



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Camponotus floridanus*'ta BMP SİNYALİZASYONU ve ZORUNLU
ENDOSİMBİYONT VARLIĞINDA DEĞİŞİMİ**

Nihan Sultan MİLAT

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ

II. DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ab. Matteen RAFIQI

Ağustos, 2022

İSTANBUL

Bu alışma, 3.08.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Cenk K1ğ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2021-37348 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 120C157 numaralı TÜBİTAK 2247-A projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans dönemimden bu yana yaptığımız çalışmalarda ve yeni attığım her akademik adımda desteğini hep hissettiğim, bana güvenini görebildiğim, rahatlıkla ulaşıp iletişim kurabildiğim, bu süreci kolaylaştıran sevgili danışman hocam Murat PEKMEZ'e,

Yeni başladığım bir alanda bana örnek bir danışman olan, öğrencilerine olan ilgisi ve iletişiminden ötürü rahatlıkla çalışmalarımı yürütebildiğim, her zaman saygısını, ilgisini ve desteğini hissettiğim bir diğer sevgili danışmanım Ab. Matteen RAFIQI'ye

Bu süreçte desteğini her zaman gördüğüm canım ailem, canım dostlarım ve çok sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

En baştan en sona yanımda olan ve bana iyi hissettiren sevgili RAFIQI Lab. Ve Proteomik Lab. ailelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2022

Nihan Sultan MİLAT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xvi
ÖZET	xviii
SUMMARY	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. FLORİDA MARANGOZ KARINCA: <i>Camponotus floridanus</i>	4
2.1.1. <i>C. floridanus</i> 'un Embriyonik Gelişimi.....	6
2.1.2. <i>C. floridanus</i> 'un Bakterial Endosimbiontu: <i>Blochmannia floridanus</i>	10
2.1.3. <i>C. floridanus</i> Embriyonik Gelişiminin <i>Blochmannia</i> Varlığında Radikal Değişimi.....	11
2.2. <i>D. melanogaster</i> 'in DV PATTERN OLUŞUMUNDA GEN DÜZENLEYİCİ AĞLARI.....	14
2.2.1. Dorsal, Nükleer Konsantrasyon Gradyanı Oluşturur	16
2.2.2. Dorsal, Blastoderm Embriyosundaki Genleri Etkinleştirir	19
2.3. BMP SİNYALİZASYONU	20
2.3.1. <i>D. melanogaster</i> 'de BMP Sinyal Yolağının Temel Bileşenleri	22
2.3.1.1. BMP Ligandları	22
2.3.1.2. BMP Reseptörleri ve Ligand-Reseptör Etkileşimleri	24
2.3.1.3. Hücre Dışı Modulatorler	26
2.3.2. Böceklerde DV Modelleme İçin İkinci Bir Sinyal Yolu	28
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. KARINCALARIN YETİŞTİRİLMESİ	31
3.1.1. <i>C. floridanus</i> Kraliçe İzolasyonu.....	32
3.2. RNA İZOLASYONU VE CDNA SENTEZİ.....	32
3.2.1. RNA İzolasyonu	32
3.2.2. cDNA Sentezi	33

3.3 MOLEKÜLER KLONLAMA	34
3.3.1. BMP sinyal yoluna ait gen dizilerin elde edilmesi ve primerlerin tasarlanması	34
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	38
3.3.3. Restriksiyon Enzim Kesimi Temelli Klonlama.....	39
3.3.4. TOPO Klonlama	42
3.3.5. Koloni PZR.....	44
3.3.6. Plazmit İzolasyonu	45
3.3.7. Plazmitlerin Doğrulanması	45
3.4. <i>İn situ</i> HİBRİDİZASYON (ISH).....	46
3.4.1. Embriyo fiksasyonu.....	46
3.4.2. RNA Problarının Sentezi	47
3.4.3. RNA Problarının Saflaştırılması.....	48
3.4.4. Prob Hibridizasyonu	49
3.5. RNA INTERFERANS (RNAİ).....	51
3.5.1. dsRNA sentezi	51
3.5.2. dsRNA'ların saflaştırılması.....	52
3.5.3. dsRNA'nın yumurtalara mikroyenjeksiyonu	53
3.6. SPEKTROFOTOMETRİK VE ELEKTROFORETİK ANALİZ	54
3.7. MİKROSKOPİ	55
3.7.1. Yüksek İşlem Hacimli Cytation 5 ile Eş Zamanlı Görüntüleme	55
3.7.2. Diferansiyel Girişim Kontrast (DIC) Mikroskopisi	55
3.7.3 Konfokal Mikroskopi	56
4. BULGULAR.....	57
4.1. <i>C.floridanus</i> 'ta EMBRİYONİK GELİŞİMİNİN EŞ ZAMANLI GÖRÜNTÜLENMESİ	57
4.1.1. Nükleer Bölünmeler (Aşamalar 1-4)	57
4.1.2. Blastoderm Oluşumu	57
4.1.3. Gastrulasyon	58
4.1.4. Germbandın Uzaması ve Segmentasyonu	58
4.1.5. Dorsal Kapanma ve Baş Oluşumu.....	59
4.2. <i>C. floridanus</i> 'ta BMP SİNYAL GENLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ	62
4.2.1. <i>C.floridanus</i> BMP Ligandlarının Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi	62
4.2.2. <i>C.floridanus</i> 'un BMP Metalloproteazının Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi	63

