



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***HYPOGYMNA CİNSİ İKİ LİKEN TÜRÜNDE
(H.TUBULOSA VE H.PHYSODES) ANALİTİK
(CAP LC-ESI-MS/MS) VE MİKROSKOBİK
(IŞIK VE ELEKTRON) YÖNTEMLERLE
SİALİK ASİTLERİN BELİRLENMESİ***

Didem ERKAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye DEVECİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 10.02.2011

Bornova-İZMİR

2011

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***HYPOGYMNA* CİNSİ İKİ LİKEN TÜRÜNDE (*H.TUBULOSA* VE
H.PHYSODES) ANALİTİK (CAP LC-ESI-MS/MS) VE
MİKROSKOPİK (IŞIK VE ELEKTRON) YÖNTEMLERLE
SİALİK ASİTLERİN BELİRLENMESİ**

Didem ERKAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye DEVECİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 10.02.11

Bornova-İzmir

2011

Didem ERKAN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Hypogymnia* Cinsi İki Liken Türünde (*H.tubulosa* ve *H.physodes*) Analitik (CapLC-ESI-MS/MS) ve Mikroskopik (Işık ve Elektron) Yöntemlerle Sialik Asitlerin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10.02.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç.Dr. Remziye DEVECİ

Raportör Üye : Prof.Dr. İsa GÖKLER

Üye : Doç.Dr. Cemal ÜN.

ÖZET

***HYPOGYMNIA* CİNSİ İKİ LİKEN TÜRÜNDE (*H.TUBULOSA* VE *H.PHYSODES*) ANALİTİK (CAP LC-ESI-MS/MS) VE MİKROSKOBİK (IŞIK VE ELEKTRON) YÖNTEMLERLE SİALİK ASİTLERİN BELİRLENMESİ**

ERKAN, Didem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Remziye DEVECİ

Şubat 2011, 46 sayfa

Glikokonjugatlar, bütün hücrelerde bulunurlar ve birçok biyolojik olayda iş görürler. Glikokonjugatların yapısındaki glikan zincirlerinin uç şeker molekülü genellikle sialik asittir (Sia). Bu nedenle glikokonjugatların rolleri doğrudan Sia tarafından kontrol edilir, yönlendirilir. Virüsten insana kadar hemen tüm canlılarda yayılış gösteren Sia'nın bitkilerde bulunduğuna ilişkin son bilgiler halen tartışmalıdır. Likenlerde ise böyle bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, *Hypogymnia* cinsine ait iki liken türünde (*H.tubulosa* ve *H.physodes*) öncelikle Sia'nın belirlenmesi hedeflenmiştir. Bulunması durumunda ardından tipleri, miktarları, kimyasal bağ özelliklerini saptamak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, incelenecek liken türlerinin öncelikle histolojik yapıları, epon bloklardan alınan yarı ince kesitlerin toluidin mavisi ile boyanmasıyla ışık mikroskopunda incelenmiştir. Sia'nın ve özelliklerinin belirlenmesi için analitik (Cap LC-ESI-MS/MS) ve mikroskopik (ışık mikroskopunda HRP işaretli, transmisyon elektron mikroskopunda altın işaretli lektin uygulamaları ile) yöntemlerden yararlanılmıştır.

İncelenen her iki liken türü de heteromerik tallus yapısına sahiptir. Yani, belirgin bir tabakalaşma görülür. Bunlar, dıştan içe doğru epikorteks, korteks, algisi tabaka, medulla ve alt korteks şeklinde sıralanırlar. İki tür arasındaki en önemli fark, korteks tabakasındaki mantar hücrelerinin yapısı ve dağılımındadır.

H.tubulosa'da gevşek dağılmış hücreler uzun çıkıntılarla birbirlerine tutunurken, *H.physodes*'de yoğun hücrelerarası matriks elemanlarıyla birbirlerine yapışmış gibidirler.

Sia belirlemeleri için öncelikle Cap LC-ESI-MS/MS ile çalışılmıştır. Neu5Ac ve Neu5Gc standartlarının alıkonma zamanları ile karşılaştırılan liken örneklerinde sadece Neu5Ac saptanmıştır. Miktar hesaplamaları ile de *H.tubulosa*'nın (1,36 ng/mg) *H.physodes*'den (0,25 ng/mg) daha fazla Sia içerdiği bulunmuştur. Bu nedenle lektin histokimyası/sitokimyası ile Sia incelemeleri sadece *H.tubulosa*'da gerçekleştirilmiştir. 0,75µm'lik lowicryl kesitlere HRP işaretli LFA (*Limax flavus* agglutinin, tüm Sia'lara özgün), MAA (*Maackia amurensis* agglutinin, α2-3 bağına özgün) ve SNA (*Sambucus nigra* agglutinin, α2-6 bağına özgün) lektinlerin uygulanmasıyla; Sia'lar korteks bölgesi mantar hücrelerinin hücre yüzeyleri ve nukleuslarında en fazla bulunmuştur. α-2,3 bağıli Sia'lar α-2,6 bağıli Sia'lardan -özellikle nukleusta- biraz daha fazladır. Lektin sitokimyası için ince lowicryl kesitlere altın işaretli LFA ve LPA (*Limulus polyphemus* agglutinin, tüm Sia'lara özgün) lektinlerin uygulanmasıyla, Sia'lar mantar hücrelerinin hücre duvarı, hücre zarı, sitoplazma ve özellikle nukleusunda saptanmıştır. Alg hücrelerinde, hücre duvarı ve elektronca yoğun sitoplazmik bölgede az, nukleusta fazladır.

Sonuç olarak; bu çalışma analitik ve mikroskobik yöntemlerle, incelenen liken türlerinde Sialik asit (Neu5Ac) bulunduğunu tartışmasız olarak kanıtlamaktadır. Ayrıca Sia bağ tipleri (α-2,3 ve α-2,6) ve yoğunlukları da belirlenmiştir. Likenlerde bu konudaki ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

Anahtar sözcükler: Liken, *Hypogymnia tubulosa*, *Hypogymnia physodes*, Sialik asit, LC-MS/MS, Lektin, Histokimya, Sitokimya, Işık mikroskobu, Transmisyon elektron mikroskobu

ABSTRACT

DETERMINATION OF SIALIC ACIDS IN TWO LICHEN SPECIES OF *HYPOGYMNIA* GENUS (*H.TUBULOSA* AND *H.PHYSODES*) BY ANALYTICAL (CAP LC-ESI-MS/MS) AND MICROSCOPIC (LIGHT AND ELECTRON) METHODS

ERKAN, Didem

MSc in Biology

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Remziye DEVECİ

February 2011, 46 pages

Glycoconjugates are found in all cells and they operate in many biological events. The terminal sugar molecule of glycan chains in glycoconjugates structure is generally sialic acid (Sia). Therefore the roles of glycoconjugates are directly controlled or regulated by Sia. Sialic acids are found widely spreading in all organism from virus to human however the presence of Sia in plants is still questionable. There is not any such study in lichens.

In this study, firstly determination of Sia in two lichen species (*H.tubulosa* and *H.physodes*) is targeted. In case of determining, investigating types, quantities, the properties of the chemical bond is intended. Accordingly, first of all the histological structures of lichen species are examined by staining with toluidin blue in semi thin sections from epon blocks in light microscope. In order to elucidate the properties of Sia, analytical (Cap LC-ESI-MS/MS) and microscopic (labeled with HRP lectin in light microscopy , -gold labeled lectin in transmission electron microscopy) methods were used.

Both lichen species being investigated have heteromerous tallus structure. Namely, a clear stratification is observed. These are arranged inwards as

epicortex, cortex, algal layer, medulla and lower cortex. The major difference among two species is the structure and distribution of mycobiont cells in cortex layer. While in *H.tubulosa* loosely scattered cells hold each other with long projections, in *H.physodes* they are like dense intercellular matrix elements that are stuck to each other.

Cap LC-ESI-MS/MS was used to determine Sia types. When compared retention-times of Neu5Ac and Neu5Gc among the standards and samples, only Neu5Ac was found in lichens. Amount of Sia (1.36 ng / mg) in *H.tubulosa* contained more than that of (0.25 ng / mg) *H.physodes*. Therefore, lectin histochemistry/cytochemistry investigations were carried out only with *H.tubulosa*. Sialic acids were mostly found cell surfaces and nuclei of fungal cell in the cortex area by using lectin applications that lowicryl sections (0.75 μ m) with HRP-conjugated LFA (*Limax flavus* agglutinin, specific for all Sia types) , MAA (*Maackia amurensis* agglutinin, specific for α 2-3) and SNA (*Sambucus nigra* agglutinin, specific for α 2-6). α -2,3 linked Sia's are a little more than α -2,6 linked Sia's -especially in nucleus. In lectin cytochemistry application, Gold-conjugated LFA and LPA (*Limulus Polyphemus* agglutinin, all Sia types) lectins were used to thin sections of lowicryl. Sialic acids were determined in fungal cell wall, cell membrane and particularly in nucleus. Sialic acids in cell wall and electron dense cytoplasmic region of algal cells were less found than in the nucleus.

As a result, this study proves uncontroversially presence of Sialic acid (Neu5Ac) in lichen species by analytic and microscopic methods. Also, bond types (α -2,3 and α -2,6) and intensity of Sia were determined. . This study is important due to be first study on this issue for lichens.

Key words: Lichen, *Hypogymnia tubulosa*, *Hypogymnia physodes*, Sialic acid, LC-MS/MS, Lectin, Histochemistry, Cytochemistry, Light microscope, Transmission electron microscope

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan, desteğini hiç esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Remziye DEVECİ'ye en içten dileklerimle teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini her zaman hissettiğim, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Sabire KARAÇALI'ya, çalışılacak liken türlerinin toplanacağı arazinin belirlenmesi ve tür tayinlerinin yapılması konusunda desteğini esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ayşen TÜRK'e, türlerin toplanması konusunda bana yardımcı olan Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araş. Gör. Okan SEZER'e, çalışmalarımın LC-MS/MS kısmında analizleri yapan ve bilgilerini paylaşan Uzman Umut ŞAHAR'a, laboratuvar çalışmalarım süresince bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Dr. Mehmet Salih YIKILMAZ ve Araş. Gör. Dr. Savaş İZZETOĞLU'na, çalışmalarım süresince dostluklarından destek aldığım anabilim dalındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim. Her an yanımda olduğunu bildiğim, desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Özgür ERKAN'a yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL ve YÖNTEM	9
2.1. Materyal	9
2.2. Yöntemler	11
2.2.1. Histolojik yapının incelenmesi	11
2.2.2. Sialik asitlerin belirlenmesi	12
2.2.2.1. CapLC-ESI-MS/MS ile sialik asitlerin belirlenmesi	12
2.2.2.2. Lektin histokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi	15
2.2.2.3. Lektin sitokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi	16
3. BULGULAR	17
3.1. Histolojik Yapının Gösterilmesi	17

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2 Sialik Asitlerin Belirlenmesi	20
3.2.1. CapLC-ESI-MS/MS ile sialik asitlerin belirlenmesi	20
3.2.2. Lektin histokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi	23
3.2.3. Lektin sitokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi	26
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	31
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Homomerik (a) ve Heteromerik (b) tallus yapısı	3
1.2: Sialik asidin genel formülü ve olası tipleri	6
2.1: <i>Hypogymnia tubulosa</i> (a) ve <i>Hypogymnia physodes</i> (b)'in genel görünümü	10
2.2: Bilgisayara bağlı trinoküler digital aydınlık alan/floresan mikroskobu (Leica DM 4000B) ile motorize stage ve video kamera (Olympus DP71) sistemi	11
2.3: Kapiler HPLC (Agilent 1200) - Elektro Sprey İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi Bruker Daltonics) sistemi	14
2.4: Automatic Freeze Substitution System cihazında lowicryl serilerinin gerçekleştirilmesi	15
3.1: <i>Hypogymnia tubulosa</i> enine kesitinde tabakaların genel (a) ve ayrıntılı (b) yapısı	18
3.2: <i>Hypogymnia physodes</i> enine kesitinde tabakaların genel (a) ve ayrıntılı (b) yapısı.....	19
3.3: Standart sialik asit tiplerine (sırasıyla Neu5Gc ve Neu5Ac) ait kromatogram ve spektrumlar	21
3.4: <i>Hypogymnia tubulosa</i> liken türüne ait kromatogram ve spektrum	21
3.5: <i>Hypogymnia physodes</i> liken türüne ait kromatogram ve spektrum	21
3.6: <i>H.tubulosa</i> ve <i>H.physodes</i> liken türlerinde sialik asit miktarlarının pik alanlarına göre karşılaştırılması	22

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.7: <i>H.tubulosa</i> ve <i>H.physodes</i> liken türlerinde bulunan sialik asitin ng/mg cinsinden miktarı	22
3.8: <i>H.tubulosa</i> liken türünde lektin uygulaması yapılmamış kontrol kesit örneği.....	24
3.9: <i>H.tubulosa</i> liken türünde HRP işaretli LFA lektinin DAB+ reaksiyonu	24
3.10: <i>H.tubulosa</i> liken türünde HRP işaretli MAA lektinin DAB+ reaksiyonu.	25
3.11: <i>H.tubulosa</i> liken türünde HRP işaretli SNA lektinin DAB+ reaksiyonu..	25
3.12: <i>H.tubulosa</i> liken türünde koloidal altın işaretli LFA lektin uygulaması ile mantar hücresinin elektronca az yoğun sitoplazma kısmında küçük gruplar halindeki altın tanecikleri.....	27
3.13: <i>H.tubulosa</i> liken türünde koloidal altın işaretli LFA lektin uygulaması ile mantar hücresinin merkezindeki elektronca yoğun nukleus bölgesinde grup halindeki altın tanecikleri	27
3.14: <i>H.tubulosa</i> liken türünde koloidal altın işaretli LFA lektin uygulaması ile alg hücresinin hücre duvarında ve elektronca yoğun sitoplazmik bölgenin dış kenarı ile iç kısmında altın tanecikleri.....	28
3.15: <i>H.tubulosa</i> liken türünde koloidal altın işaretli LFA lektin uygulaması ile alg hücresinin nukleusunda çok sayıda altın tanecikleri	28
3.16: <i>H.tubulosa</i> liken türünde koloidal altın işaretli LPA lektin uygulaması ile mantar hücresinin hücre duvarında ve hücre zar yüzeylerinde altın tanecikleri	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 3.17:** *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli LPA lektin uygulaması ile mantar hücresinin hücre duvarı ve hücre zar yüzeyleri ile alg hücresinin elektronca az yoğun sitoplazmik bölgedeki halka yapısının içinde altın tanecikleri 29
- 3.18:** *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli LPA lektin uygulaması ile alg hücresinin elektronca yoğun sitoplazmik bölgesindeki altın taneciği 30

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Çalışılan liken türlerine ait sınıflandırma	9
2.2 Lektin histokimyası için kullanılan HRP işaretli lektinler ve sialik asit seçicilikleri	16
2.3 Lektin sitokimyası için kullanılan altın işaretli lektinler ve sialik asit seçicilikleri	16
3.1 Sialik asitin DMB türevine ait ana iyon ve parçalanma iyonları.....	20
3.2 <i>H.tubulosa</i> ve <i>H.physodes</i> liken türlerinde belirlenen sialik asidin ng/mg cinsinden miktarı	22

1.GİRİŞ

Likenler başlı başına birer organizma değildirler. Mantarlar ile alglerin birleşerek, morfolojik ve fizyolojik bir bütün halinde meydana getirdikleri simbiyotik birlikteliklerdir (Sanders., 2002; Güner vd. 2004; Maslov and Pavlova, 2005; Seymour et al., 2005; Gupta et al., 2007; Grube and Hawksworth, 2007; Duman., 2008). Liken yapısındaki mantar ve alg arasındaki ilişki çoklu simbiyotların yapıya katılmasıyla oldukça karmaşık olabilir. Liken yapısındaki mantar “mikobiont”, alg yada mavi-yeşil bakteriler “fotobiont” olarak adlandırılırlar. “Liken” deyimini ilk defa M.Ö. IV. Yüzyılda Theophrastus kullanmıştır. Ancak liken olarak adlandırdığı örnekler liken olmayıp, aslında ciğer otları idi. İlk olarak likenlerin alg ve mantarlardan meydana geldiğini Alman Botanikçi Schwenderer bilim dünyasına tanıtmıştır (Karamanoğlu, 1971). Bu birliktelikle likenler, alglere ve mantarlara hiç benzemeyen yepyeni morfolojik, anatomik ve fizyolojik özellikler gösterirler. Böylece liken oluşturan algler ve mantarlar kısıtlı yaşam koşullarında var olmalarına neden olan karakterlerini kaybedip üstün özelliklerini ön plana çıkarma şansı bulurlar (Sanders, 2001).

