Gene Sequences And Compilation Of Concerted Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651-701.
- Stabentheiner, A., Kovac, H., Hetz, S.K., Käfer, H., Stabentheiner, G.** (2012). Assessing Honeybee and Wasp Thermoregulation and Energetics-New Insights by Combination of Flow-Through Respirometry with Infrared Thermography. *Thermochimica Acta*, 534, 77– 86.

- Steffan-Dewenter, I., Tschardtke, T.** (1999). Effects of Habitat Isolation on Pollinator Communities and Seed Set. *Oecologia*, 121, 432–440.
- Steinbauer, M.J., Kriticos, D.J., Lukacs, Z., Clarke, A.R.** (2004). Modelling a Forest Lepidopteran: Phenological Plasticity Determines Voltinism Which Influences Population Dynamics. *Forest Ecology Management*, 198, 117–131.
- Stothard, P.** (2000). The Sequence Manipulation Suite: Javascript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *Biotechniques*, 28, 1102-1104.
- Strathdee, A.T., Bale, J.S.** (1998). Life On The Edge: Insect Ecology In Arctic Environments. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 85-106.
- Sudarsan, R., Thompson, C., Kevan, P.G., Eberl, H.J.** (2012). Flow Currents and Ventilation In Langstroth Beehives Due to Brood Thermoregulation Efforts of Honeybees. *Journal of Theoretical Biology*, 295, 168-193.
- Tamura, K., Battistuzzi, F.U., Billig-Ross, P., Murillo, O., Filipski, A., Kumar, S.** (2012). Estimating Divergence Times in Large Molecular Phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 19333-19338.
- Terwilliger, N.T.** (1998). Functional Adaptations of Oxygen-Transport Proteins. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 1085-1098.
- Thomson, L.J., Macfadyen, S., Hoffmann, A.A.** (2010). Predicting The Effects of Climate Change on Natural Enemies of Agricultural Pests. *Journal of the International Organization for Biological Control*, 52, 296–306.
- Tomimatsu, H., Ohara, M.** (2002). Effects Of Forest Fragmentation on Seed Production of The Understory Herb *Trillium camschatcense*. *Conservation Biology*, 16, 1277–1285.
- Trent III, J.T., Hargrove, M.S.** (2002). A Ubiquitously Expressed Human Hexacoordinate Hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 277, 19538–19545.
- Tsubaki, Y., Ono, T.** (1987). Effects Of Age And Body Size On The Male Territorial System Of The Dragonfly *Nannophya pygmaea Rambur* (odonata, Libellulidae). *Animal Behaviour*, 35, 518-525.

- Van Nerum, K., Buelens, H.** (1997). Hypoxia-Controlled Winter Metabolism in Honeybees (*Apis mellifera*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 117 (4), 445-455.
- Velterop, O.D., Van, Andel W., Van, J.** (2000). Effects of Fragmentation on Pollen Gene Flow in Insect-Pollinated Plant Populations. *University of Groningen*, 1, 37-54.
- Verdu, J., Tercedor, J.A., Manrique, M.** (2012). Evidence of Different Thermoregulatory Mechanism Between Two Sympatric *Scarabaeus* Species Using Infrared Thermography and Micro-Computer Tomography. *PlosOne*, 7 (3), 33914.
- Vinogradov, S.N.** (1985). The Structure Of Invertebrate Extracellular Hemoglobins (Erythrocrucorins And Chlorocrucorins). *Comp. Biochem. Physiol.*, 828, 1-15.
- Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Guertin, M., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L., Vanfleteren, J.R.** (2005). Three Globin Lineages Belonging To Two Structural Classes in Genomes From The Three Kingdoms of Life. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 11385–11389.
- Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L., Vanfleteren, J.R.** (2006). A Phylogenomic Profile of Globins. *BMC Evol. Biol.*, 6, 31-45.
- Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Mizuguchi, K., Dewilde, S., Moens, L., Vanfleteren, J. R.** (2007). A Model of Globin Evolution, *Gene*, 398, 132-142.
- Wang, Y., Geer, L.Y., Chappey, C., Kans, J.A., Bryant, S.H.** (2000). Cn3D: Sequence and Structure Views for Entrez. *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (6), 300-302.
- Ward, J.V., Stanford, J.A.** (1982). Thermal Responses In The Evolutionary Ecology Of Aquatic Insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 27, 97-117.
- Wawrowski, A., Matthews P, G.D., Gleixner, E., Kiger, L., Marden, M. C., Hankeln, T., Burmester, T.** (2012). Characterization of The Hemoglobin of The Backswimmer *Anisops deanei* (Hemiptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 603-609.
- Weber, R.E.** (1980). Functions of Invertebrate Hemoglobins With Special Reference To Adaptations To Environmental Hypoxia. *Am. Zool*, 20, 79-101.

- Weber, R.E., Vinogradov, S.N.** (2001). Nonvertebrate Hemoglobins: Functions And Molecular Adaptations. *Physiol. Rev.*, 81, 568-629.
- Wheeler, W.C., Whiting, M., Wheeler, Q.D., Carpenter, J.M.** (2001). The Phylogeny of the Extant hexapod Orders. *Cladistics*, 17, 113–169.
- Wilson, R.J., Davies, Z.G., Thomas, C.D.** (2009). Modelling The Effect of Habitat Fragmentation on Range Expansion in a Butterfly. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 276, 1421–1427.
- Wigglesworth, V.B.** (1984). Insect Physiology. *Methuen And Company Limited*, 192p, Londra.
- Williams, P.H., Cameron, S.A., Hines, H.M., Cederberg, B., Rasmont, P.** (2008). A Simplified Subgeneric Classification of the Bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39, 46-74.
- Wittenberg, J.B., Wittenberg, B.A.** (2003). Myoglobin Function Reassessed. *J. Exp. Biol.*, 206, 2011-2020.
- Xia, X.** (2000). Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Kluwer Academic Publishers*, 122p, AA Dordrecht.
- Zalucki, M.P., Clarke, A.R., Malcolm, S.B.** (2002). Ecology And Behavior Of First Instar Larval Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 47, 361-93.
- Zöngür, B. (2009).** Farklı Çevresel Koşullara Uyumlu Bazı Sazan Türlerinde Hemoglobin Proteini Farklılıklarının Elektroforetik Tekniklerle Araştırılması, *Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı* (Yüksek Lisans Tezi), 75s, Sivas.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Habaş Bilal AYDEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 02.10.1987
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, TOKAT
E-posta Adresi	hbilalaydemir@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Kongre Lisesi, 2005
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2012
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D., 2012-

İş Tecrübesi

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma Görevlisi, 2014

Yayınlar

Ulusal Görgün, E.P.,Toker, H., Korkmaz, E.M., Aydemir, H.B. (2014). Association Of NF-Kb Gene Polymorphism With Aggressive And Chronic Periodontitis. *Cumhuriyet Dental Journal*, 17(4), 389-397.

Uluslararası

Kongreler ve Bildiriler

Ulusal 22. U.B.K.,-Eskişehir, II. Taksonomi Yaz Okulu-İzmir,
1. Adli Tıp ve Genetik Kongresi-Ankara,

Uluslararası