4.2.3. <i>C.floridanus</i> BMP Antagonistlerinin Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi	64
4.2.4. <i>C. floridanus</i> 'un BMP Reseptörlerinin Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi.....	66
4.3. <i>C. floridanus</i> 'un BMP GENLERİNİN KLONLANMASI	67
4.4. <i>İn situ</i> HİBRİDİZASYON İÇİN PROB SENTEZİ	71
4.5. RNA İNTERFERANS İÇİN DSRNA SENTEZİ	72
4.6. EKTRAEMBRYONİK AMNİYON OLUŞUMU	73
4.7. EMBRİYODA BMP SİNYALİZASYON BİLEŞENLERİNİN GEN EKSPRESYON PATERNLERİ.....	73
4.7.1. <i>C. floridanus</i> BMP ligandları: <i>dpp</i> ve <i>gbb</i> genlerinin ekspresyonları.....	75
4.7.2. <i>C. floridanus</i> BMP metalloproteazı: <i>tld</i> genin ekspresyonu	76
4.7.3. <i>C. floridanus</i> BMP antagonistleri: <i>tsg</i> ve <i>sog</i> genlerinin ekspresyonları	77
4.7.4. <i>C. floridanus</i> BMP reseptörleri: <i>tkv</i> ve <i>punt</i> genlerinin ekspresyonları	77
4.8. <i>C. floridanus</i> 'ta BMP SİNYALİZASYONUNUN İŞLEVİ	88
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	92
KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEÇMİŞ	109