Likenler sistematik yönden ayrı bir grup değildirler. Simbiyotik bir topluluk oldukları için filogenetik bir temele dayanan sistematigi yoktur (Karamanoğlu, 1971). Simbiyotik birlikteliğin fenotipinde baskın karakter mikobiontlardır ve bundan dolayı likenler mantarların bir yaşam formu olarak sınıflandırılırlar (Sanders, 2001; Grube and Blaha, 2005; Seymour et al., 2005). Likenlerin sahip oldukları Latince isimleri yine yapılarında bulunan mantar partnerin ismidir. Bunun başlıca nedeni ise liken yapısındaki mantarın her likende ayrı olmasıdır. Birçok farklı mikobiont türü aynı fotobiont türünü paylaşabilir (Honegger, 1998). Fakat fotobiontlarda bu spesifiklik mevcut değildir. Günümüzde mevcut liken türlerinin sayısının yaklaşık olarak 13.500-17.000 olduğu tahmin edilmektedir (Gupta et al., 2007; Hill, 2009). Liken oluşturan mantarların çoğu *Ascomycetes* üyesidir, diğerleri ise *Basidiomycetes* ve *Deuteromycetes* üyeleri ile temsil edilmektedir (Rai and Bergman, 2002; Grube and Blaha, 2005; Duman, 2008). En genel liken fotobiontları ise yeşil

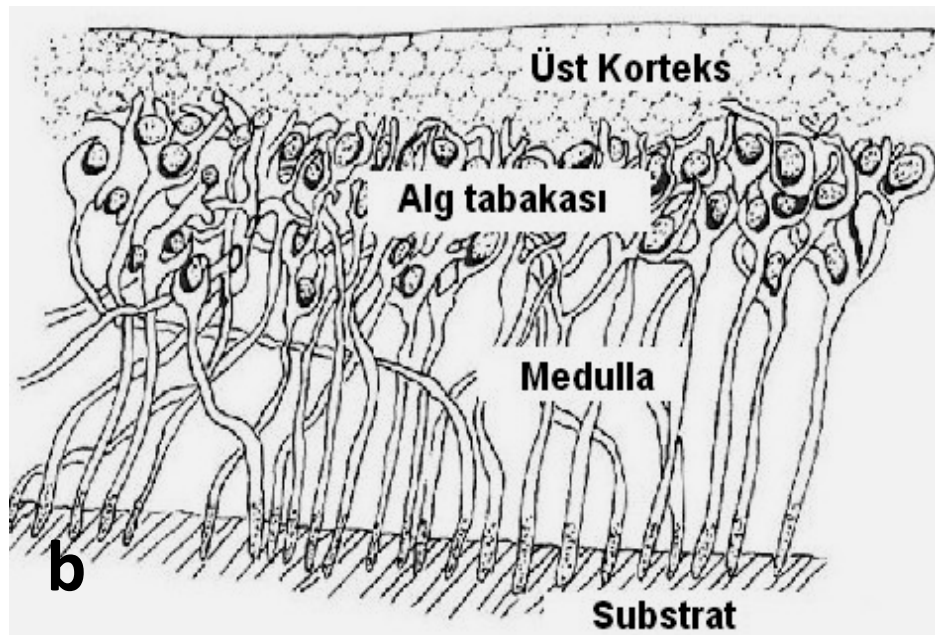
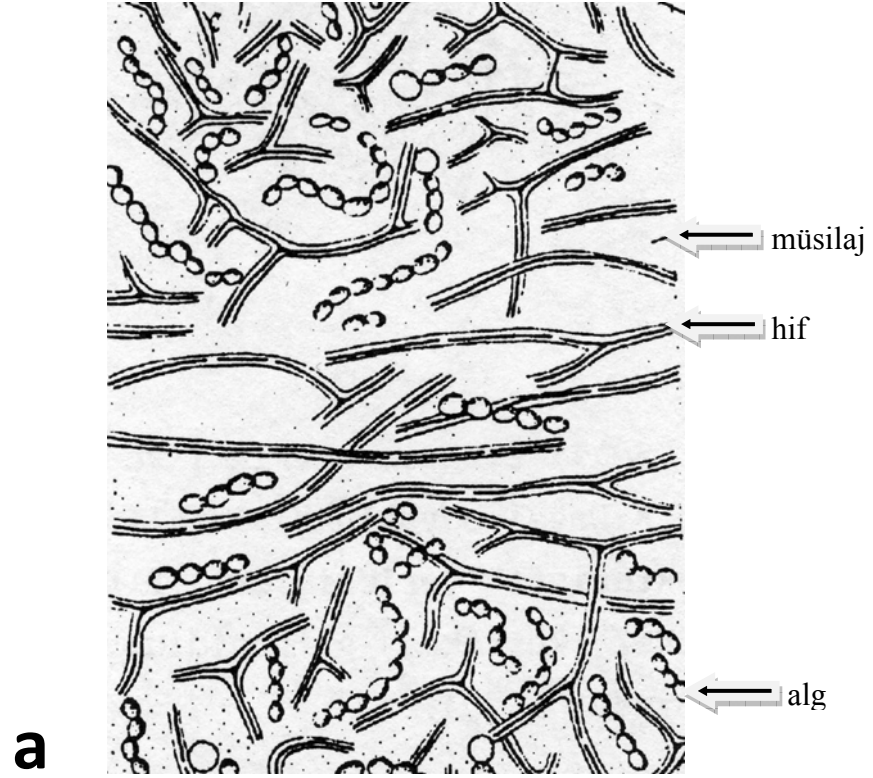
alglerden *Trebouxia* ve *Trentepohlia* ve siyanobakterilerden *Nostoc*'dur (Karamanoğlu, 1971; Rai and Bergman, 2002).

Liken tallusları yapılarındaki fotobiontun dağılımına göre 2'ye ayrılırlar. Homomerik liken tallusunda; algler ve mantar hifleri tallus içinde homojen olarak dağılmıştır ve enine kesitlerde bir tabakalaşma gözlenmez (Şekil 1.1a). Heteromerik liken tallusunda ise, algler ve mantar hiflerinin oluşturduğu belirgin bir tabakalaşma görülmektedir (Şekil 1.1b). Birçok liken türü dışta bol jelatinli, çift çeperli ve birbirine sarılı hiflerden oluşan korteks tabaka içerir. Korteksin altında alg hücrelerinin oluşturduğu algsi tabaka bulunur. Bunun altında ise kalın çeperli mantar hiflerinden meydana gelen ve tallusun büyük kısmını oluşturan medulla tabakası vardır (Güner ve ark., 2004; Yavuz, 2004; Büdel and Scheidegger, 2008). Ayrıca, en dışta hücresel olmayan ince bir epikorteks ile en altta, likenin substratına tutunduğu, mantar hücrelerinden oluşan bir alt korteks tabakası da yer alır. Likenlerin çoğalmaları eşeyli ve eşeysiz biçimlerde olabilir (Karamanoğlu, 1971; Rai and Bergman, 2002; Güner ve ark., 2004; Kabaoğlu, 2007).

Liken yapısındaki alg, klorofilli olduğundan fotosentez yapar ve birliğin karbohidrat gereksinimini sağlar. Mantar ise su, CO₂ ve madensel maddelerin alınmasını temin eder (Rios et al., 1999; Güner ve ark., 2004; Duman, 2008). Fotobiont olarak yeşil alg içeren likenlerde besin olarak şeker alkoller kullanılırken, fotobiontu siyanobakteri olan likenlerde ise fotobionttan mantara besin akışı glukoz molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Liken yapısında sıkı fizyolojik kontaklar siyanobiontlar ile mikobiontlar arasında meydana gelmektedir. Hücre duvarları daha incedir ve mikobiont hifleri özelleşmiştir ve alg hücre ince yapısına geçiş gösterenler bilinmektedir (Rai and Bergman, 2002).

Glikokonjugatlar glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikolipitler olarak sınıflandırılabilir. Glikoproteinleri oluşturan karbohidratlar proteinlere iki şekilde bağlanırlar. Asparajin amino asidine N- üzerinden bağlananlara N-glikanlar; Serin, Treonin ve Tirozin amino asitlerine oksijen üzerinden bağlananlara da O-glikanlar denir (Fukuda and Hindsgaul, 1994; Varki et al.,

1999; Tsuboi and Fukuda, 2001; Brooks et al., 2002; Taylor and Drickamer, 2003). Glikolipitler ise oligosakkaritlerin seramit üzerinden lipitlere bağlanması ile meydana gelir (Varki et al., 1999; Maccioni et al., 2002).



Şekil 1.1: Homomerik (a) ve Heteromerik (b) tallus yapısı. (a, Güner vd., 2004; b, Kabaoğlu, 2007).

Glikokonjugatlar hücre ve dokuda bulundukları yerler açısından farklılıklar gösterirler. Hücre içerisinde sitoplazmada veya organellerde ek olarak hücreler arası alanlarda bulunabilirler. Yapısal proteinler, taşıma proteinleri, hücre tutunma molekülleri, toksinler ve lektinler gibi makromoleküllerin önemli kısımlarını oluştururlar. Glikokonjugatların şeker kısımları glikanlar olarak adlandırılır. Glikanlar, hücre içi ve hücreler arası alanda lektinler olarak bilinen protein veya glikoprotein yapılı şeker reseptörleriyle ilişki kurarlar. Glikanlar bu yerleşimleri ile hücre tutunmasında, hareketinde, hücreye sinyal iletiminde, hücre içi sinyal aktarımında rol oynamaktadırlar (Varki et al., 1999; Haltiwanger and Lowe, 2004).

Glikokonjugatları belirlemede farklı amaçlar için farklı yöntemler kullanılabilir. Şekerler dokularda eser miktarda bulunmaktadır. Miktar ve tip belirlemeleri için analitik tekniklerden yararlanılırken, araştırılan şeker molekülünün hücrelerin hangi kısımlarında (hücre yüzeyi, sitoplazma, nukleus veya organeller) ve hangi yoğunlukta yerleştiğini anlamak için mikroskopik yöntemler tercih edilir. Bu amaçla lektinlerden yararlanılır, çünkü oligosakkaritlerin uç şeker birimleri lektinlerle reaksiyona girer (Gabius and Gabius, 1993; Rhodes and Milton, 1998; Karaçalı ve Deveci, 2001).

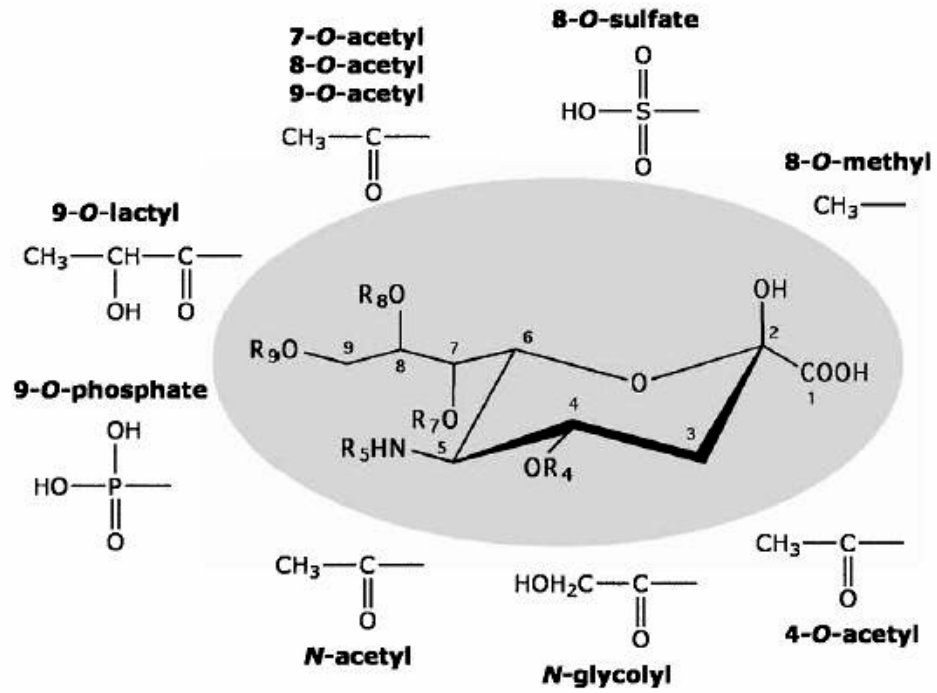
Lektinler; immün orjinli olmayan, hücreleri aglütine eden, glikokonjugatları çöktüren, oligosakkaritlerdeki şekerlere son derece seçici bağlanan protein ya da glikoprotein yapısında olan moleküllerdir (Varki et al., 1999; Ateş ve Özgür, 2002; Deveci ve Karaçalı, 2006). Hayvanlardan bitkilere, bakterilerden virüslere kadar tüm canlı gruplarında bulunurlar. Lektinlerin en önemli özellikleri karbohidratlara spesifik olarak bağlanmalarıdır (Yavuz, 2001; Deveci ve Karaçalı, 2006). Farklı lektinlerin karbohidrat bağlama özelliği önemli derecede değişir. Bazı lektinlerin özgünlüğü zayıf iken bazı lektinler tek bir şekere ve hatta bağ tipine özel olabilirler. Bu özellikleri sayesinde amaca uygun lektinlerin seçilmesiyle biyolojik materyaldeki karbohidrat yapılarının belirlenmesi için lektinler hassas bir yöntem olarak kullanılır (Deveci ve Karaçalı, 2006). Son yıllarda fungal lektinler antitümör ve immün modülatör aktivitelerinden dolayı daha dikkat çekici hale gelmiştir (Moreira et al., 1991; Bhowal et al., 2005; Komath et al., 2006). Lektinlerle

glikokonjugatların karbohidrat üniteleri arasında anahtar kilit prensibi esasına göre şekillenen karbohidrat-protein etkileşimleri, özgün olarak bağlanmalarını sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde hücre-hücre, konak-patojen tanınması, kansere değişme ve metastaz, hücrenin gelişimi ve farklılaşması, hücre içi ve hücreler arası haberleşme gibi çeşitli biyolojik olaylarda tanıma belirleyicileri olarak görev alırlar (Slifkin and Doyle, 1990; Varki et al., 1999; Vijayan and Chandra, 1999; Seyrek ve Bildik, 2001; Duverger et al., 2003).

Sialik asit (Sia) ler N- ve O- bağlı glikoproteinlerin karbohidrat zincirlerinin ve lipide bağlı glikokonjugatların en uç kısmında bulunan, çeşitlilik gösteren dokuz karbonlu (9C) bir şeker grubudur (Şekil 1.2). Sia'ya özgün yapısını 5. pozisyonundaki amino grubu ve 1. pozisyonundaki karboksil grubu verir. Doğada Sia'lar büyük bir kimyasal çeşitlilikte meydana gelirler. Tüm türlerde en yaygın bulunan N-asetil nörominik asittir, yine N-glikolil nöraminik asit çeşitli biyolojik dokularda, birçok hayvan türünde bol bulunmasına karşın insanlarda sadece kanser durumunda bulunur. N-asetil nöraminik asit (Neu5Ac), 5. C atomuna N-asetil grubu bağlanması ile oluşur. N-glikolil nöraminik asit ise yine 5. C atomuna hidroksillenmiş N-asetil grubunun bağlanmasıyla oluşur. Sia'lar glikan yapısının genelde terminal kısımlarda bulunmakla birlikte, iç kısımlarda da bulunabilirler (Schauer, 1982; Foster et al., 1992; Traving and Schauer, 1998; Brooks et al., 2002; Kamerling and Gerwig, 2006; Schauer, 2009; Deveci et al., 2010).

Sialik asitlerin işlevleri arasında, uç molekül olmaları ve negatif yükleri nedeniyle özellikle hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkileri öncelikli olarak sayılabilir. Bunun yanı sıra, sinyal iletimi, tanıma, tutunma gibi çok sayıda olayda görev alırlar. Virüs, bakteri ve protozoa enfeksiyonunda, pozitif yüklü iyonların taşınmasında, (Reuter et al., 1988; Taatjes and Roth, 1990; Kelm and Schauer, 1997; Tanner, 2005) ve moleküler tanıma ile tanımayı maskeleyen olaylarında, reseptörleri maskeleyerek asıl reseptörün tanınmasının engellenmesi, onları bozulmaya karşı koruması ve lektinler, inorganik katyonlar, antikorlar, hormonlar için tanıma alanları olarak iş görürler (Schauer et al., 1984; Schauer, 1985; Kelm and Schauer, 1997; Traving and Schauer, 1998; Schauer, 2009). Sia'ların şimdiye kadar 65'den fazla türevi belirlenmiştir

(Varki et al.,1999; Schauer, 1985, 2001, 2004; Kamerling and Gerwig, 2006). Sia'lar α 2,3 veya α 2,6-bağı ile Galaktoza (Gal), α 2,6 bağı ile N-asetilglukozamine (GlcNAc) ve N-asetilgalaktozamine (GalNAc) ve α 2-8 bağı ile de bir diğer Sia'ya bağlanırlar böylece çeşitlilik kazanırlar. Yine Sia'ların monosakkaritlerindeki sülfasyon, fosforilasyon, metilasyon ve laktilasyon gibi modifikasyonlar çok sayıda Sia çeşidinin oluşmasına neden olur. Sia'lardaki modifikasyonlar türe ve dokuya özgüdür, gelişimsel olarak düzenlenir (Roth et al., 1992; Fukuda and Hindsgaul, 1994; Varki et al., 1999; Brooks et al.,2002; Taylor and Drickamer, 2003).



Şekil 1.2: Sialik asidin genel formülü ve olası tipleri (Kamerling ve Gerwig, 2006).

Liken tallusunun önemli miktarlarda **polisakkarit** içerdiği, birçok liken polisakkaritinin de antiviral, antitümör ve immünolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Liken polisakkaritleri başlıca 3 yapısal tiptedir. Bunlar, β -glukanlar, α -glukanlar ve galaktomannanlar'dır. Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan farklı liken türlerinin polisakkaritlerinin analizinde α ve β glukanların farklı bağ tipleri ve asetilenmiş çeşitleri belirlenmiştir (Olafsdottir and Ingolfsson, 2001; Paulsen et al., 2002; Pereyra et al., 2003). Örneğin,

Umbilicaceae familyası içerdiği kısmen O-asetillenmiş bir β -1,6 glukana ile karakterize edilmiştir (Nauri et al., 1999). *Lasallia pustulata* liken tallusundan izole edilen polisakkaritlerde β -1,6 glukana, β -glukana-kitin kompleks ve β -1,3 glukana bulunmuştur. (Pereyra et al., 2003). *Ramalina gracilis*'in yapısında da 1,3 ve 1,4 bağı glukana ve β glukana bulunmuştur (Cordeiro et al., 2005).

Trebouxia ve *Pseudotrebouxia*, liken yapısında yaygın bulunan tek hücreli yeşil alglerdir. *Trebouxia*'nın hücre duvarı beş tabakadan, *Pseudotrebouxia*'nın ise dört tabakadan oluşur. En iç kısımdaki tabaka başlıca selüloz ve farklı miktarlarda arabinoz, mannoz, galaktoz ve glukoz içerir. *Pseudotrebouxia*'da en dış tabaka polisakkarit ve türe özgü monosakkaritleri içerir. *Trebouxia*'da ise bu tabakada yine polisakkaritler vardır. Bu tabakanın dışında ise sadece türe özgü bulunan monosakkaritleri içeren kılıf mevcuttur. Liken simbiyotların hücre duvar kompozisyonları simbiyotlar arasında tanıma ve ilk temasın hücre duvarları aracılığıyla olması bakımından ilgi çekicidir (König and Peveling, 1984).

Mantar hücre duvar glikoproteinlerinin pek çok görevi belirlenmiştir. Bunlardan bazıları; hücre duvar bütünlüğünün korunması, homotipik-heterotipik adezyon, demir ve sterollerin yakalanması, oksidatif stresle uğraşmak ve protein degradasyonudur. Mantar hücre duvar glikoproteinlerinin N- ve O- bağı karbohidrat zincirlerinde fosfodiester gruplar mevcuttur. *S. cerevisia* de hücre başına total ağırlığın %10'unu hücre duvar glikoproteinleri oluşturur (Yin et al., 2007).

Bitkilerde Sia varlığının analizine yönelik araştırmalar sınırlı sayıda da olsa, farklı tekniklerle belirlenmiş çalışmalar mevcuttur. 2003 yılında yapılan çalışmada çeşitli bitki kültürlerinde C18 kromatografi tekniği ile Neu5Ac ve Neu5Gc belirlenmiştir (Shah et al., 2003). Bitkilerde analitik teknikler ile yapılan bir diğer çalışmada, elma ve muz kültür hücrelerinde iz miktarda Neu5Ac bulunmuştur (Zeleny et al., 2006). *Glycine max* (Soya) kök uçlarında da, LC-ESI-MS/MS ve işaretli lektin kullanımıyla Sia varlığı ve bağı özellikleri belirlenmiştir. (Soya et al., 2009).

Çeşitli **mantar türlerinde Sia** lokasyonları belirlenmiştir. Çalışılan mantar ve maya formlarında belirlenen Sia'ların; konakçı hücrelere tutunmada, hücre-hücre etkileşiminde önemli rol aldığı düşünülmüştür. Çalışılan türler genellikle bitkilere ve insana patojenik türlerdir, yapılarında değişik tipte ve miktarda Sia belirlenmiştir. Örneğin, Alviano ve arkadaşları tarafından 1982 yılında, dimorfik *Sporothrix schenckii*'nin hücrelerinde Sia varlığı belirlenmiştir. *A.abietina* mantar türünde Sia ve L-fukoz, lipid yapıların yapısal analizinde belirlenmiş, hücre duvar yapısında total olarak bulunmamıştır (Benhamou and Ouellette, 1986). Aynı yıl insana patojen bir tür olan *Fonsecaea pedrosoi*'de N-asetil nöraminik asit misellerde, N-glikolil nöraminik asit ise konidyumlarda belirlenmiştir (Souza et al., 1986). Fitopatojenik bir fungus olan *Ascochyta blight*'nin hücre yüzey bileşiminde bol miktarda Sia bulunmuştur (Benhamou and Ouellette, 1987). *Cryptococcus neoformans* türünde Neu5Ac ile 9-O asetilli türevi (Neu5,9Ac₂) maya formunda belirlenmiştir. Bu çalışma patojenik fungusta Neu5,9Ac₂'nin bulunduğu ilk çalışmadır (Rodrigues et al., 1997). İnsana patojen olan *P.brasiliensis*'in hif ve maya formlarının hücre yüzeylerinde Sia'nın yalnız Neu5Ac tipinin varlığı belirlenmiştir (Alviano et al., 1999).

Likenlerde Sia varlığına yönelik bir çalışma bulunmamasına karşın *Xanthoria ectaneoides* liken türünden elde edilen XEH1 protein ekstrakt çeşitli lektinlerle çalışılmasında proteinin eldesinin muhtemelen glikosillenmemiş olduğu (Scherrer et al., 2000), *Dictyonema glabratum*'dan elde edilen lektinin monosakkarit bileşiminin yüksek seviyede galaktoz, ksiloz, glukoz, mannoz ve glukozamin bileşenleri içerdiği belirlenmiş fakat Sia belirlenmemiştir (Elifio et al., 2000).

Bu bilgilerin ışığında **tezin amacı**; *Hypogymnia tubulosa* ve *Hypogymnia physodes* liken türlerinin 1- Histolojik yapılarının incelenmesi; 2- Likenlerde daha önce saptanamamış olan sialik asitlerin belirlenmesi ve ardından tipleri, miktarları ve kimyasal bağ özelliklerinin analitik (CapLC-ESI-MS/MS) ve mikroskobik (ışık mikroskobunda lektin histokimyası, transmisyon elektron mikroskobunda lektin sitokimyası) yöntemlerle gösterilmesidir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışma materyali olarak kullanılan likenler Parmeliacea familyasına ait *Hypogymnia tubulosa* ve *Hypogymnia physodes* türleridir. Likenler, 29.09.2009 tarihinde Eskişehir-Bozdağ çevresinden yapılan arazi çalışmasında belirlenen lokalitelerden toplanmıştır. Arazi çalışmasında toplanan liken türleri özel zarflara alınmıştır. Örneklerin toplandığı arazinin konumu Navigasyon cihazı yardımıyla belirlenmiş ve lokalitelerin koordinatları örneğin alındığı zarf üzerine ve arazi çalışması defterine kaydedilmiştir. Tür tayinleri Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Öğretim Üyesi olan Sayın Prof. Dr. Ayşen TÜRK tarafından yapılmıştır. Arazi çalışması sonucunda toplanan türlerin sistematigi aşağıda verilmiştir (Çizelge2.1). Liken örneklerinin fotoğrafları bilgisayara bağlı Dino-Lite dijital stereomikroskop ile çekilmiştir (Şekil 2.1a,b).

Çizelge 2.1: Çalışılan liken türlerine ait sınıflandırma (<http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxonForm1>).

Regnum: Fungi
Divisio: Ascomycota
Class: Lecanoromycetes
Ordo: Lecanorales
Familia: Parmeliaceae
Genus: <i>Hypogymnia</i>
species 1: <i>Hypogymnia tubulosa</i>
species 2: <i>Hypogymnia physodes</i>

Liken örneklerinin bir kısmı tezde kullanılmak üzere uygun koruma ortamlarına alınmış, bir kısmı da, kayıt altına alınmak üzere Ege Üniversitesi Herbaryumuna bırakılmıştır. Ege Üniversitesi Herbaryum numarası ile birlikte örneklerin toplandığı lokaliteler aşağıda belirtilmektedir.

1. Eskişehir Bozdağ Şöförler Çeşmesi 1156m. *Pinus nigra* ve *Quercus* topluluğu
39° 56' 54" K 30°40' 18" D

Hypogymnia tubulosa (*Pinus nigra* kabuğundan) (40784)

Hypogymnia physodes (*Pinus nigra* kabuğundan) (40783)

2. Yarımca Köyü kuzeydoğu 1277m. *Pinus nigra* ve *Quercus* topluluğu 39° 55' 41" K 30° 39' 00" D

Hypogymnia physodes (*Pinus nigra* kabuğu) (40783)

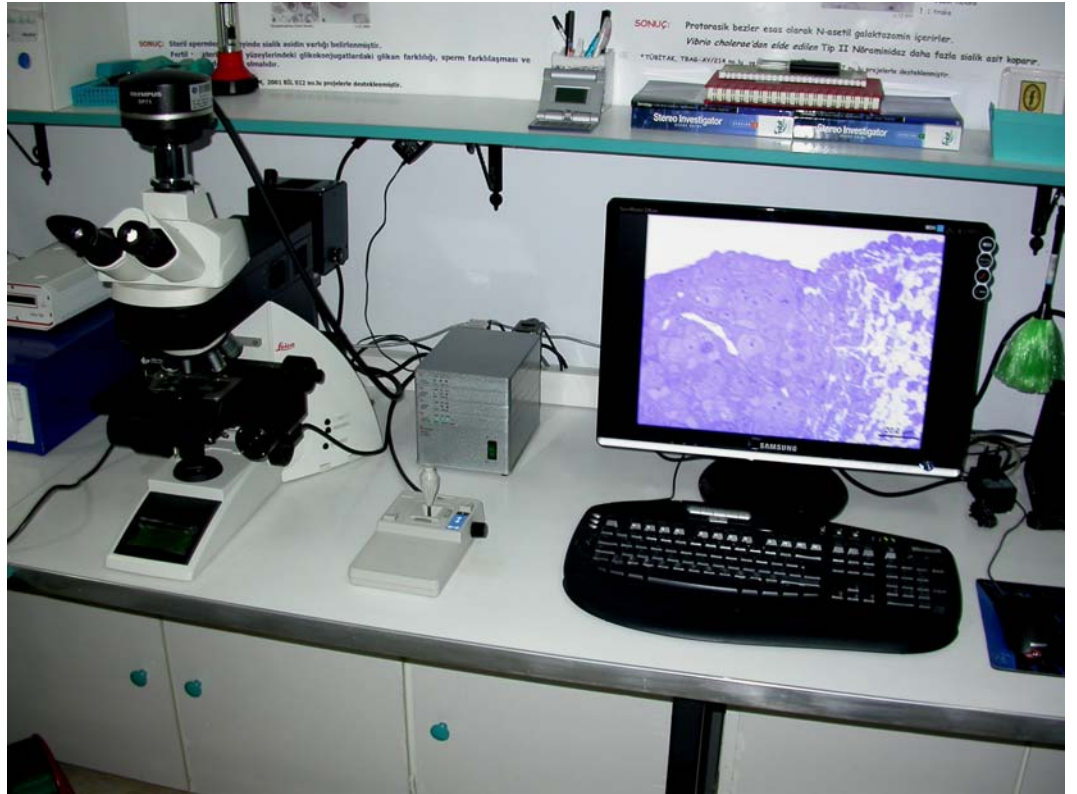


Şekil 2.1: *Hypogymnia tubulosa* (a) ve *Hypogymnia physodes* (b)'in genel görünümü.

2.2.Yöntemler

2.2.1. Histolojik yapının incelenmesi

Morfolojik incelemeler sonucunda çalışılacak *Hypogymnia tubulosa* ve *Hypogymnia physodes*'in uygun kısımları distile su ile yıkanarak kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Elde edilen liken kısımlarının ilk tespitleri Karnovsky tespit sıvısı (Karnovsky, 1965) içinde yapılmıştır. Daha sonra %1'lik OsO₄ ile ikinci tespit yapılmıştır (Millonig, 1961). Artan konsantrasyonlarda etil alkollerde (%25, %50, %75, %90, Absolü alkol) suyu çekilen örnekler epon serilerinden geçirilmiş ve Epon 812'ye gömülmüştür. Bu epon bloklardan ultramikrotomla alınan 0.25-0.75µm'lik kesitler Toluidin mavisi ile boyanarak aydınlık alan trinoküler digital araştırma mikroskobunda (Leica DM 4000B) incelenmiş ve video kamera (Olympus DP71) ile fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Bilgisayara bağlı trinoküler digital aydınlık alan/floresan mikroskobu (Leica DM 4000B) ile motorize stage ve video kamera (Olympus DP71) sistemi.

2.2.2. Sialik asitlerin belirlenmesi

2.2.2.1. CapLC-ESI-MS/MS ile sialik asitlerin belirlenmesi

Parmeliaceae familyasına ait *Hypogymnia tubulosa* ve *Hypogymnia physodes* liken türlerinde sialik asit (Sia) varlığının analizi için analitik tekniklerden Kapiler HPLC-Elektro Sprey İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi (CapLC-ESI-MS/MS) kullanılmıştır. Liken örneklerine asit hidroliz yöntemi uygulanarak elde edilen sonuçlar standart Neu5Ac ve Neu5Gc tip Sia'larla karşılaştırılmıştır. Bu yöntemde işlemler iki basamak altında toplanabilir. Bunlar; 1-Standart Sia'larn DMB ile türevlendirilmesi, sistemde çalışılması ve parçalanma iyonlarının belirlenmesi, 2-Liken örneklerinde Sia varlığının araştırılması.

1. Standart Sialik Asit Çalışmaları:

Ticari olarak satın alınan Neu5Ac (N-Acetylneuraminic Acid-NANA, Sigma A-9646) ve Neu5Gc (N-Glycolylneuraminic Acid, Sigma A-9793) 100µL taze hazırlanmış DMB (4,5-Methylenedioxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich) ile türevlendirildi ve sisteme enjekte edildi. Parçalanma iyonları tanımlandı.

2. Liken Türlerinde Sialik Asit Varlığının Araştırılması:

Asidik Hidroliz Yöntemi: Doku ve hücrelerdeki glikokonjugatlardan Sia bağının koparılması ve analizi için genellikle laboratuarlarda kullanılan en yaygın teknik, asidik hidroliz yöntemidir. Bu yöntem glikokonjugatlardan asidik ortamda şekerlerin proteinlerden, lipidlerden ve şeker zincirleri arasındaki kovalent bağların koparılıp, glikanların serbest kalmasını sağlar.

İlk olarak yaklaşık 100mg örnek havanda sıvı azot içerisinde mekanik olarak parçalanmıştır. Mekanik parçalamanın ardından ependorfa alınan örneğe 1mg/10µl oranında 2M Asetik asit ilave edilmiştir. 80°C etüvde 3 saat inkübe edilmiştir. 1500 rpm de 10dk. +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant kısım Sia analizi için kullanılmıştır.

Sialik Asitlerin Türevlendirilmesi: Serbest kalan Sia'ların türevlendirilmesi amacıyla 0.75 M Merkaptotanol, 18 mM Sodyum hidrosülfid içeren 1,4 M Asetik asit içindeki 7 mM DMB hazırlanmıştır. Santrifüj sonrası DMB ve süpernatant (Süpernatant/DMB oranı) 2/3 oranında karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım 2,5 saat 60°C'de etüvde inkübe edilmiştir. Neu5Ac ve Neu5Gc standardı hidroliz yapılmadan doğrudan türevlendirilerek cihaza verilmiştir.

Katı Faz Ekstraksiyon (SPE) ile Ön Temizleme: Kimyasal analizi yapılacak biyolojik ürünler genellikle aranan madde dışında birçok bileşenin yer aldığı karışık bir matriks içerirler. Bu nedenle örnek hazırlama; özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC), gaz kromatografi (GC), gaz kromatografi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) gibi cihazlar yardımıyla yapılan analizler öncesinde uygulanması gereken çok önemli bir basamaktır. Örnek hazırlama başlıca iki amaç için yapılmaktadır. Bunlar sırasıyla, örneklerin istenmeyen bileşenlerden temizlenmesi (clean-up) ve yoğunlaştırılmasıdır. Temizleme işlemi ile matriksten analizin yanlış sonuçlanmasına neden olabilecek, aranan maddenin tespit edilmesini engelleyebilecek veya analiz cihazlarının kirlenmesine neden olabilecek kirliliklerin uzaklaştırılması sağlanır. Günümüzde en etkili örnek hazırlama tekniklerinden olan SPE yaygın olarak kullanılmaktadır (Yavuz ve Aksoy, 2006).

Liken örneklerinin SPE metoduyla hazırlanması amacıyla SPE C18 (C18 1mℓ/ 100mg Chromabond – Macherey-Nagel) kolon örnek yükleme öncesi asetonitril ve ultrasaf su ile şartlandırılmıştır. C18 kolona örnek yüklendikten sonra ultrasaf su ile kolon kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla yıkanmış ve sonrasında da asetonitril geçirilmiştir. Böylece kolona tutunan DMB ile türevlendirilmiş Sia'ların asetonitril ile serbes hale geçmesi yani kolondan geri alınması sağlanmıştır. Ependorfa alınan örneklerden çözgenin (asetonitrilin) uzaklaştırılması işlemi azot gazı altında 35°C'de yaklaşık 2 saatte gerçekleştirilmiştir. Ependorf çeperine tutunan örneğin çözünmesi amacıyla 1,4M asetik asitten 50μl ilave edilmiştir. Ticari olarak satın alınan 4mm çapındaki filtreden geçirilmiştir (4mm True Syr Flt. 0,2Um Ny 100pk).

CapLC-ESI-MS/MS: Hidroliz, türevlendirme ve SPE ile örnek temizleme

işlemleri gerçekleştirildikten sonra CapLC-ESI-MS/MS de tanımlanan koşullarda analizleri yapılmıştır. Türevlendirilmiş Sia'ların analizi Agilent 1200 Capillary HPLC sistemi ve ODS Analitik kolon (Agilent ZORBAX SB-C18 150 x 0.5 mm, 5µm, USA) (Şekil 2.3) kullanılarak yapılmıştır. Mobil faz izokratik olarak 20µl/dk akış ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz bileşimi metanol-asetonitril- su (7,5: 5: 87,5 v/v) şeklindedir. Kolon analiz süresince oda koşullarında tutulmuştur. Çalışılan örnekler 5°C'ye soğutulmuş otomatik örnekleyicide saklı tutulmuştur. LC sistem Elektro sprey iyonizasyon ara yüzüne bağlıdır. Kütle spektrometresi ölçümleri HCT Ultra iyon trap sisteminde (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Şekil 2.3) pozitif modda yapılmıştır. Spektrometrik koşullar EsquireControl 6.1 yazılımı ile otomatik olarak ayarlanmıştır. Nebulizer ve kurutma gazları azot ve iyon trap parçalama gazı olarak helyum (% 99,9 saflıkta) kullanılmıştır. Kurutma gazı 310°C Nebulize basıncı 15.0 psi ve kurutma gazı akışı 5l/dk olarak belirlenmiştir. Kütle spektrumları 200-600 m/z aralığında 26000 m/z/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3: Kapiler HPLC (Agilent 1200) - Elektro Sprey İyonizasyon - Kütle Spektroskopisi Bruker Daltonics) sistemi.

2.2.2.2. Lektin histokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi

Sia'ların lektin histokimyası yöntemiyle belirlenmesi için lowicryl kesitlere uygulama yapılmıştır. Bunun için, %4'lük paraformaldehit ile tespit edilen liken örnekleri (Cap LC-ESI-MS/MS sonuçlarına göre en yüksek oranda Sia belirlenen *H.tubulosa*) 0°C'den başlayarak -20°C ve -35°C'ye kadar düşürülen sıcaklıklarda, yükselen etil alkol serileri ve alkol-reçine (lowicryl HM20) karışımlarından geçirilmiştir. Saf reçinede infiltrasyonun ardından Lowicryl HM20 akrilik reçineye gömülen örnekler 360 nm uzun dalga UV ışık altında -35°C'de polimerize edilmiştir (Deveci vd., 2010). Bu işlemler -20°C'den itibaren "Automatic Freeze Substitution System" cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.4). Polimerize olan bloklardan alınan 0.75µm'lik kesitlere taze hazırlanmış 0.003'lük hidrojen peroksit uygulanmıştır. Distile su ve lektin çeşidine göre PBS/TBS ile yıkandıktan sonra bloklama tamponuna alınmış ve ardından aynı tamponda hazırlanmış olan HRP işaretli lektinlerle (kullanılan lektinlerin Sia seçicilikleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir) oda sıcaklığında ve nemli odacıkta inkübe edilmiştir. PBS/TBS yıkamalarının ardından diaminobenzidin (DAB) ile muamele edilerek PBS/TBS ile yıkanarak digital araştırma mikroskopunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir..



Şekil 2.4: Automatic Freeze Substitution System cihazında lowicryl serilerinin gerçekleştirilmesi

Çizelge 2.2: Lektin histokimyası için kullanılan HRP işaretli lektinler ve sialik asit seçicilikleri.

Lektin Adı	Lektinin Kısa Adı	Sia Seçicilikleri
<i>Limax flavus</i> agglutinin	LFA	Neu5Ac
<i>Maackia amurensis</i> agglutinin	MAA	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	SNA	Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc

2.2.2.3 Lektin sitokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi

Sia'ların lektin sitokimyası yöntemiyle belirlenmesi için lowicryl kesitlere uygulama yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan lowicryl blokların hazırlanması, lektin histokimyası yöntemlerinde açıklandığı şekildedir. Lowicryl HM20 bloklarından alınan ince kesitlere 10 nm çapında koloidal altın bağlı lektinler uygulanmıştır. Bunun için PBS/TBS ile yıkama ve bloklama tamponunda bekletmenin ardından altın işaretli lektinlerle inkübasyon yapılmış, PBS/TBS ile yıkama ve uranil asetat-kurşun sitrat ile kontrastlamanın (D'Amico ve Jacobs, 1995) ardından Jeol 100C Transmisyon elektron mikroskopunda incelenerek mikrografları alınmıştır (Deveci vd., 2004; Deveci ve Karaçalı, 2006; Deveci vd., 2010). Kullanılan altın işaretli lektinler ve şeker spesifiklikleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3: Lektin sitokimyası için kullanılan altın işaretli lektinler ve sialik asit seçicilikleri.