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Böcek filogenisinin genel gösterimi. Filogenetik ağaç, filum Arthropoda, subfilum Hexapoda ve büyük böcek takımlarını temsil eder. Takımlar ilgili dalların üstüne veya altına yazılmıştır. Cinsler italik yazı tipiyle yazılmış ve sarı renkle vurgulanan türler daha sonra metin içerisinde tartışılacaktır. 4
- Şekil 2.2:** Endosimbiontlar bir karınca ailesi içinde üç kabile ile sınırlıdır. a) Karınca alt ailelerinin filogenetik ağacı, göreceli bollukları (uç noktaların kalınlığı) ve yaklaşık olarak kökenlendikleri zamanlar (mor çubuklar) gösterilir. b) Formicinae alt familyasının 7 kabilesindeki farklı türler (yeşil gölgeleme), endosimbiontları içeren üç kabileyi vurgulayarak gösterilmiştir. Ölçek altta gösterilmiştir [19, 42]. 5
- Şekil 2.3:** *C. floridanus* embriyonik gelişim aşamalarının geniş alan epiflorasan görüntüleri. Nükleer DAPI ile boyanmış *C. floridanus* embriyoları: (a) aşama 1 (st 1), anteriordaki zigotik nükleuslar (beyaz ok ucu) ve posteriordaki bakteriler (magenta ok ucu), (b) aşama 2 (st 2) nükleer bölünmeler, (c) aşama 3 (st 3) nükleer bölünmeler, çevreye nükleer göç ve kutup hücrelerinin konumu (beyaz ok ucu) (d) aşama 4 (st 4) embriyodaki farklı bölgeler; embriyonik bölge (yeşil ok uçları), ekstraembriyonik bölge (turuncu ok ucu) ve germline kapsülü (mavi ok ucu) (e) aşama 5 (st 5) hücreleşme aşaması, (f) aşama 6 (st 6) blastoderm aşaması, bakteriyositlerin ilk görünümü (magenta ok ucu) (g) germbandın oluşumu (yeşil ok uçları), (h) aşama 8 (st 8), uzayan germband, kapsülün (mavi ok ucu) içindeki germ hattı nükleusları (beyaz ok ucu) (i) aşama 9 (st 9), tamamen uzatılmış germband (yeşil ok ucu), bakteriyositlerin (magenta ok ucu) yumurtanın içine doğru hareketi, germbandın AP eksenini boyunca tek tip görünümü (beyaz noktalı çizgiler) (j) aşama 10 (st 10) germbandın kalınlaşması ve desenlenmesi (beyaz noktalı çizgiler) (k) aşama 11 (st 11) segmentlerin görünümü (beyaz ok uçları), proktodeal invaginasyon (kırmızı ok ucu) ve germband düzleşmesinin başlaması, (l) aşama 12 (st 12) germbandın düzleştirilmesi, gnathal tomurcuklarının ilk görünümü (sarı ok ucu), (m) aşama 13 (st 13) dorsal kapanmanın başlaması, gnathal tomurcuklar (sarı ok uçları) (n) aşama 14 (st 14) baş uzantılarının yeniden düzenlenmesi (sarı ok uçları), (o) aşama 15 (st 15) dorsal kapanmanın tamamlanması, bofa balığı ağzı benzeri gnathal tomurcukların görünümü (sarı ok uçları) (p) aşama 16 (st 16) organogenez, , (q) aşama 17 (st 17), bakterinin yumurta kesesindeki dağılımı (magenta ok uçları) gösterilmiştir. Not; serosa (h-p) panellerindeki embriyolardan uzaklaştırılmıştır. Embriyolar laterale dönüktür, dorsal yukarı ve anterior sol taraftadır. (Embryonic, Larval and Pupal Development in the Carpenter Ant *Camponotus floridanus*'un yayınlanmamış verileridir.) 9
- Şekil 2.4:** *C. floridanus* yumurtalarındaki radikal değişiklikler. (a-f) *Lasius niger* ve *C. floridanus* embriyogenezinin karşılaştırılması: yeni verilen yumurta aşaması (st 1, a,d), hücresel blastoderm (st 6, b,e), segmentasyon (st. 12, c,f). Mavi embriyoyu (emb), ters renklendirme *Blochmannia*'yı (bl), beyaz bakteriyositleri (bc), sarı germ

hattını(gc), kırmızı ekstraembriyonik dokuyu (ee) ve yeşil somatik gonadı (sg) vurgular. Anterior solda, dorsal yukarıdadır [19].....12

Şekil 2.5: *Blochmannia* bakteriyositler ve germline kapsül arasında segrege olur. (a-f), *Blochmannia*: yeni bırakılmış aşama 1 yumurtalarda arka kutupta (a); aşama 8 embriyolarda bakteriyositlerin içinde (b); 17. aşama embriyoların orta bağırsağını kaplayan bakteriyositlerde (c); gelecekteki germline kapsülünün tepesi boyunca germline öncü nükleusları (sarı ok uçları) ile birlikte (d); germline kapsülü içinde (e); ve dikey aktarım için germline kapsülünü çevreleyen küçük bir popülasyon olarak bulunur (f) [19].....13

Şekil 2.6: *Drosophila*'da kompleks gen düzenleyici ağlar. Diyagram, döllenmeden sonra erken embriyoda eksprese edilen 46 gen için düzenleyici girdileri ve çıktıları temsil eder. Aşağıdan yukarıya doğru renk kodlaması, üç ana embriyonik dokuyu şu şekilde temsil eder: mezoderm (alt, mavi), ventral nörojenik ektoderm (orta, sarı) ve dorsal nörojenik ektoderm ve dorsal ektoderm (üst, yeşil). Diyagramın solu oogenez sırasındaki gen ekspresyon kaskadını gösterir. Embriyonik dokuları temsil eden bölgelerdeki açık renkli bölge, sinsityal aşamaları temsil eder. Sağdaki daha koyu bölge, gastrulasyon geçiren hücrel embriyoları temsil eder [93].....16