Lektin Adı	Lektinin Kısa Adı	Sia Seçicilikleri
<i>Limax flavus</i> agglutinin	LFA	Neu5Ac
<i>Limulus polyphemus</i> agglutinin	LPA	Neu5Ac

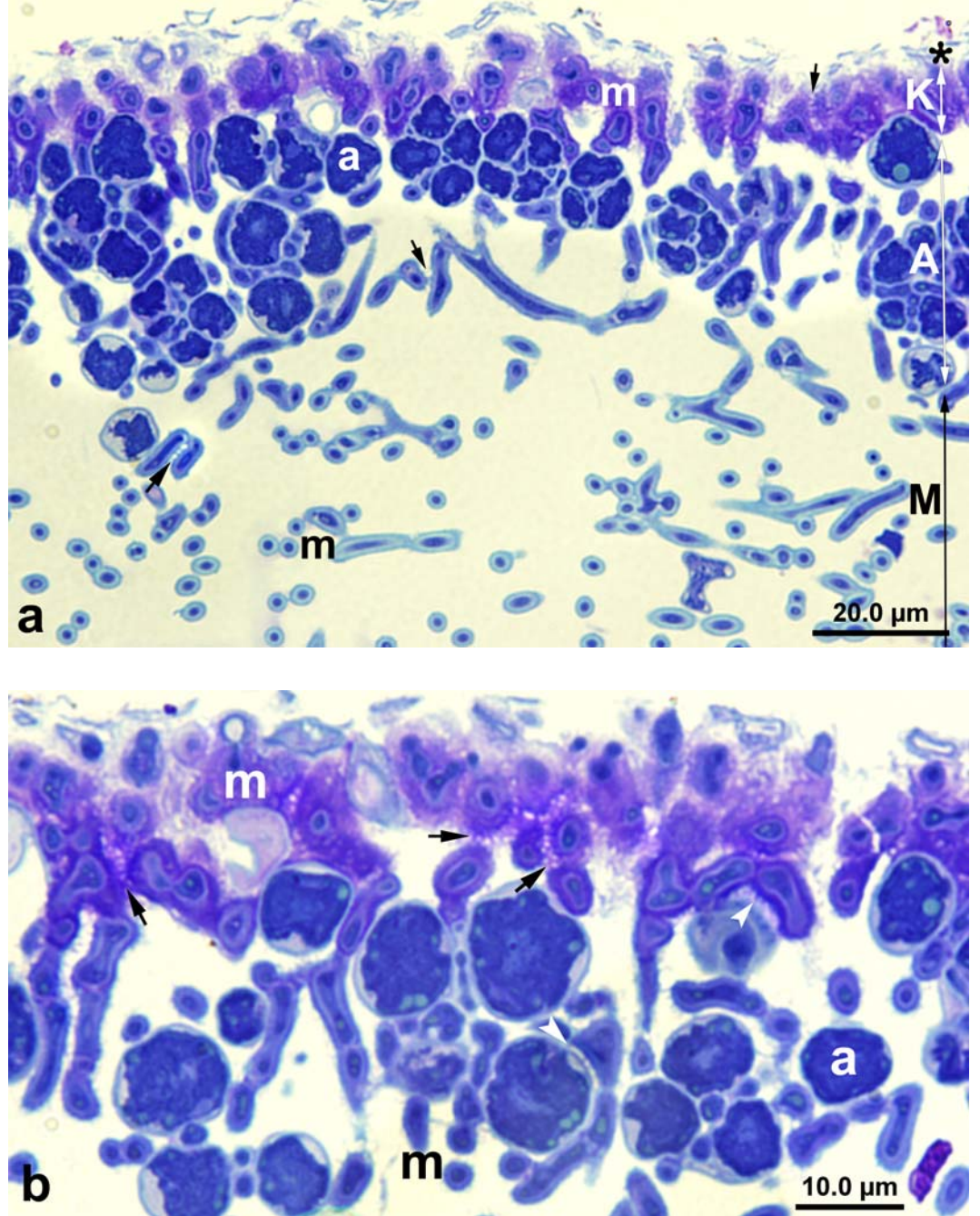
3. BULGULAR

3.1. Histolojik Yapının Gösterilmesi

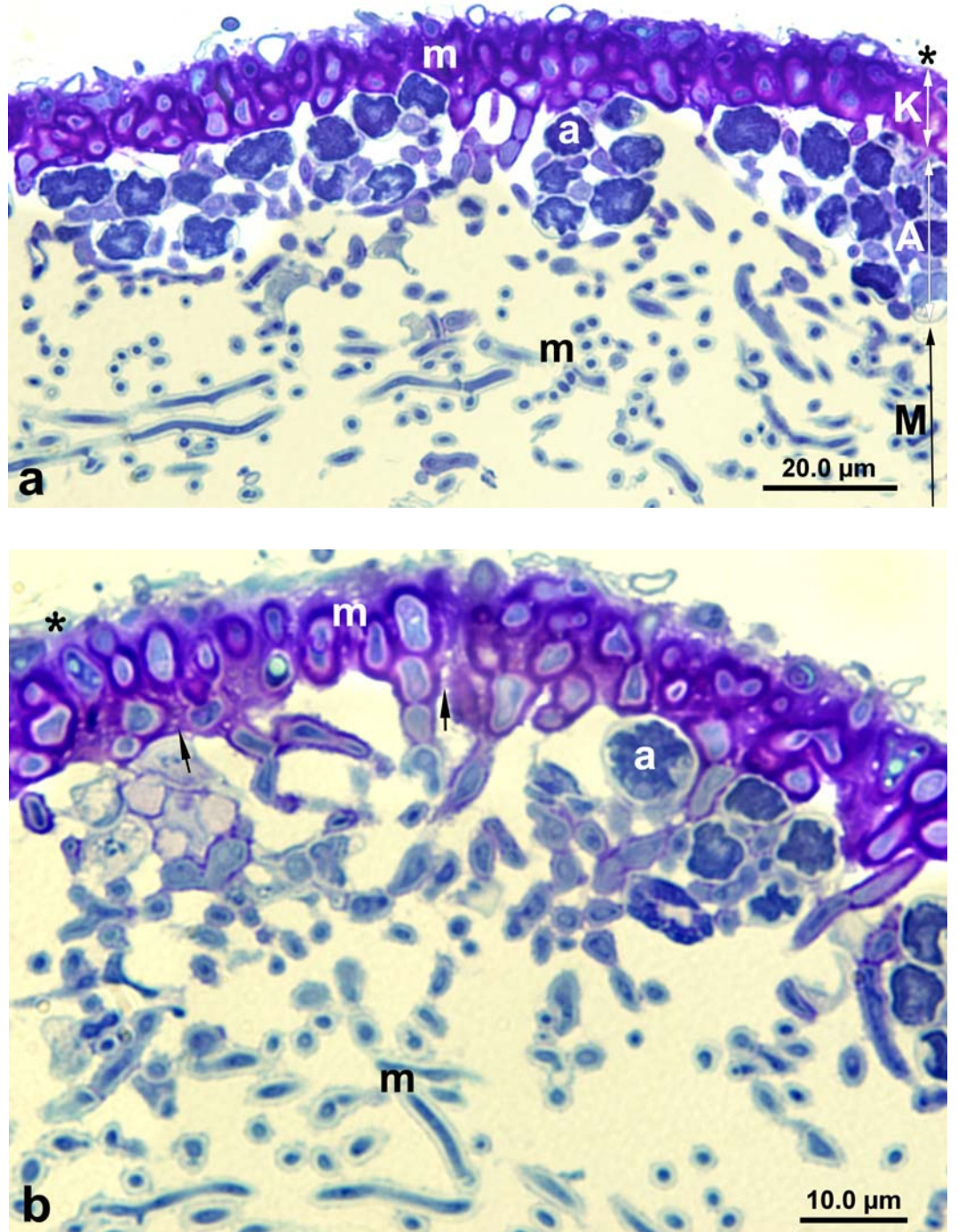
Çalışılan liken türleri *Hypogymnia tubulosa* ve *Hypogymnia physodes*'de histolojik yapı incelendiğinde, tallus yapısında alg ve mantar hücrelerinin (mantar hiflerinin) tabakalı bir yapı oluşturduğu (heteromerik tallus) gözlenmiştir. Her iki türde de en üstte gevşek yapılı ince bir epikorteks kısmı yer almaktadır. Bunun hemen altında yer alan korteks kısmında mantar hücreleri bulunur. Korteksin altında alg hücrelerinin yerleştiği algsi tabaka yer alır. Bu tabakada, alg hücrelerinin etrafında düzensiz yerleşmiş mantar hifleri de bulunmaktadır. Algsi tabakanın altında ise yine mantar hiflerinin gevşek ve düzensiz dağılım gösterdiği bir medulla kısmı yer alır (Şekil 3.1a; 3.2a). Medullanın altında yer alan alt tabaka, düzenli mantar hücrelerinden oluşur ve likenin yaşadığı substratına tutunmasını sağlar.

Hypogymnia tubulosa'da korteksi oluşturan mantar hücreleri çok sıkı bir dizilim göstermez. Hücreler uzun çıkıntılarla birbirlerine tutunurlar. Bu hücrelerin ortasında çok yoğun kısım ile bunu ince bir bant gibi saran açık renkli bir tabaka ayırt edilir. Algsi tabakada yer alan alg hücreleri mantar hücrelerine göre daha büyüktür. Hücreleri dıştan saran hücre duvarının altında yer alan açık ve koyu boyalı sitoplazmik bölümün büyük bir kısmını iri kloroplast doldurmaktadır. Koyu boyalı sitoplazmik bölümün dış kenarlarında iri vakuoller görülür. Gerek bu bölgedeki gerekse medulla bölümündeki mantar hücrelerinin dış kısmı korteks tabakasındaki mantar hücrelerinden daha incedir, uzun çıkıntılar içermez ve korteks mantar hücrelerindeki pembe-mor boyanma da görülmez. Yine de, mantar hücreleri daha ince çıkıntılarla algsi tabakadaki alg hücrelerine tutunurken, medulla tabakasındaki mantar hücreleri arasında da bağlantılar olabilmektedir (Şekil 3.1a,b).

Hypogymnia physodes'de korteks tabakasını oluşturan mantar hücreleri *H.tubulosa*'dan farklı olarak daha sıkı bir dizilim gösterir. Hücreler uzun çıkıntılarla değil koyu boyalı yoğun hücrelerarası matriks elemanları ile adeta birbirlerine yapışmış gibidir. Yer yer uzantılarla da tutunurlar (Şekil 3.2a,b).



Şekil 3.1: *Hypogymnia tubulosa* enine kesitinde tabakaların genel (a) ve ayrıntılı (b) yapısı. *, epikorteks; K, korteks; A, algi tabaka; M, medulla; a, alg hücresi; m, mantar hücreleri; ➔, mantar hücreleri arasındaki tutunmalar; ➤, mantar hücresi-alg hücresi arasındaki tutunmalar (Epon kesit, toluidin mavisi).



Şekil 3.2: *Hypogymnia physodes* enine kesitinde tabakaların genel (a) ve ayrıntılı (b) yapısı. *, epikorteks; K, korteks; A, algi tabaka; M, medulla; a, alg hücreleri; m, mantar hücreleri; ➔, mantar hücreleri arasındaki tutunmalar (Epon kesit, toluidin mavisi).

3.2. Sialik Asitlerin Belirlenmesi

3.2.1 CapLC-ESI-MS/MS ile sialik asitlerin belirlenmesi

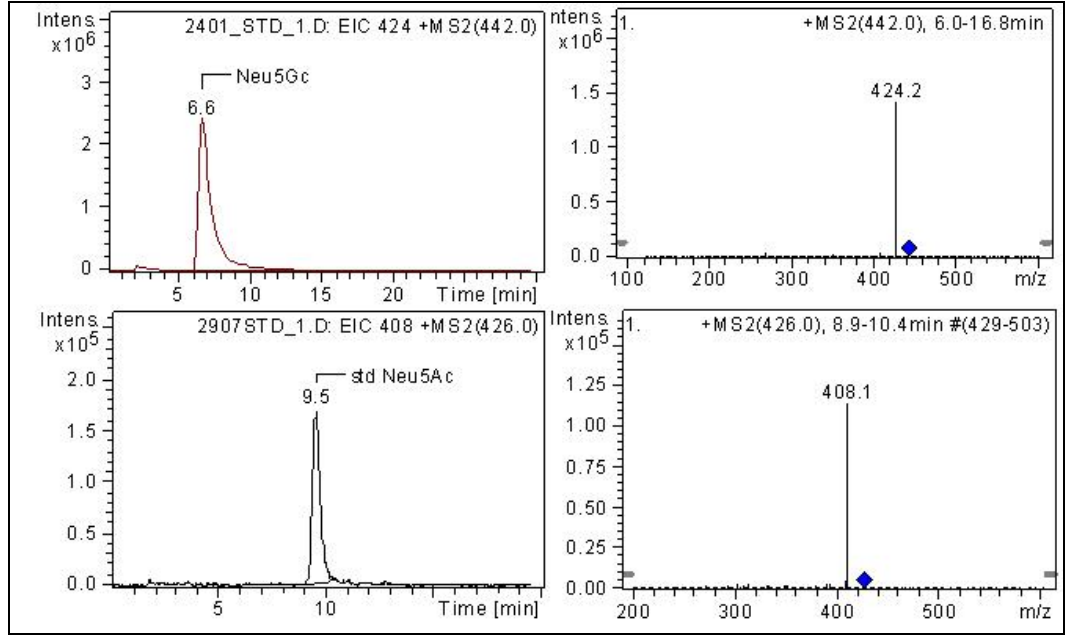
Yöntem kısmında değinildiği gibi, *Hypogymnia* cinsine ait iki liken türünde asit hidroliz, türevlendirme ve katı faz ekstraksiyon işlemlerinin ardından CapLC-ESI-MS/MS’de tanımlanan koşullarda analizleri yapılmıştır.

Sia’nın mol kütlesi 309.3g/mol ‘dür. DMB ile türevlendirildikten sonra yeni oluşan bileşiğin mol kütlesi 425g/mol olur. Pozitif modda $[M+H]^+$ biçiminde gözlenen kütle bir proton ilavesiyle m/z: 426 olur. Kütle spektrometrisinde izole edilen bu iyon MS/MS yöntemiyle tekrar parçalandığında karakteristik 408 iyonunu ($[M+H-18]^+$) verir. Bu iyonun dışında 313-295-283-229 iyonları da gözlenir (Çizelge 3.1).

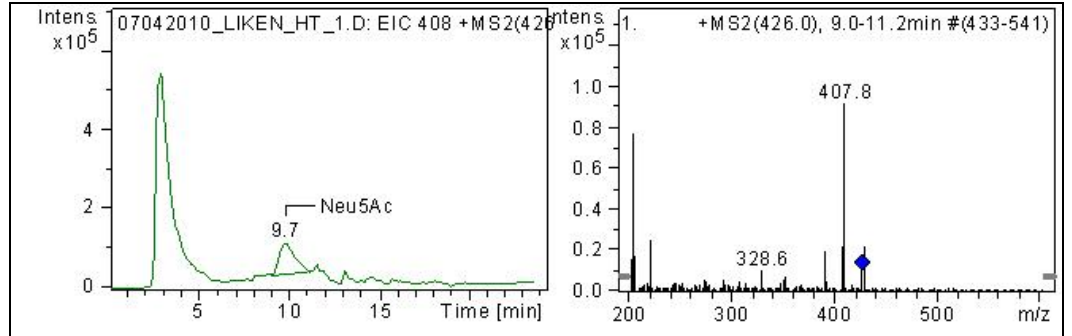
Çizelge 3.1: Sialik asitin DMB türevine ait ana iyon ve parçalanma iyonları.

Sialik asit	[M+H] ⁺	CID Parçalanmaları	
		[M+H-18] ⁺	Parçalanma iyonları
Neu5Ac	426	408	313-295 283-229
Neu5Gc	442	424	313-268-283-229

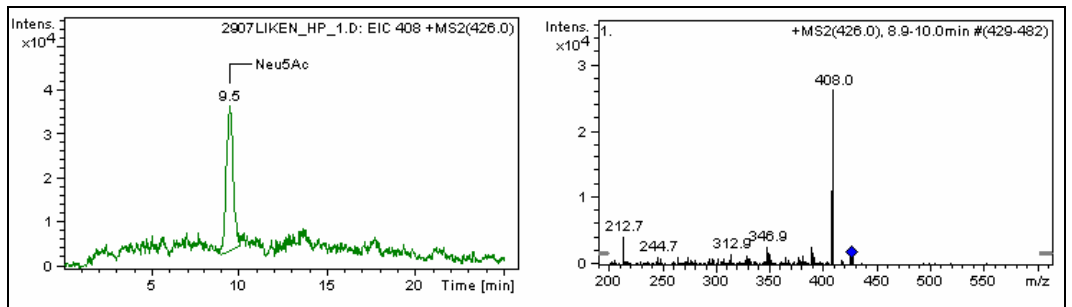
Gerek standart Sia tipleri için gerekse liken örnekleri için kromatogram ve spektrumlar oluşturulmuştur. Standart Neu5Gc ve Neu5Ac belirtilen kromatografik koşullarda sırasıyla 6.5 ve 9.7 dakikada pik vermiştir (Şekil 3.3). Bu yöntem *Hypogymnia tubulosa* ve *Hypogymnia physodes*’e uygulandığında her iki türde de alıkonma zamanı 9.7 dakika olarak saptanmıştır. Bu veri ve kütle spektrometresinden elde edilen parçalanma iyonlarının standart ile uyumlu olması çalışılan liken türlerinde Neu5Ac varlığının kanıtıdır (Şekil 3.4; 3.5). Liken türlerinde belirlenen Sia’ya ait kromatogramların ortalama alan değerlerine bakılarak sialik asit miktar karşılaştırmaları hem pik alanlarına göre hem de nicel analiz sonuçlarına göre yapılmıştır (Şekil 3.6). Çalışılan liken türlerinde Neu5Gc ve diğer Sia çeşitleri gözlenmemiştir.



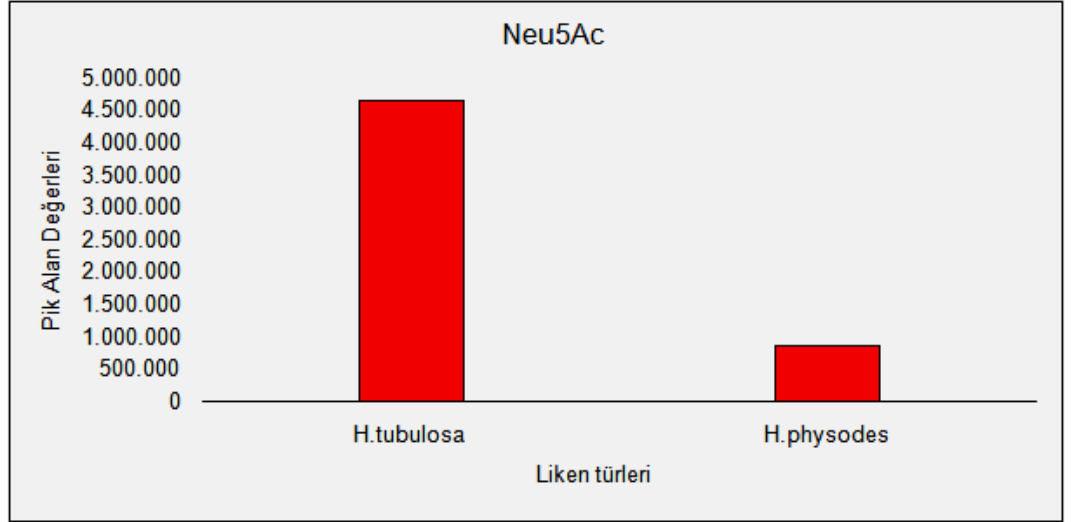
Şekil 3.3: Standart sialik asit tiplerine (sırasıyla Neu5Gc ve Neu5Ac) ait kromatogram ve spektrumlar.



Şekil.3.4: *Hypogymnia tubulosa* liken türüne ait kromatogram ve spektrum.



Şekil 3.5: *Hypogymnia physodes* liken türüne ait kromatogram ve spektrum.

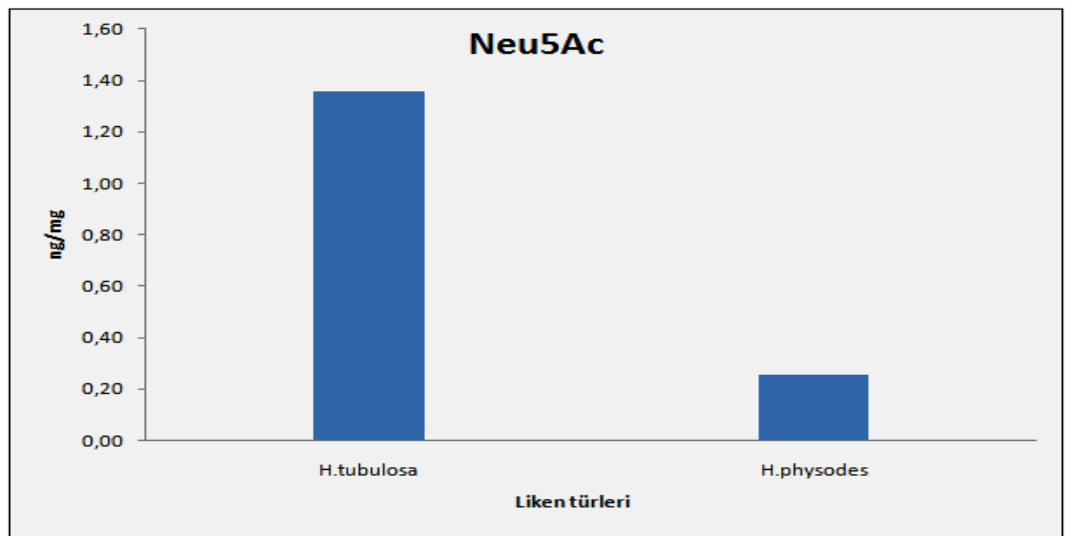


Şekil 3.6: *H.tubulosa* ve *H.physodes* liken türlerinde sialik asit miktarlarının pik alanlarına göre karşılaştırılması.

Liken türlerinde belirlenen Sia miktarları ng/mg cinsinden hesaplanmış ve mg başına bulunan Sia miktarları *H.tubulosa*'da 1,36 ng, *H.physodes*'te 0,25 ng olarak hesaplanmıştır. Bu verilere ilişkin çizelge ve grafik oluşturulmuştur (Çizelge 3.2; Şekil 3.7).

Çizelge 3.2 *H.tubulosa* ve *H.physodes* liken türlerinde belirlenen sialik asidin ng/mg cinsinden miktarı.

Liken türleri	Hesaplanan Sia miktarı
<i>Hypogymnia tubulosa</i>	1,36 ng
<i>Hypogymnia physodes</i>	0,25 ng



Şekil 3.7: *H.tubulosa* ve *H.physodes* liken türlerinde bulunan sialik asitin ng/mg cinsinden miktarı.

3.2.2. Lektin histokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi

Aydınlık alan ışık mikroskobunda lektin histokimyası ile Sia'nın ve bağ tiplerinin belirlenmesinde, LC-MS/MS sonuçlarına göre daha fazla Sia içerdiği belirlenen *Hypogymnia tubulosa* türü tercih edilmiştir. "Lowicryl" bloklardan alınan 0,75 µm'lik *H.tubulosa* enine kesitlerine uygulanan lektinler (LFA, MAA, SNA), uygulama yapılmamış kontrol örnekleriyle karşılaştırılmıştır.

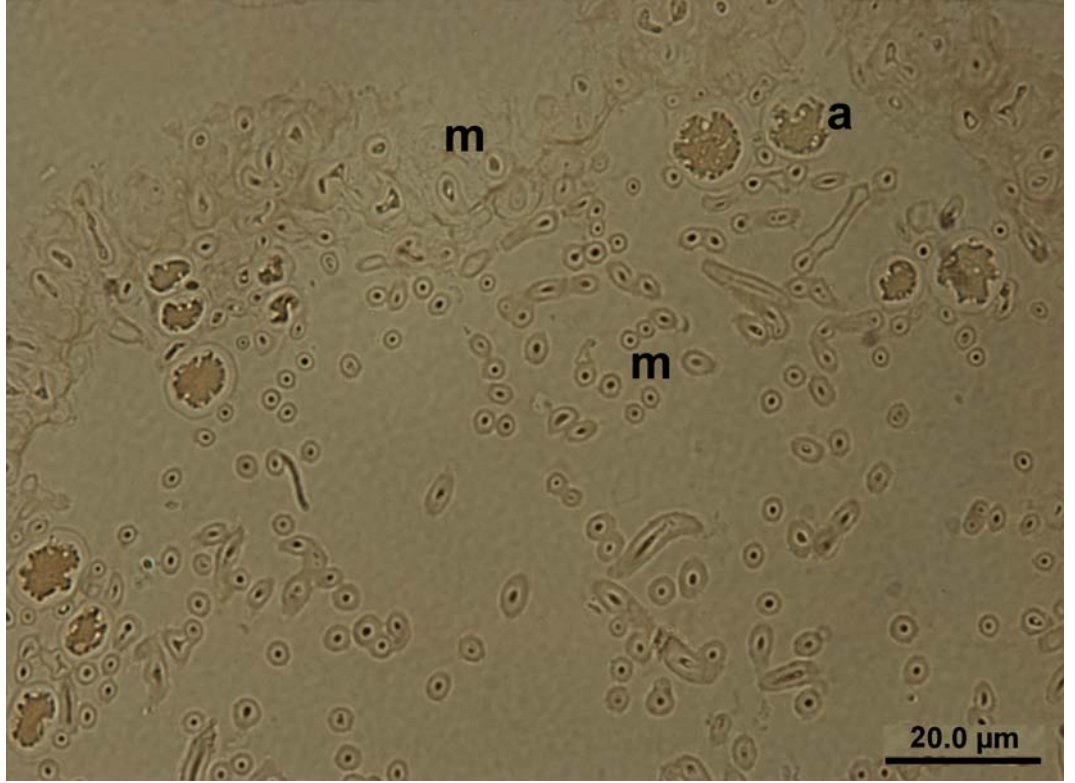
Kontrol kesitlerinde doğal olarak gözlenen renklenme bölgeleri (özellikle medulla bölgesindeki mantar hücrelerinin nukleusları ile alg hücrelerinin sitoplazmik bölümü) lektin gruplarında dikkate alınmamış, sadece kontrol grubunda renklenme gözlenmeyen bölgelere göre karşılaştırmalar yapılmıştır (Şekil 3.8).

Tüm Sia'larla bağ oluşturabilen HRP işaretli **LFA** lektin uygulanmış kesitlerde kahverengi DAB reaksiyonu en fazla korteks bölgesinin yüzeye bakan bölümündeki mantar hücrelerinde görülmüştür. Boyanma reaksiyonları bu hücrelerin özellikle dış yüzeylerinde çok belirgindir. Bu hücrelerin nukleuslarında da daha hafif olarak + reaksiyonlar gözlenmiştir (Şekil 3.9).

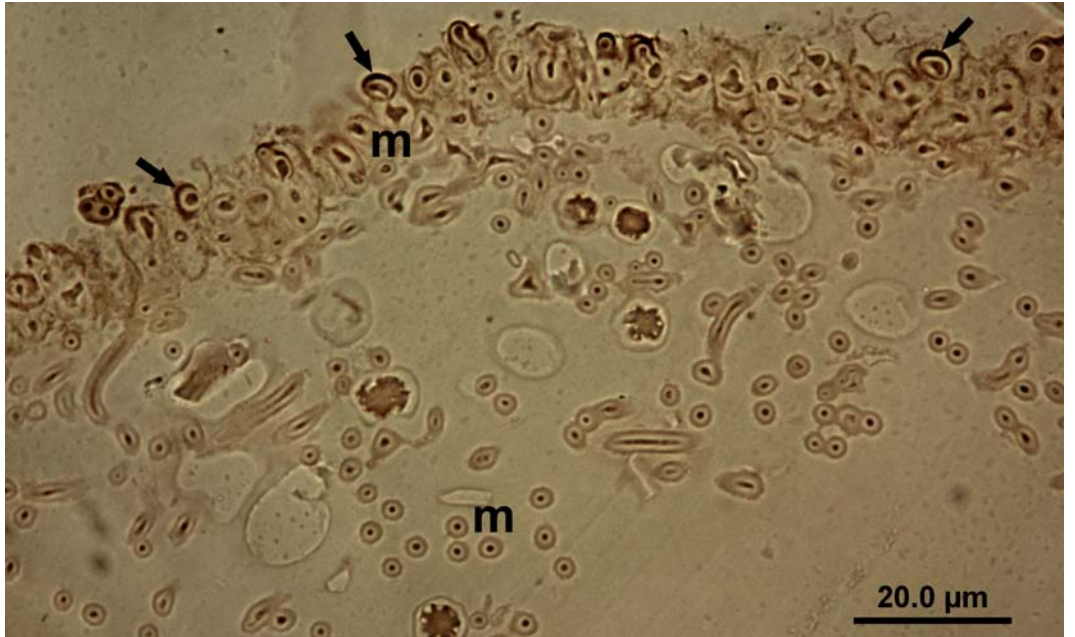
Sia'nın α -2,3 bağına özgün HRP işaretli **MAA** lektin uygulanmış kesitlerde kahverengi DAB reaksiyonu LFA reaksiyon bölgeleri ile benzerlik göstermiştir. Ancak reaksiyon oranı azalmıştır. Bu azalma özellikle dış yüzeydeki hücrelerde daha belirgindir. Bu bölgedeki mantar hücrelerinin nukleusları da LFA işaretlenmesinden daha azdır (Şekil 3.10).

Sia'nın α -2,6 bağına özgün HRP işaretli **SNA** lektin uygulanmış kesitlerde kahverengi DAB reaksiyonu hem LFA hem de MAA'ya reaksiyon bölgeleri ile benzerdir. Reaksiyon oranı ise genel olarak MAA'ya oranla biraz azalmıştır. Mantar hücrelerinin nukleuslarında da işaretlenme azalmıştır (Şekil 3.11).

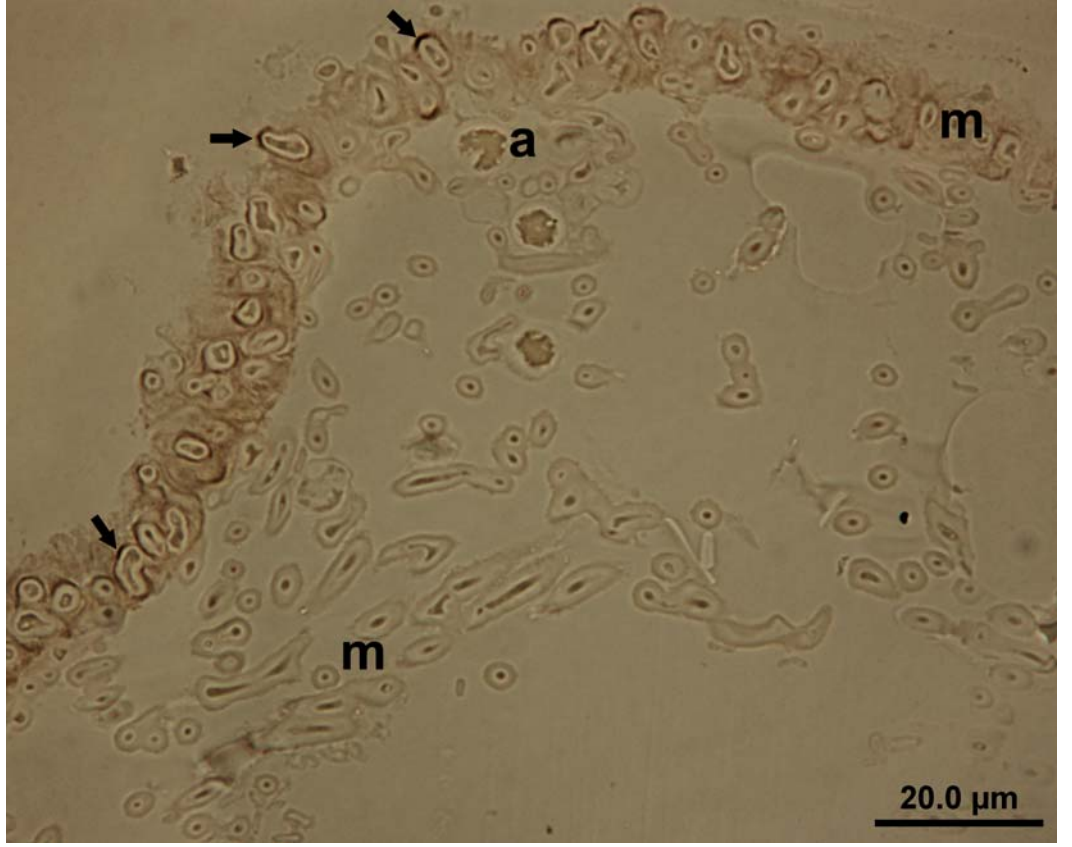
Bu bulgulara göre Sia'lar korteks bölgesi mantar hücrelerinin hücre yüzeyleri ve nukleuslarında en fazladır. α -2,3 bağlı Sia'lar α -2,6 bağlı Sia'lardan -özellikle nukleusta- biraz daha fazladır.



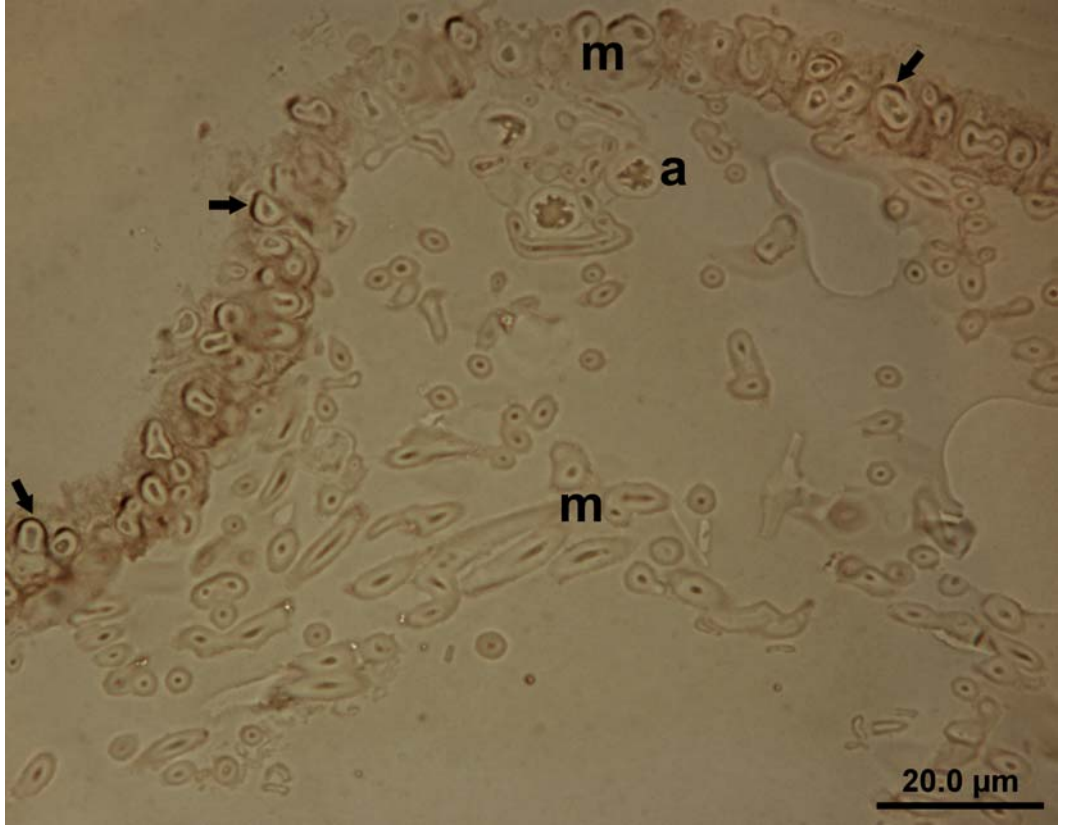
Şekil 3.8: *H.tubulosa* liken türünde lektin uygulaması yapılmamış **Kontrol** kesit örneği. m, mantar hücresi; a, alg hücresi (Lowicryl kesit, HRP-DAB).



Şekil 3.9: *H.tubulosa* liken türünde HRP işaretli **LFA** lektinin DAB+ reaksiyonu (➔). m, mantar hücresi; a, alg hücresi (Lowicryl kesit, HRP-DAB).