Şekil 2.7: *Drosophila*'da DV polaritenin oluşturulması. (a) Oositin nükleusu, embriyonun dorsal tarafına dönüşecek alana gider. Oositin *gurken* genleri, oosit nükleusu ile hücre zarı arasında lokalize olan mRNA'yı sentezler ve burada Gurken proteinine çevrilir. Gurken sinyali, folikül hücreleri tarafından üretilen Torpedo reseptör proteini tarafından alınır. Sinyalin kısa yayılabilirliği göz önüne alındığında, yalnızca oosit nükleusuna en yakın folikül hücreleri (yani dorsal folikül hücreleri) Gurken sinyalini alır, bu da folikül hücrelerinin karakteristik bir dorsal folikül morfolojisi almasına neden olur ve Pipe proteininin sentezini engeller. Bu nedenle, Pipe proteini sadece ventral folikül hücreleri tarafından yapılır. (b) Ventral bölge, gelişimin biraz daha sonraki bir aşamasında. Vitellin zarfın ventral bölgesindeki sülfatlanmış proteinler Gastrulation- defective (GD)'i alır, bu da diğer proteinlerle kompleks oluşturarak, bölünmüş Spätzle proteininin Toll reseptörüne bağlanmasıyla sonuçlanan bir kaskadı başlatır. Ortaya çıkan kaskad, hücreyi ventralize eder. Şekil üzerindeki numaralandırmalar metinde detaylı bir şekilde verilmiştir [99].....18

Şekil 2.8: *Drosophila*'da DV kader haritası ve DV eksenin oluşumundaki genlerin ekspresyon alanları. (a) Farklı nükleer Dorsal konsantrasyonları, farklı gen kümelerini harekete geçirir ve nihayetinde DV kaderlerini tanımlar. (b) Blastoderm embriyosunun tanımlanmış bölgelerinde eksprese edilen genler. Blastoderm embriyosunun kesiti gösterilmektedir. Renkler farklı DV alanlarını temsil etmektedir. *dpp*: decapentaplastic, *tld*: tolloid, *msh*: muscle segment homeobox, *ind*: intermediate neuroblasts defective, *vnd*: ventral nervous system defective, *sim*: single minded.....20

Şekil 2.9: DV patern oluşumunda BMP sinyal yolunun şematize gösterimi. BMP sinyalinin temel bileşenleri gösterilmektedir. Kör uçlu kırmızı çizgiler, hedef genin inhibisyonunu, yeşil oklar aktivasyonunu, siyah ok translokasyonunu ve mavi ok transkripsiyonunu gösterir. Kısaltmalar: Tld: Tolloid; Tsg: Twisted gastrulation;

Sog: Short gastrulation, Mad: Mother against Dpp, pMAD: fosforillenmiş MAD, P: fosfat.....22

Şekil 2.10: *Drosophila*'da DV boyunca tanımlanmış bölgeler ve mutant fenotipler. (a) Dorsal yukarı ve anterior sola doğru konumlanmış bir embriyonun kader haritası. (b) Dorsal yukarıda olan bir embriyonun enine kesitinde temsil edilen BMP sinyal bileşenlerinin gen ekspresyon alanlarının şeması. (c) Mutant fenotiplerin gösterimi. Farklı dokular veya genler renklerle temsil edilmiş ve şekil üzerinde belirtilmiştir [125]'dan modifiye edilmiştir.....24

Şekil 2.11: *Drosophila*'da BMP sinyalizasyonu. Erken embriyoda üç farklı BMP ligand türü bulunur. (A) Dpp homodimerleri, (B) Dpp/Scw heterodimerleri ve (C) Scw homodimerleri. (B) Dpp/Scw heterodimerleri tercihen Sog/Tsg ve Tld'nin hareketi yoluyla orta hatta taşınır. Orta hatta, heterodimer birikir ve Tld Sog'u keserken sinyalleşme için serbesttir. Bu heterodimer, iki tip II reseptörden (Punt) ve tip I reseptörler Tkv ve Sax için bir alt birimden oluşan, plazma zarında bulunan ve tetramer olan bir heteromerik reseptör kompleksine bağlanır. Punt, Tkv ve Sax'i, GS alanları içindeki kalıntıları fosforile ederek aktive eder. Aktive edildiğinde, tip I reseptörler Mad'i fosforile eder. Mad daha sonra ortak Smad Medea ile birleşir ve kompleks, hedef genlere bağlandığı ve hedef genleri aktive ettiği veya baskıladığı nükleusa yer değiştirir. Orta hatta, Sax ve Tkv reseptörleri, yüksek eşikli hedef genlerin aktivasyonu ile sonuçlanan sinerjistik bir sinyal üretir. Yan bölgelerde, Scw ve Dpp'nin homodimerleri, düşük eşikli yanıt genlerini aktive edebilen sırasıyla orta ve düşük seviyeli sinyaller üretir. 27