Şekil 3.10: *H.tubulosa* liken türünde HRP işaretli MAA lektinin DAB+ reaksiyonu (➔). m, mantar hücresi; a, alg hücresi (Lowicryl kesit, HRP-DAB).



Şekil 3.11: *H.tubulosa* liken türünde HRP işaretli SNA lektinin DAB+ reaksiyonu (➔). m, mantar hücresi; a, alg hücresi (Lowicryl kesit, HRP-DAB).

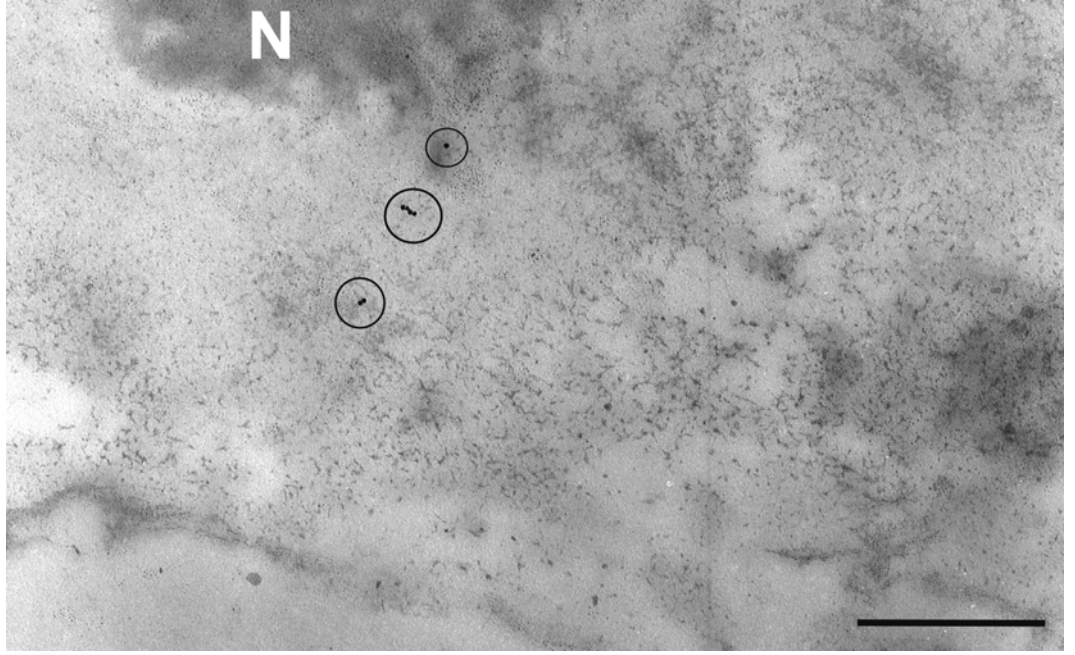
3.2.3. Lektin sitokimyası ile sialik asitlerin belirlenmesi

Transmisyon elektron mikroskopunda lektin sitokimyası ile Sia'nın hücrel yerleşiminin ayrıntılı belirlenmesi için, yine LC-MS/MS sonuçlarına göre daha fazla Sia içerdiği belirlenen *Hypogymnia tubulosa* türü tercih edilmiştir. “Lowicryl” bloklardan alınan ince kesitlere, tüm Sia'larla bağ oluşturabilen LFA (*Limax flavus* agglutinin) ve LPA (*Limulus polyphemus* agglutinin) lektinleri uygulanmıştır. Kesitlerde altın partikülleri aranmış ve hücrelerdeki yerleşim yerleri incelenmiştir.

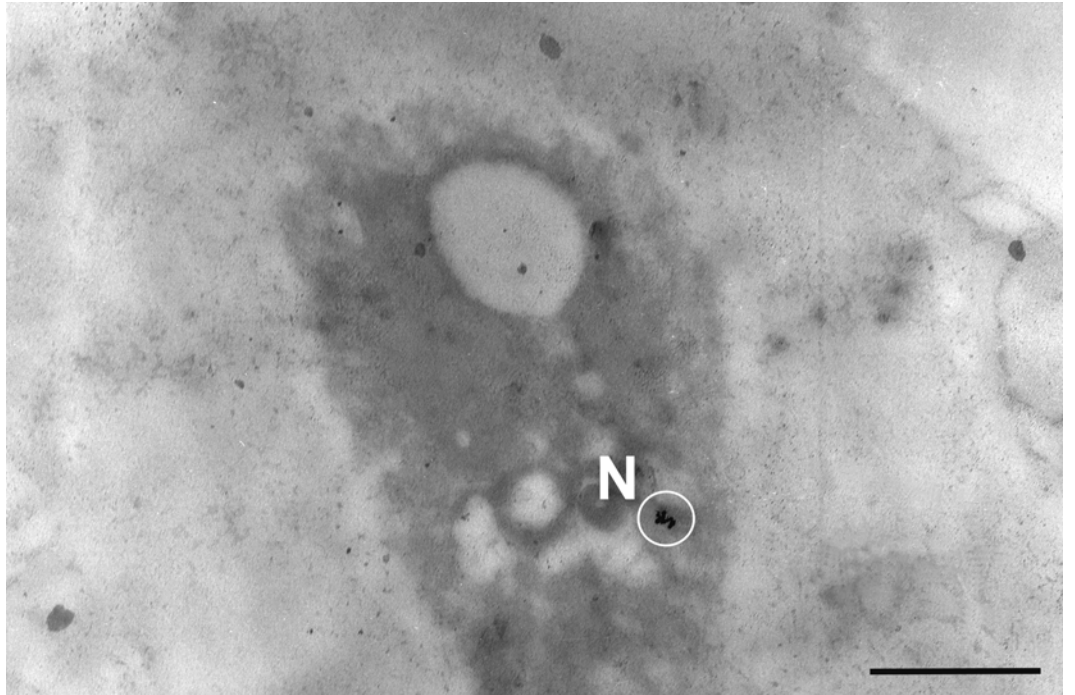
Tüm Sia'larla bağ oluşturabilen koloidal altın işaretli **LFA** lektin uygulanmış ince kesitlerde altın tanecikleri hem mantar hücrelerinde hem de alg hücrelerinde görülmüştür. Mantar hücrelerinin nukleusa yakın, elektronca yoğun olmayan sitoplazmik bölgelerinde altın tanecikleri küçük gruplar halinde görülmüştür (Şekil 3.12). Mantar hücrelerinin merkezinde elektronca yoğun nukleus bölgesinde de grup halinde yerleşmiş çok sayıda altın taneciği vardır (Şekil 3.13). Alg hücrelerinin hücre duvarında ve elektronca yoğun sitoplazmik bölgenin hem dış kenarlarında hem de iç kısmında altın tanecikleri bulunmaktadır (Şekil 3.14). Nukleusta da altın tanecikleri çok sayıda gruplar oluşturmuştur (Şekil 3.15).

Tüm Sia'larla bağ oluşturabilen koloidal altın işaretli **LPA** lektin uygulanmış ince kesitlerde de altın tanecikleri hem mantar hücrelerinde hem de alg hücrelerinde görülmüştür, ancak LFA'ya oranla daha az bulunmaktadır. Mantar hücrelerinin hücre duvarında ve hücre zar yüzeylerinde altın tanecikleri tek tek veya küçük gruplar şeklinde izlenmiştir (Şekil 3.16; 3.17). Alg hücrelerinde, elektronca az yoğun sitoplazmik bölgede yer alan halka yapısının içinde (Şekil 3.17) ve elektronca yoğun sitoplazmik bölge içinde (Şekil 3.18) az sayıda altın taneciği gözlenmiştir.

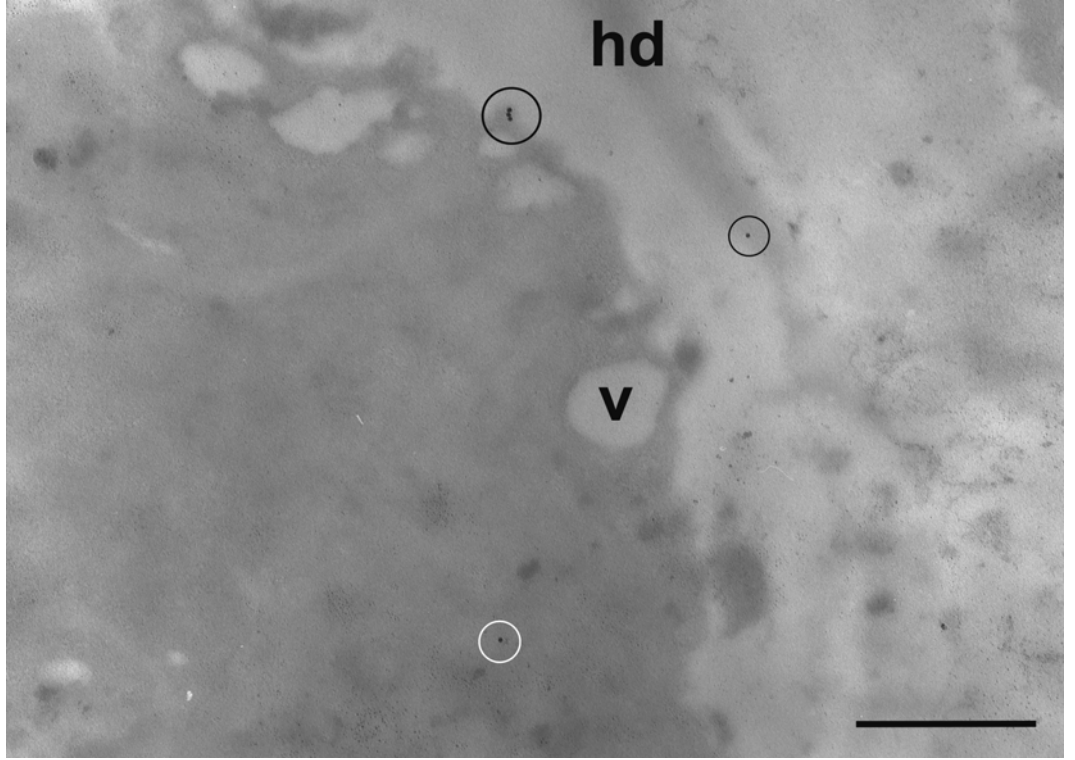
Bu bulgulara göre Sia'lar mantar hücrelerinin hücre duvarı, hücre zarı, sitoplazma ve nukleusunda bulunmaktadır. Nukleusta en fazladır. Alg hücrelerinde de hücre duvarı, elektronca yoğun sitoplazmik bölge ve nukleusta vardır ve nukleusta boldur, diğer kısımlarda mantar hücrelerine oranla daha azdır.



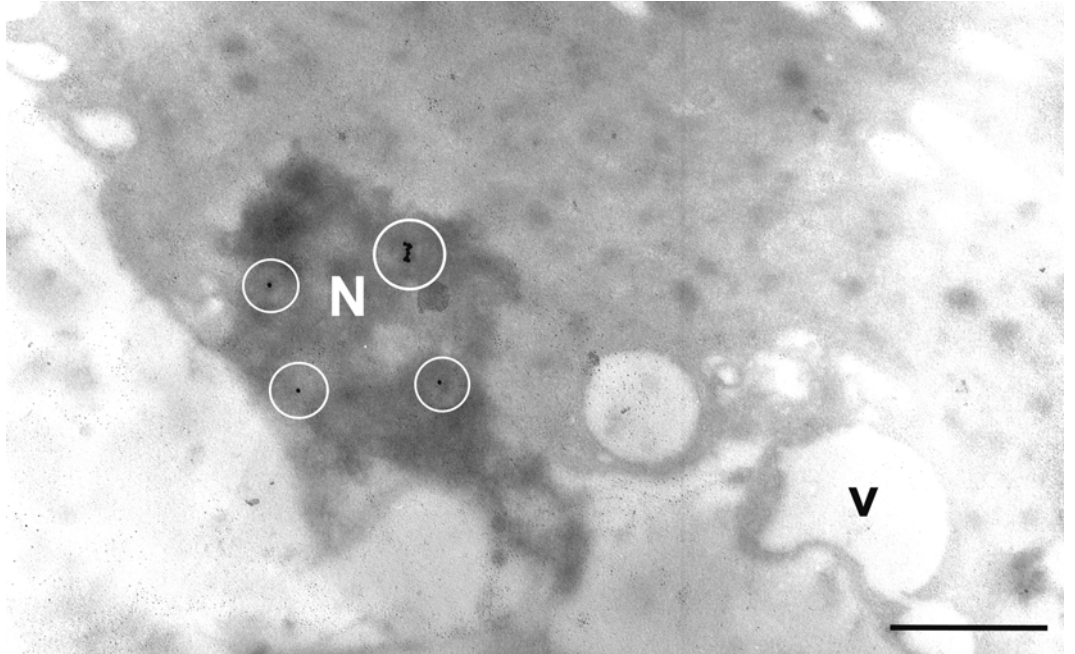
Şekil 3.12: *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli LFA lektin uygulaması ile **mantar** hücresinin elektronca az yoğun sitoplazma kısmında küçük gruplar halindeki altın tanecikleri (○). N, nukleus (Lowicryl kesit, bar: 0,5 µm).



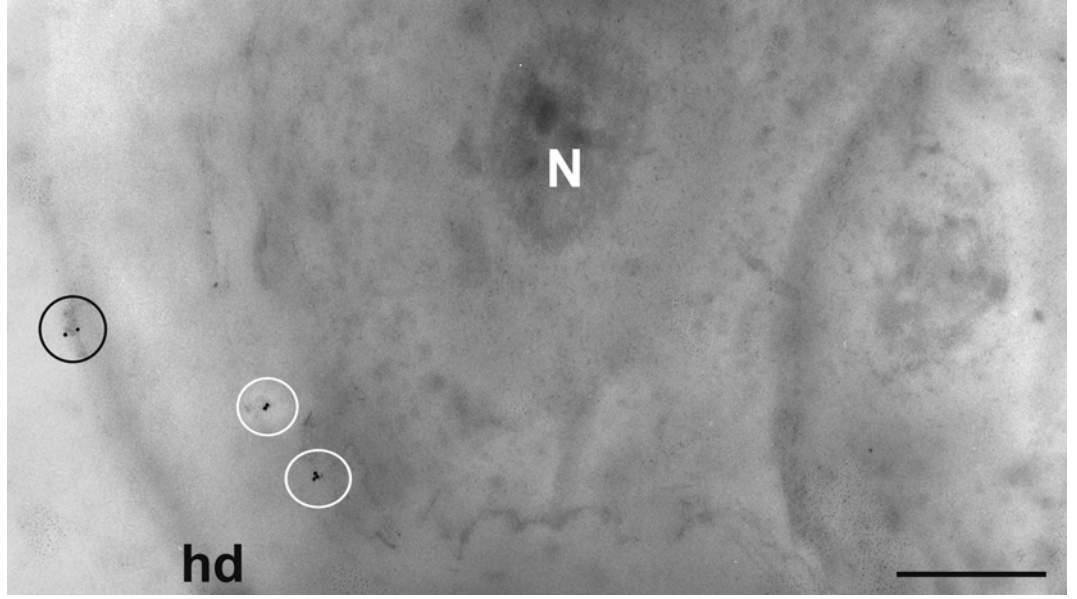
Şekil 3.13: *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli LFA lektin uygulaması ile **mantar** hücresinin merkezindeki elektronca yoğun nukleus bölgesinde (N) grup halindeki altın tanecikleri (○).(Lowicryl kesit, bar: 0,5 µm).



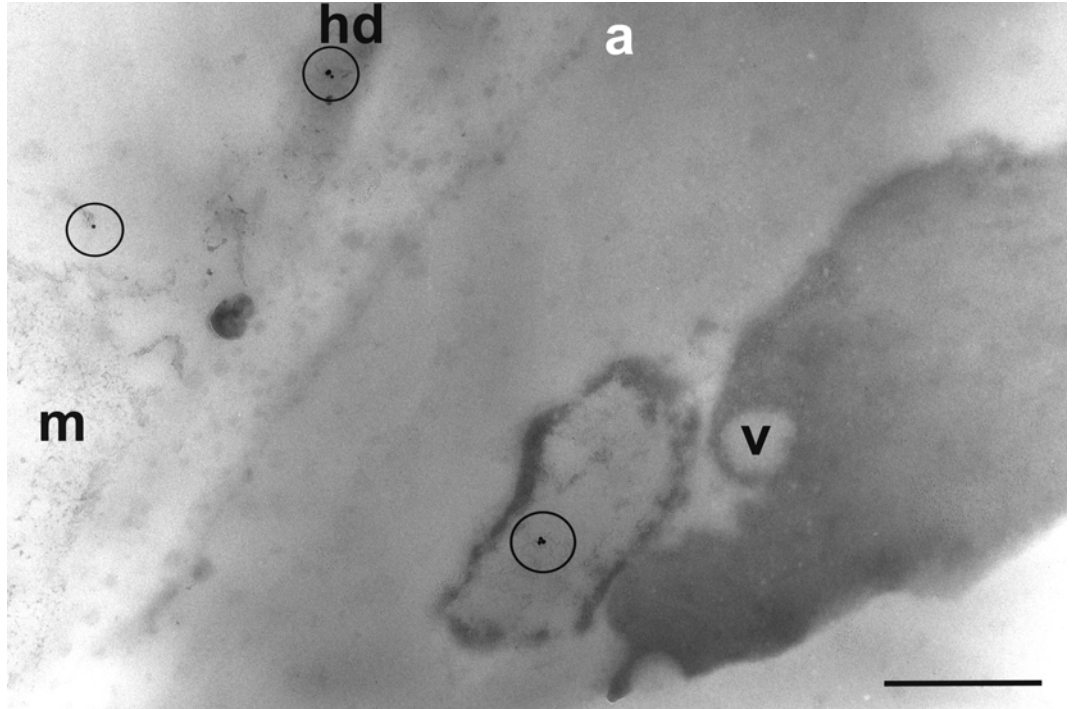
Şekil 3.14: *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli **LFA** lektin uygulaması ile **alg** hücresinin hücre duvarında (hd) ve elektronca yoğun sitoplazmik bölgenin dış kenarı ile iç kısmında altın tanecikleri (○). v, vakuol (Lowicryl kesit, bar: 0,5 µm).



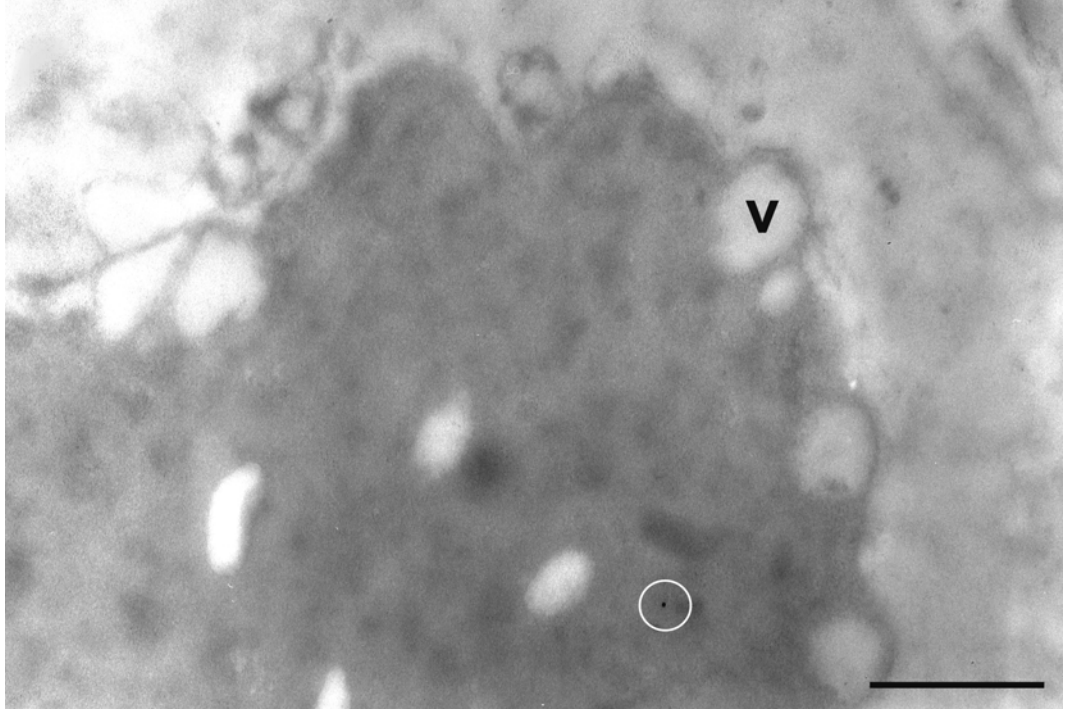
Şekil 3.15: *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli **LFA** lektin uygulaması ile **alg** hücresinin nukleusunda (N) çok sayıda altın tanecikleri (○). v, depo vakuölü (Lowicryl kesit, bar: 0,5 µm).



Şekil 3.16: *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli **LPA** lektin uygulaması ile **mantar** hücresinin hücre duvarında (hd) ve hücre zar yüzeylerinde altın tanecikleri (○). N, nükleus (Lowicryl kesit, bar: 0,5 μ m).



Şekil 3.17: *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli **LPA** lektin uygulaması ile **mantar** hücresinin (m) hücre duvarı (hd) ve hücre zar yüzeyleri ile **alg** hücresinin (a) elektronca az yoğun sitoplazmik bölgedeki halka yapısının içinde altın tanecikleri (○). v, depo vakuölü (Lowicryl kesit, bar: 0,5 μ m).



Şekil 3.18: *H.tubulosa* liken türünde koloidal altın işaretli **LPA** lektin uygulaması ile **alg** hücresinin elektronca yoğun sitoplazmik bölgesindeki altın taneciği (○). v, depo vakuolü (Lowicryl kesit, bar: 0,5 μ m).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Likenler, fotobiont ve mikobiontun bir araya gelmesiyle şekillenen, morfolojik ve fizyolojik olarak yapısına katılan biontlardan farklı karakter sergileyen simbiyotik birlikteliklerdir (Güner vd., 2004; Maslov and Pavlova, 2005; Duman, 2008).

Tallus formu bakımından likenler iki gruba ayrılır. Alg ve mantarın tallus yapısında, belli bir tabakalaşma göstermediği homomerik tallus, alg ve mantarın belli bir tabakalaşma gösterdiği heteromerik tip tallusdur (Güner ve ark., 2004; Yavuz, 2004; Büdel and Scheidegger, 2008; Barbosa et al., 2009). Parmeliacea familyasının tallus yapısı heteromerik tip tallusdur (Büdel and Scheidegger, 2008; Barbosa et al., 2009). Bu çalışmada kullanılan Parmeliacea üyesi iki türün de (*Hypogymnia tubulosa* ve *Hypogymnia physodes*) heteromerik tallus yapısında olduğu histolojik kesitlerle açıkça belirlenmiştir. Ancak tallus yapısını oluşturan tabakaların kalınlıkları ve özellikle korteks tabakasındaki mantar hücrelerinin dağılımları iki tür arasında farklı bulunmuştur. *H. tubulosa*'da gevşek yapılı bu tabaka, *H. physodes*'da daha kompakt yapıdadır. Daha çok *H. tubulosa*'nın korteks mantar hücreleri ile mantar-alg hücreleri arasında ışık mikroskobu ile ayırt ettiğimiz hücreler arası tutunmalar, farklı liken türlerinde de elektron mikroskobu ile belirlenmiştir (Honegger, 1984; 1986; Molina and Vicente, 1996).

Sialik asit, (Sia) ler N- ve O- bağlı glikoproteinlerin karbohidrat zincirlerinin ve lipide bağlı glikokonjugatların genelde en uç kısmında bulunan, çeşitlilik gösteren dokuz karbonlu (9C) modifiye şekerlerdir. Sialik asite özgün yapısını 5. pozisyonundaki amino grubu ve 1. pozisyonundaki karboksil grubudur bu da negatif yüke sahip olmasını sağlar. Biyolojik olarak önemli olan monosakkaritler glikoprotein, glikolipit ve glikosilfosfatidilinositol membran çapa glikanlarda ve oligosakkaritlerin, homo ve hetero polisakkaritlerde bulunabilirler. Oligosakkarit zincirlerinin yapısı ve negatif yükleri nedeniyle hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkilerinde önemli rol oynarlar (Kelm and Schauer, 1997). Sialik asitler hücre-hücre ve hücre-hücreler arası saha ilişkilerinde sinyal iletimi, tanıma, tutunma gibi çok sayıda

olayda görev alır. Virüs, bakteri ve protozoa enfeksiyonunda, pozitif yüklü iyonların taşınmasında, (Reuter et al., 1988; Kelm and Schauer, 1997; Tanner, 2005) ve moleküler tanıma ile tanımayı maskeleyen olaylarında iş görürler (Traving and Schauer, 1998). Tanıma ve tutunmadaki rolleri nedeniyle likenlerin yapısında da mantar-mantar ve mantar-alg tutunmalarında iş görebileceği düşünülerek, bu tez çalışması planlanmıştır.

Sia'lar virüslerden insanlara kadar geniş yelpazedeki canlı gruplarında bulunurlar. Virüs ve bakterilerde, pek çok omurgasız ve omurgalı hayvanlarda gösterilmiştir (Corfield and Schauer, 1982; Schauer, 1982; Foster et al., 1992; Varki, 1992; Traving and Schauer, 1998; Brooks et al., 2002; Kamerling and Gerwig, 2006; Schauer, 2009; Deveci vd., 2010). Omurgasızlardan böceklerde ise uzun yıllar bulunmadığı bildirilmiş ancak hala tartışmalı olmakla birlikte, 1992 ve sonrasında *Drosopila* embriyolarında (Roth et al., 1992), *Galleria mellonella*'nın pek çok dokusunda (Karaçalı et al., 1995a; 1997; 1999; 2010; Deveci, 1997; Yıkılmaz, 2007), *Locusta migratoria*'nın farklı dokularında (Karaçalı et al., 1995b;), *Philaenus spumarius*'un Malpighi tüplerinde (Malykh et al., 1999) *Dociostaurus maroccanus*'da (Karaçalı et al., 2003); *Bombyx mori* hemopoetik organında (İzzetoğlu, 2006) farklı yöntemlerle belirlenmiştir.

Bitkilerde Sia varlığına yönelik sınırlı sayıdaki çalışmalar farklı teknikler kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmalara göre, çeşitli bitki ve bitki kültür hücrelerinde farklı oranlarda Neu5Ac belirlenmesine karşın, sonuçlar araştırmacılar tarafından farklı şekillerde yorumlanmaktadır. Araştırmacıların bazıları, bitkilerde sialik asit varlığını ifade ederken (Shah et al., 2003; Soya vd., 2009), bazıları materyallerinde iz miktarda buldukları Neu5Ac'nin ekzojen kaynaklı olabileceğini düşünmektedirler (Zeley et al., 2006).

Mantarlarda Sia varlığına yönelik çalışmalarda; mantar ve maya formlarında belirlenen Sia'ların; konakçı hücrelere tutunmada, hücre-hücre etkileşiminde önemli rol aldığı düşünülmüştür. Alviano ve arkadaşları 1982 yılında, dimorfik *Sporothrix schenckii*'nin hücrelerinde Sia varlığını ispatlamıştır (Benhamou and Ouellette, 1986). Fitopatogenik bir fungus olan *Ascocalix abietina*'nın hücre yüzey bileşiminde bol miktarda Sia bulunmuştur.

Pneumocystis carini kist duvarı şeker bileşiminin analizi sonucunda FITC işaretli LFA uygulaması sonucunda yapısında eser miktarda Sia içerdiği gösterilmiştir (Benhamou and Ouellette, 1987). *Cryptococcus neoformans* türünde HPTLC, FITC işaretli lektinlerle Neu5Ac ile 9-O asetilli türevinin (Neu5,9Ac₂) *C.neoformans*'ın maya formunda belirlenmiştir (Rodrigues et al., 1997). İnsana patojen olan *P.brasiliensis*'in hif ve maya formlarının hücre yüzeylerindeki Sia'ları belirlemeye yönelik kimyasal ve spektroskopik yöntemlerle Sia'nın sadece Neu5Ac tipi belirlenmiştir (Alviano et al., 1999). *Candida albicans*'da da çeşitli yöntemlerin kullanımıyla Sia belirlenmiştir (Regina et al., 2000). *C.neoformans*, *S.cerevisia*, *C.albicans* maya kültürlerinde uygulanan topo-optik reaksiyonlarla Sia ve 9-O asetilli Sia varlığı belirlenmiştir. Terminal Sia ve 9-O asetilli formu mantar hücre duvarında ve oldukça yüksek özgünlükte düzenlenmiş halde bulunur. Çalışılan çeşitli maya türlerinin hücre duvarında ve kapsülünde de Sia'ların oldukça yüksek çeşitlilikte bulunduğu belirlenmiştir (Gähns et al., 2009).

Likenlerde Sia belirlemeye yönelik bir çalışmanın saptanamamasına karşın, çeşitli liken polisakkaritlerinin analizi amacıyla yapılan çalışmalarda Sia bulunmadığı yönünde ifadeler mevcuttur. *X.ectaneoides*'den elde edilen protein ekstraktının GNA (*Galanthus nivalis*; terminalMan), SNA (*Sambucus nigra*; α -NeuNAc(2-6)gal/galNAc), MAA (*Maackia amurensis*; α (2-3)-bağlı sialic acid), PNA (*Arachis hypogaea*; β -D-GalNAc), DSA (*Datura stramonium* (D-GlcNAc)₂) ve Con A (*Canavalia ensiformis*; α -D-Man, α -D-Glc) lektinlerle muamelesi sonucunda herhangi bir sinyalin belirlenemediği bildirilmiştir (Scherrer et al., 2000). 2002 yıllarına kadar yapılmış liken polisakkaritlerini belirlemeye yönelik çalışmalarda kromatografik yöntemlerin kullanılmadığı ve bu çalışmalardaki polisakkaritlerin yeteri kadar saf ve homojen olmadığı da (Paulsen et al., 2002) iddia edilmektedir. *Dictyonema.glabratum*'dan elde edilen lektin, jel filtrasyon kromatografi, SDS-PAGE ve ESI-MS teknikleri kullanılarak belirlenmiştir (Elifio et al., 2000). Total karbohidrat içeriğinin %2 olarak belirlenmesi asit hidrolizi sırasında bir kısmının parçalandığını göstermiştir. Hidrolizatların monosakkarit bileşiminin belirlenmesi için yüksek performans iyon değişim kromatografi kullanılmış, yüksek seviyede galaktoz, ksiloz, glukoz, mannoz ve glukozamin bileşenleri belirlenmiştir. Ancak, Sia

belirlenememiştir. Genel olarak liken şekillendiren mantarlar ve diğer makroskopik mantarlarda glikoproteinlerin glikozilasyon modelleri hakkında bilinenler çok azdır (Elifio et al., 2000).

Sia tiplerinin analizi için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bunlar, gaz likit kromatografisinin elektron kütle spektroskopisi ile birlikte kullanılması ve floresanla işaretlenmiş sialik asitlerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinin (HPLC) Elektro Sprey İyonizasyon-Kütle Spektroskopisi ile birlikte kullanılmasıdır (Kamerling and Gerwig, 2006). Bu çalışmada analitik yöntem olarak CapLC-ESI-MS/MS kullanılmıştır ve alıkonma zamanı ile parçalanma ürünlerinin standart Neu5Ac ve Neu5Gc ile karşılaştırılması sonucu çalışılan her iki türde de sadece Neu5Ac belirlenmiştir. *H.tubulosa*'da daha yüksek oranda Sia hesaplanmıştır.

Lektinler, Sia'ların yerlerinin ve bağ tiplerinin araştırılması için özellikle mikroskopik uygulamalarda uzun süredir kullanılmaktadır. Lektinler, şekerleri ve şekerlerin glikozidik bağ tiplerini seçici olarak tanıyıp bağlanırlar. Bu özelliklerinden yararlanarak, şekerlerin glikokonjugatlardaki oligosakkarit dizisinde bulunuşu ve hatta alttaki şekere hangi bağla bağlandığı belirlenebilmektedir (Deveci vd., 2010; Karaçalı vd., 2010). Bu çalışmada da tüm Sia tiplerini belirleyebilen LFA ve LPA lektinler ile Sia'nın alttaki şekere $\alpha 2,3$ bağıyla bağlanmasını tanıyan MAA ve Sia'nın alttaki şekere $\alpha 2,6$ bağıyla bağlanmasını tanıyan SNA lektinleri tercih edilmiştir. Işık mikroskobu düzeyinde HRP işaretli lektinlerle reaksiyonların özellikle korteks mantar hücrelerinin dış yüzeyinde, ekstraselüler matrikste olduğu görülmüştür. Hücreler arası bağlantıların, tutunmaların gerçekleşmesinde iş gören ekstraselüler matriks yapısında çeşitli şekerlerin bol miktarda olduğu bilinmektedir. Sia'ların da bu bölgelerde bulunması hücrelerin birbirini tanıyıp tutunmasında diğer şekerlerle birlikte rol oynadığını göstermektedir.

Şekerlerin hücre yüzeyindeki rollerinin uzun zamandır bilinmesine karşın, **hücre içi rolleri** hakkında bilinenler fazla değildir. Genel olarak nukleus ve sitoplazmadaki glikokonjugatların moleküller arası ilişkilerde (Kelly ve Hart, 1989) ve kromatin paketlenmesinde (Bao ve Souza, 1992), nukleusta kopya

çıkışının düzenlenmesinde (Wells et al., 2001) rol oynadıkları bildirilmektedir. Nukleolusta lektin benzeri proteinlerin öncü ribozomlarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Bourgeois et al., 1987). Nukleolus organize eden glikoproteinlerin belirlenmesine de başlanmıştır (Tsai ve McKay, 2002).

Hücre içi Sia'ların rolleri de yeni belirlenmeye başlamıştır. Sitoplazmada Sia varlığıyla ilgili ilk bildirimlerden biri nukleus kılıfının dış zarında olmuştur (Bosmann, 1973). Daha sonra nukleus por kompleks proteini (Emig et al., 1995) ve nukleolusta (Vannier-Santos et al., 1991) Sia varlığı belirlenmiştir. Fare spermatogonia ve primer spermatositlerin hücre yüzeyinde ve sitoplazmalarında, spermatitlerin akrozom ve olgunlaşma fazlarında ve spermilerin akrozom, post akrozom ve kuyruk kısmında görülür (Burkett et al., 1987). *Pleurodeles waltl*'in primordial germ hücrelerinin, primer spermatogonyumların ve spermatositlerin sitoplazmasında bulunur (Sáez ve ark., 2000). *Bombyx mori*'nin larval testislerinde kılıf hücreleri ile germ hücrelerinin sitosolünde, nukleus kılıfında, kromatinde, nukleolusunda (Deveci ve ark., 2004) ve sinaptonemal kompleks yapısında (Deveci ve Karaçalı, 2006) belirlenmiştir. Bu çalışmada da Sia'lar hem mantar hem de alg hücrelerinin sitoplazma ve nukleuslarında gösterilmiş, özellikle nukleuslarda oldukça bol bulunduğu altın işaretli lektinlerle transmisyon elektron mikroskopunda tartışmasız belirlenmiştir. Hücre yüzeylerinde çeşitli tanıma olaylarında rol oynayan Sia'ların sitoplazma ve nukleusta da benzer şekilde moleküller arası tanıma ve maskeleme ilişkilerinin düzenlenmesinde rol oynaması mümkündür.