Şekil 2.12: Farklı böcek takımlarının temsilcilerinde fonksiyonel analiz ile tanımlanan DV patern oluşum elemanları. Belirtilenler yalnızca Toll ve BMP yollarıyla ilgili öğelerdir. Sog, DV patern oluşumunda bir anti-BMP (-) veya bir pro-BMP (+; tepe sinyali için) işlevi uygulayabilir veya embriyonik DV patern oluşumu bağlamında BMP sinyallerini değiştirmek için hiçbir işlev sunmayabilir (Sog yoktur). 'nd': belirlenmemiş veya kesin olmayan kanıtı ifade eder. Böcek takımları arasındaki filogenetik ilişkiler solda sunulmuştur [132].....29

Şekil 3.1: Karıncaların yetiştirilmesi. Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü Hayvan Laboratuvarı'ndaki karınca odasının panoramik bir görünümü (a), karıncaların yetiştirildiği koloni kurulumları (b-c). b, CFL00009'u ve c, CFL00004'ü olmak üzere farklı boyutlarındaki kolonileri temsil etmektedir. 32

Şekil 3.2: pGEM-T Vektör haritası. Restriksiyon enzimleri kesim noktaları sağda gösterilmiştir.....40

Şekil 3.3: PCR II-TOPO vektör haritası. Restriksiyon enzimleri kesim noktaları, PZR ürününün yerleşeceği alan gösterilmiştir.....43

Şekil 4.1: *C. floridanus* embriyonik gelişiminin anlık görüntüleri. Farklı aşamalar ve aşamalara karşılık gelen nihai nükleer bölünmeler, her görüntünün sağ üst kısmında yazılmıştır. Germline kapsülünün oluşumu (sarı ok ucu), tam bakteriyositlerin ilk görünümü (yeşil ok ucu), germdiskin uçları (kırmızı ok uçları) 6. aşamada ve germband (kırmızı ok uçları) 7. aşamada, segmentlerin görünümü (mavi ok uçları) 12. aşamada proktodeal invaginasyon (turuncu ok ucu) belirtilmiştir. (Embryonic,