Sonuç olarak; bu çalışma, analitik ve mikroskopik yöntemlerle liken yapısında Sialik asit bulunduğunun (Neu5Ac) gösterildiği, ayrıca bağ tiplerinin de belirlendiği ilk çalışma olması bakımından önemlidir. Sialik asitlerin en iyi bilinen görevleri hücreler arası tanıma ve tutunma veya tanımayı engellemedir. Sialik asitlerin likenlerde de benzer görevleri gerçekleştirmesi mümkündür. İleriki çalışmalarda farklı liken türlerinde de Sialik asitlerin ve tiplerinin araştırılmasının yanı sıra likenlerdeki işlevlerine ilişkin araştırmalar da gerçekleştirilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alviano, C.S., Travassos, L.R. and Schauer, R.,** 1999, Sialic acids in fungi: A minireview, *Glycoconjugate Journal* 16, 545-554.
- Alviano, C.S., Pereria M.E.A., Souza, W., Oda, L.M. and Travassos, L.R.,** 1982, Sialic acids are surface components of *Sporothrix schenckii* yeast forms, *FEMS Microbiol Lett* 15, 223-227.
- Ateş, A. ve Özgür, Y.,** 2002, Ulex europaeus lektinin kan grubu bağlama özgülüğü. S.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi. 20, 83-89 s.
- Bao, S.N., Souza, W.,**1992, Lectin Binding Sites on Head Structures of the Spermatid and Spermatozoon of the Mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae), *Histochemistry*, 98, 365-71.
- Barbosa, S.B., Machado, S.R., and Marcelli, M.P.,** 2009, Thallus structure and isidium development in two Parmeliaceae species (lichenized Ascomycota). *Micron* 40, 536-542.
- Benhamou, N. and Ouellette, G.B.,** 1986, Ultrastructural localization of glycoconjugates in the fungus *Ascocalyx abietina*, the scleroderris canker agent of conifers, using lectin-gold complexes, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 34 (7): 855-867 p.
- Benhamou, N. and Ouellette, G.B.,** 1987, Ultrastructural characterization of an extracellular fibrillar sheath on cells of *Ascocalyx abietina* the scleroderris canker agent of conifers. *Can J. Bot.* 65,154-67.
- Bhowal, J., Guha, A.K. and Chatterjee, B.P.,** 2005, Purification and molecular characterization of a Sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Carbohydrate Research* 340: 1973-1982 p.
- Bosmann, H.B.,** 1973, Molecules at the External Nuclear Surface. Sialic Acid of Nuclear Membranes and Electrophoretic Mobility of Isolated Nuclei and Nucleoli, *J. Cell Biol.*, 59, 601-14.
- Bourgeois, C.A., Seve, A.P., Monsigny, M., and Hubert, J.,**1987, Detection of Sugar-Binding Sites in the Fibrillar and the Granular Components of the Nucleolus: An Experimental Study in Cultured Mammalian Cells, *Exp. Cell Res.*, 172, 365-76

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brooks, SA., Dwek, M.V. and Schumacher, U.,** 2002, Functional and molecular glycobiology, *BIOS Scientific Publishers*.
- Burkett, B.N., Schulte, B.A., and Spicer, S.S.,** 1987, Histochemical Evaluation of Glycoconjugates in the Male Reproductive Tract with Lectin-Horseradish Peroxidase Conjugates: I. Staining of Principal Cells and Spermatozoa in the Mouse, *Am. J. Anat.*, 178, 11-22.
- Büdel, B. and Scheidegger, C.,**2008, Lichen Biology. Cambridge University Press, New York, 498p.
- Cordeiro, L.M.C., Carbonero, E.R., Sassaki, G.L., Reis, R.A., Wörgötter, E.S., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M.,** 2005, A fungus-type β -galaktofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*, *FEMS Microbiology Letters* 244, 193-198 p.
- Corfield, A.P. and Schauer, R.,** 1982, Occurrence of sialic acids, *Sialic Acids*, 5-55.
- D'Amico, P. and Jacobs, J.R.,** 1995, Lectin Histochemistry of the *Drosophila* Embryo., *Tissue & Cell*, 27:23-30.
- Deveci, R. ve Karaçalı, S.,** 2006, Hücre içi şekerlerin lektinle belirlenmesi., TÜBİTAK Projesi TBAG-HD/51 (105T263), 24 s.
- Deveci, R.,** 1997, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'nın gelişen testislerinde testis duvarı, foliküller, kan-germ hücre bariyerlerinin ince yapısı ve glikokonjugatların histokimyasal, sitokimyasal, biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri*, Doktora Tezi.
- Deveci, R., Balcan, E., Keskin, N., Ün, C. ve Karaçalı, S.,** 2010, Embriyoda Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Antimüller Hormonda Sialik asit Değişiklikleri ile Müller Kanalı Apoptozis İlişkisinin Araştırılması, TÜBİTAK Projesi, Proje No: 107T129.
- Deveci, R., Karaçalı, S., Deveci, Ö. ve Yıkılmaz, S.,** 2004, Lektin işaretleme yöntemiyle Sialik asitin elektron mikroskopunda gösterilmesi., Ebiltem Projesi, 2002 BİL 022, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi*.
- Duman, D.C.,** 2008, Likenler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi* 65(1): 43 – 50.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duverger E., Frison N., Roche A.C. and Monsigny M.**, 2003, Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance, *Biochimia* 85, 167-179.
- Elifio, S.L., Iacomini. M. and Gorin, P.A.J.**, 2000, A Lectin from the Lichenized Basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *New Phytol.* 148, 327-334.
- Emig, S., Schmalz, D., Shakibaei, M., and Buchner, K.**, 1995, The Nuclear Pore Complex Protein p62 is one of Several Sialic Acid-Containing Proteins of the Nuclear Envelope, *J. Biol. Chem.*, 270, 13787-93
- Foster, J.D., Getchell, M.L. and Getchell, T.V.**, 1992, Ultrastructural localization of sialylated glycoconjugates in cells of the Salamander Olfactory mucosa using lectin cytochemistry., *Cell Tissue res.*, 267(1): 113-124.
- Fukuda, M. and Hindsgaul, O.**, 1994, Molecular Glycobiology., *Oxford: IRL. Pres*, 261 p.
- Gabius, H.J. and Gabius, S.**, 1993, Lectins and Glycobiology, Springer-Verlag, Tokyo, 521pp.
- Gähns, W., Tigyi, Z., Emődy, L. and Makovitzky, J.**, 2009, Polarization optical analysis of the surface structures of various fungi. *Acta histochemica* 111, 308-315 p.
- Grube, M. and Blaha, J.**, 2005, Halotolerance and lichen symbioses, *Bacteria and Eukarya*, 471-488 p.
- Grube, M. and Hawksworth, D.L.**, 2007, Trouble with lichen: The re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruit body types in the molecular era. *Mycological research* III 1116-1132.
- Gupta, V.K., Darokar, M.P., Shanker, K., Negi, A.S., Srivastava, Gupta, M.M. and Khanuja, S.P.S.**, 2007, Rapid and sensitive HPLC method for the determination of polyphenols in various lichen species of Himalayan origin, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30:97-111.
- Güner, H., Aysel, V. ve Sukatar, A.**, 2004, Tohumusuz Bitkiler Sistematigi II.Cilt *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*. 348s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Haltiwanger, RS. and Lowe, JB.,** 2004, Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem.* 73: 491-537. Review.
- Hill, D.J.,** 2009, Asymmetric co-evolution in the lichen symbiosis caused by a limited capacity for adaptation in the photobiont. *Bot.Rev.* 75: 326-338.
- Honegger, R.,** 1998, The lichen symbiosis- What is so spectacular about it? *Lichenologist* 30 (3):193 – 212.
- Honegger R.,** 1984, Cytological aspects of the mycobiont-photobiont relationship in lichens. *Lichenologist* 16 (2): 111-127
- Honegger , R.,** 1986,Ultrastructural studies in lichens II. Mycobiont and photobiont cell wall surface layers and adhering crystalline lichen products in four Parmeliaceae. *New Phytologist* 103: 797-808
- İzzetoğlu, S.,** 2006, Bombyx mori'nin yeni hemapoietik organında Neu5Ac(α 2,3)Gal β 1,4GlcNAc, Neu5Ac(α 2,6)Gal/GalNAc, Gal β 1,3GalNAc ve GalNAc Şekerlerin altın işaretli lektinlerle belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi*, 97s.
- Kabaoğlu, A.,** 2007, Türkiye’de bulunan Hypogymnia (Nyl.) Nyl. türlerinde rDNA ITS bölgesi dizi analizi ile çeşitliliğin tanımlanması. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 72s.
- Kamerling, J.P. and Gerwig, G.J.,** 2006, Structural analysis of naturally occurring Sialic acids, *Methods in Molecular Biology*, vol. 347: Glycobiology Protocols, ed: Brockhausen I., Humana Pres Inc., Totowa, NJ, 71 p.
- Karaçalı S., Kırmızıgül, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü B.,** 1997, Presence of sialic acid in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Tissue and Cell*, 29:315-321.
- Karaçalı, S.,** 2003, Glikobiyoloji; Güncel Moleküler Biyoloji. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27, 489- 495.
- Karaçalı, S., Deveci R., Pehlivan, S., ve Özcan, A.,** 1999, Doku kültürü koşullarında hemositlerin protorasik bezleri tanınmasının kontrolü, Ege Üniversitesi Araştırma Fonu Proje Raporu, Proje No:98 BİL 019.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karaçalı, S., Deveci, Ö., Deveci, R., Onat, T. and Gürcü, B.,** 1995a, Spectrophotometrical determination of sialic acid in several tissues of isolated and crowded *Locusta migratoria* (Orthoptera). *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 58: 47-57.
- Karaçalı, S., Deveci, R.,** 2001, Protorasik bezlerdeki hemosit reseptörünün belirlenmesi, (Tübitak Projesi, No: TBAG-AY/214), Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi.
- Karaçalı, S., Deveci, R., Deveci, Ö., Onat, T. and Gürcü, B.,** 1995b, Spectrophotometrical determination of sialic acid in the tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 58: 59-67.
- Karaçalı, S., Deveci, R., İzzetoğlu, S., Yıkılmaz, S., Şahar, U., Deveci, Ö; Tarhan, L., and Ayar Kayalı, H.,**2010, Doğal genç –yaşlı ve deneysel olarak yaşlandırılmış-gençleştirilmiş böcek model sistemde hücre ve organizma düzeyinde yaşlanmanın moleküler mekanizması. (DPT Projesi, No:06-DPT-03)
- Karamanoğlu, K.,** 1971, Türkiye'nin önemli liken türleri. *Ankara Ecz. Fak. Mec.* 1.53.
- Karnovsky, M.J.,** 1965, A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolatyi for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27, 137A-138A
- Kelly, W.G., and Hart, G.W.,**1989, Glycosylation of Chromosomal Proteins: Localization of O-Linked N-Acetylglucosamine in *Drosophila* Chromatin, *Cell*, 57, 243-51
- Kelm, S. and Schauer, R.,** 1997, Sialic Acids in Molecular and Cellular Interactions. *Int. Rev. Cytol.*, 175: 137-240.
- Komath, S.S., Kavitha, M. and Swamy, M.J.,** 2006, Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org Biomol Chem.*, 4: 973-88.
- König, J. and Peveling, E.,** 1984, Cells walls of the phycobionts Trebouxia and Pseudotrebouxia: Constituents and their localization. *Lichenologist* 16(2): 129-144.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maccioni, H.J.F., Giraudo, C.G. and Daniotti, J.L.**, 2002, Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. *Neurochemical Research*, 27, (7/8): 629-636.
- Malykh Y.N., Krisch B., Gerardy-Schann R., Lapina E.B., Shaw L. and Schauer R.**, 1999 The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaneus spumarins*. *Glycoconjugate J.*, 16: 731-739.
- Maslov, A.I. and Pavlova, A.**, 2005, Simple method for fractionation of *Parmelia sulcata* lichen thalli. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52 (2):271-274p.
- Millonig, G.**, 1961, Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation. *J. Appl. Physiol.*, 32, 1637.
- Moreira, A., Ainouz, I.L., De Oliveira, J.T. and Cavada, B.S.**, 1991, Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 86: 211-218.
- Molina, M.C., and Vicente, C.**, 1996, Ultrastructural deterioration of *Xanthoria parietina* (L.) Th.Fr phycobiont induced by a *Xanthoria* lectin. *Phyton* (Horn, Austria) 36: 197-208
- Narui, T., Sawada, K., Culberson, C.F., Culberson, W.L. and Shibata, S.**, 1999, Pustulan-type polysaccharides as a constant character of the Umbilicariaceae (Lichenized Ascomycotina). *Bryologist* 102, 80-85
- Olafsdóttir, E.S. and Ingólfssdóttir, K.**, 2001, Polysaccharides from lichens: Structural characteristics and biological activity. *Plant Med* 67(3): 199-208.
- Paulsen, B.S., Olafsdóttir, E.S. and Ingólfssdóttir, K.**, 2002, Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. *Journal of Chromatography A*, 967, 163-171 p.
- Pereyra, M.T., Prieto, A., Bernabé, M. and Leal, J.A.**, 2003, Studies of new polysaccharides from *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm. *Lichenologist* 35(2): 177-185.
- Rai, A.N. and Bergman, B.**, 2002, Cyanolichens, biology and environment: *Proceedings of the Royal Irish Academy*, 102B (1): 19 – 22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reynolds, E.S.**, 1963, The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol. Apr*;17, 208-12.
- Regina, M.A.S, de a Soares, R.M., Alviano, D.S., Angluster, J., Alviano, C.S., Travassos, L.R.**, 2000, Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1474, 262-268
- Reuter G., Kelm S. and Schauer R.** 1988 Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates. *Acta Histochemica, suppl. Band XXXVI*: 51-79.
- Rhodes, J.M., and Milton, J.D.**, 1998, Appendix: Lectin-binding specifications, In: *Lectin Methods and Protocols*, eds: Rhodes J.M and Milton J.D., Humana Press, Totova, New Jersey., 595-597pp.
- Rios, A., Ascaso, C. and Wierzechos, J.**, 1999, Study of lichens with different state of hydration by the combination of low temperature scanning electron and confocal laser scanning microscopies. *Internatl Microbial* 2, 251-257.
- Rodrigues, M.L., Rozental, S., Coceiro, J.N.S.S., Angluster, J., Alviano, C.S. and Travassos, L.R.**, 1997 Identification of N-acetylneuraminic acid and its 9-O-acetylated derivative on the cell surface of *Cryptococcus neoformans*: Influence on fungal phagocytosis. *Infect Immun* 65, 4937-4942.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R. and Gehring, W.J.**, 1992, Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science*. May 1; 256(5057), 673-5
- Sáez, F.J., Madrid, J.F., Aparicio, R., Alonso, E., and Hernández, F.**, 2000, Glycan Residues of N- and O-Linked Oligosaccharides in the Premeiotic Spermatogenic Cells of the Urodela Amphibian *Pleurodeles waltl* Characterized by Means of Lectin Histochemistry, *Tissue Cell*, 32, 302-11
- Sanders W.B.**, 2001, Lichens: The interface between mycology and plant morphology. *BioScience* 51(12):1025-1035.
- Sanders W.B.**, 2002, In situ development of the foliicolous lichen phyllophiale (Tricthothelliaceae) from propagule germination to propagule production. *American Journal of Botany* 89 (11): 1741-1746.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schauer, R.**, 1982, Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40, 131-234.
- Schauer, R.**, 1985, Sialic Acids and Their Role as Biological Masks., *Trends Biochem Sci.*, 10, 357-60
- Schauer, R.**, 2001, The Occurrence and Significance of Sialic Acids in Insects, *Trends Glycoscience Glycotechnology*, 13, 507-517.
- Schauer, R.**, 2004, Victor Ginsburg's Influence on my Research of the Role of the Sialic Acids in Biological Recognition., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426, 132-141
- Schauer, R.**, 2009, Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 19,507-514.
- Schauer, R., Shucula, A.K., Schröder, C., and Muller, E.**, 1984, The Anti Recognition Function of Sialic Acids: Studies With Erythrocytes and Macrophages., *Pure Appl. Chem.*, 56, 907-921.
- Scherrer, S., De Vires, O.M.H., Dudler, R., Wessels, J.G.H., and Honegger, R.**, 2000, Interfacial self-assembly of fungal hydrophobins of the lichen-forming Ascomycetes *Xanthoria parietina* and *X. ectaneoides*. *Fungal Genetics and Biology* 30, 81-93.
- Seymour, F.A., Crittenden, P.D. and Dyer, P.S.**, 2005 Sex in the extremis: lichen-forming fungi. *Mycologist*, 19, 51-58 p.
- Seyrek, K. ve Bildik, A.**, 2001, Lektinler. *YYÜ. Vet. Fak. Derg* (1-2): 96-100 s.
- Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R. and Joshi, L.**, 2003, Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells. *Nature Biotechnology*, 21, 1470-71.
- Slifkini, M. and Doyle, R.J.**, 1990, Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 197-218 p .
- Souza, E.T., Filho, F.C.S., Souza, W.D., Alviano, C.S., Angluster, J., and Travassos, L.R.**, 1986, Identification of sialic acids on the cell surface of hyphae and conidia of the human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 24, 145-153

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Soya, S., İzzetoğlu, S., Deveci, R., ve Karaçalı, S.,** 2009, Bitkilerde sialik asitlerin belirlenmesi. 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi/ Trabzon. Poster sunum.
- Taatjes, DJ. and Roth, J.,** 1990, Selective loss of sialic acid from rat small intestinal epithelial cells during postnatal development: demonstration with lectin-gold techniques. *Eur. J. Cell Biol.* Dec; 53 (2): 255-66.
- Tanner, M.E.,** 2005, The enzymes of Sialic acid biosynthesis. *Bioorganic Chemistry* 33: 216-228.
- Taylor, M.E. and Drickamer, K.,** 2003, Introduction to Glycobiology. *Oxford University Pres.* 207 page.
- Traving, C. and Schauer, R.,** 1998, Structure, function and metabolism of Sialic Acids. *CMLS. Cell. Mol. Life Sci*, 54: 1330-1349.
- Tsai, R.Y., and McKay, R.D., A,** 2002, Nucleolar Mechanism Controlling Cell Proliferation in Stem Cells and Cancer Cells, *Genes Dev.*, 16, 2991-3003
- Tsuboi, S. and Fukuda, M.,** 2001, Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays.*, 23(1): 46-53.
- Tübitak,** Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı, <http://biow.tubitak.gov.tr/present/> (Erişim tarihi: 31 Aralık 2010)
- Vannier-SANTOS, M.A., Saraiva, E.M., and de Souza, W.,**1991, Nuclear and Cytoplasmic Lectin Binding Sites in Promastigotes of *Leishmania*, *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 793-800
- Varki, A.,** 1992, Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2 (1): 25-40.
- Varki. A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. and Marth, J.,** 1999, Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Pres.*, 653 page.
- Vijayan M., Chandra N.,** 1999, Lectins, *Curr Opin Struct Biol.*, 9: 707-14.
- Wells, L., Vosseller, K., Hart, G.W.,**2001, Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc, *Science*, 291, 2376-8

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yavuz, M.**, 2004, Pamukkale yöresi likenleri üzerinde taksonomik ve ekolojik bir çalışma. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek lisans tezi, 128s.
- Yavuz, O. ve Aksoy, A.**, 2006, Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi.*, 20(3): 259-269.
- Yavuz, Ö.**, 2001, Glikoproteinler ve biyomedikal önemi. *T. Klin. Tıp Bilimleri* 21, 517-522.
- Yıkılmaz, M.S.**, 2007, *Galleria mellonella* (Lepidoptera)'da bileşik göz ommatidyumlarında ince yapının, hücre farklılaşmasının ve sialik asitlerin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, 96s.
- Yin, Y.Q., De Grot, P.W.L., De Koster, C.G. and Klis, M.K.**, 2007, Mass spektrometry-based proteomics of fungal wall glycoproteins. *Trends in Microbiology*,
- Zeleny, R., Kolarich, D., Strasser, R. and Altmann, F.**, 2006, Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. *Planta* 224: 222-227.

ÖZGEÇMİŞ

Didem Erkan, 1983 yılında Eskişehir’de doğmuştur. İlk, orta ve lise eğitimini Eskişehir’de tamamlamıştır. 2001 yılında Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Bölümü’nü kazanmış ve 2003 yılında buradan mezun olmuştur. Aynı yıl Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başlamış ve 2007 yılında buradan mezun olmuştur. 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümün’de yüksek lisans eğitime başlamıştır.