Larval and Pupal Development in the Carpenter Ant <i>Camponotus floridanus</i> yayınlanmamış verileri).....	61
Şekil 4.2: Filogenetik analizlerde kullanılan türlerin ağaç üzerinde gösterimi. Ağaç, BMP yolu bileşenlerinin filogenetik karşılaştırması için kullanılan türler arasındaki ilişkiyi gösterir.....	62
Şekil 4.3: <i>C.floridanus</i> BMP ligandlarının filogenetik analizi. (a) Clustal Omega'ya dayalı <i>D. melanogaster</i> ve <i>C.floridanus</i> BMP ligand dizilerinin nükleotid dizilimi, (b) nükleotid diziliminden oluşturulan Neighbor-joining'e dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, <i>D. melanogaster</i> ve <i>C.floridanus</i> BMP ligandları arasındaki ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir.	63
Şekil 4.4: <i>C.floridanus</i> BMP metalloproteazının filogenetik analizi. (a) Clustal Omega'ya dayalı <i>D. Melanogaster</i> , farklı hymenoptera türleri ve <i>C.floridanus</i> BMP metalloproteaz dizilerinin nükleotid hizalaması, (b) nükleotid diziliminden oluşturulan Neighbor-joining'e dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, <i>D. Melanogaster</i> , farklı hymenoptera türleri ve <i>C.floridanus</i> BMP metalloproteazları arasındaki ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir.	64
Şekil 4.5: <i>C. floridanus</i> BMP antagonistlerinin filogenetik analizi. (a) <i>D. melanogaster</i> , <i>C.floridanus sog</i> ve <i>tsg</i> kodlama dizilerinin nükleotid hizalaması, düşük benzerlik göstermektedir. (b) <i>D. melanogaster</i> , <i>C.floridanus</i> ve farklı hymenoptera türlerine ait <i>sog</i> kodlama dizisinin nükleotid hizalaması yüksek benzerlik göstermektedir. (c) <i>D. melanogaster</i> , <i>C.floridanus</i> ve farklı hymenoptera türlerine ait <i>tsg</i> kodlama dizisinin nükleotid hizalaması yüksek benzerlik göstermektedir. (d) Nükleotid hizalamasından oluşturulan Neighbor-joining'e dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, <i>D. melanogaster</i> ve farklı hymenopteranlarda <i>C.floridanus sog</i> ve <i>tsg</i> arasındaki ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir. Nükleotid hizalamaları Clustal Omega ile yapılmıştır.	65
Şekil 4.6: <i>C. floridanus</i> BMP reseptörlerinin filogenetik analizi. (a) Clustal Omega'ya dayalı <i>D. melanogaster</i> ve <i>C.floridanus</i> BMP reseptör dizilerinin nükleotid dizilimi, (b) nükleotid diziliminden oluşturulan Neighbor-Joining dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, <i>D. melanogaster</i> BMP reseptörleri ile <i>C.floridanus</i> BMP reseptörleri arasındaki ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir.	66
Şekil 4.7: PZR ile amplifiye edilen <i>C. floridanus</i> BMP genlerinin agaroz jelde kontrolü. M1 ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) gösterir ve amplifiye edilen genler her bir kuyunun üzerine yazılmıştır. <i>dpp</i> : decapentaplagic, <i>gbb</i> : glass-bottom boat, <i>tld</i> : tolloid, <i>tsg</i> : twisted gastrulation, <i>sog</i> : short gastrulation, <i>tkv</i> :thickveins.....	70
Şekil 4.8: PZR ile amplifiye edilen BMP sinyal yolu ilişkili genlerin agaroz jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) gösterir ve amplifiye edilen genler her bir kuyunun üzerine yazılmıştır. <i>sim</i> :single minded, <i>hnd</i> :hindsight, <i>msh</i> :muscle segment homeobox, <i>vnd</i> : ventral nervous system defective.....	71

Şekil 4.9: BMP ilişkili genlerin koloni PZR ürünlerinin jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) göstermektedir ve klon numaraları (tablo 4.1) her kuyunun üzerine yazılmıştır.	71
Şekil 4.10: RNA problemlerinin agaroz jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) göstermektedir ve RNA için bir referans olarak kullanılmıştır. RNA prob sentezi için kullanılan klon numaraları (tablo 4.1) her kuyunun üzerine yazılmıştır. İlk sıradaki 244 DIG ve ikinci sıradaki 244 Biotin işaretlidir.	72
Şekil 4.11: dsRNA'ların agaroz jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) göstermektedir ve RNA için bir referans olarak kullanılmıştır. dsRNA sentezi için kullanılan klon numaraları (tablo 4.1) her kuyunun üzerine yazılmıştır.	72
Şekil 4.12: <i>C. floridanus</i> 'un farklı embriyonik aşamalarına karşılık gelen amniyonun formasyonu. Amniyon (beyaz ok ucu), germdisk (kırmızı ok ucu) 5-6. aşamada, germband (kırmızı ok ucu) 6. ve 7. aşamada, serosa (mavi ok ucu) gösterilmektedir. Görüntüler farklı embriyolardan alınmıştır. (a-c) görüntüleri DIC mikroskobu ile ve (d-e) DAPI modunda Cytation 5 ile alınmıştır. (d-e) embriyoları DAPI ile boyanmıştır.	73
Şekil 4.13: <i>C. floridanus</i> 'un farklı embriyonik aşamalarında <i>dpp</i> ekspresyonu. Beyaz ok uçları, 4. ve 6. aşamalarda ekstraembriyonik serosa bölgesini çevreleyen şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.	79
Şekil 4.14: <i>C. floridanus</i> 'un farklı embriyonik aşamalarında <i>gbb</i> ekspresyonu. Beyaz ok uçları, 2 ve 3. Aşamalardaki germdiskteki ifadenin üçgen ve daha sonraki çizgi modelini ve ayrıca 4. aşamadaki dairesel alanı temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.	80
Şekil 4.15: <i>C. floridanus</i> 'ta farklı embriyonik aşamalarda <i>tld</i> ekspresyonu. Beyaz ok uçları, anterior bölgedeki ifadeyi temsil eder ve mavi ok uçları, farklı aşamalarda ekstraembriyonik serosa bölgesine komşu olan şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.	81
Şekil 4.16: <i>C. floridanus</i> 'ta erken embriyoda <i>tsg</i> ve <i>sog</i> ekspresyonları. Anterior sol posterior sağdır.	82
Şekil 4.17: <i>C. floridanus</i> 'ta hücreleşme öncesi ve sırasındaki embriyolarda <i>tsg</i> ve <i>sog</i> ekspresyonları. Beyaz ok uçları 4. aşamadaki dairesel ekspresyon modelini ve mor ok uçları 4. ve 5. aşamalarda ekstraembriyonik bölgeyi çevreleyen şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.	83
Şekil 4.18: <i>C. floridanus</i> 'ta hücreleşmeden sonra <i>tsg</i> ve <i>sog</i> ekspresyonları. Mor ok uçları, 6. ve 7. aşamada ekstraembriyonik bölgeyi çevreleyen şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.	84
Şekil 4.19: <i>C. floridanus</i> 'ta embriyonik gelişim aşamalarında <i>tkv</i> ekspresyonu. Anterior sağ posterior soldur.	85
Şekil 4.20: <i>C. floridanus</i> 'ta embriyonik gelişim aşamalarında <i>punt</i> ekspresyonu. Anterior sağ posterior soldur.	86

Şekil 4.21: *C. floridanus* BMP genlerinin zonlar arasındaki ekspresyonlarının şematize gösterimi. Yeni bırakılan yumurtada (a), hücrese blastoderm aşamasında (b); aşama 3 (c)'te üç ayrı zon oluşumu ve bu zonlarda *C.floridanus* BMP genlerinin ekspresyonu, ekstraembriyonik amniyon, serosa oluşumu ve ekstraembriyonik dokularda *C.floridanus* BMP genlerinin ekspresyonu (d) şematize edilmiştir. Yumurta ve embriyodaki farklı bölgeler ve dokular renklerle temsil edilmiştir: zon 1 (kırmızı), zon 2 (yeşil), zon 3 (mavi), zon 4 (sarı), amniyon (turuncu), serosa (açık turuncu). Anterior sağ posterior soldur ve embriyolar lateral konumlandırılmıştır. 87

Şekil 4.22: *C. floridanus*'a *dpp* injeksiyonu sonucunda elde edilen fenotipler. Aşama 12 (a-c) ve aşama 14 (d-f)'de sabitlenen embriyolar, embriyonik dokuların, kafa uzantılarının ve segmentlerin oluşumunda kusurlu fenotipler göstermiştir. (g-i) embriyolarında serosa uzaklaştırılmıştır. Görüntüler DAPI ile boyanan embriyolardan konfokal mikroskop ile elde edilmiş ve yeşil filtre kullanılmıştır. Anterior solda posterior ise sağdadır. 89

Şekil 4.23: *C. floridanus*'ta *sog* injeksiyonu sonucunda elde edilen farklı fenotipler. (A) Aşama 6 (a-c)'de sabitlenen embriyolar vahşi tip olarak gelişmiştir, aşama 8'de (d-f) serosa kusurları gösterilir ve aşama 12 (g-i) germband kusurları olarak gösterilir. Şiddetli fenotipler de gözlenmektedir (j-l). Görüntüler DAPI ile boyanan embriyolardan konfokal mikroskop ile elde edilmiş ve yeşil filtre kullanılmıştır. (B) Grafik, farklı fenotipleri ve enjekte edilen embriyoların sayısını temsil eder. (C) Enjeksiyondan sonra dsRNA'nın bütünlüğünü kontrol etmek için *Cfl-sog* dsRNA'nın jel görüntüsüdür. M Marker DNA'yi simgeler. Anterior solda ve posterior ise sağdadır. Embriyolar dorsal (a,d), ventral (b), lateral (c), ventrolateral (e-i) olarak görüntülenmiştir.....90

Şekil 5.1: *C. floridanus*'ta DV eksen oluşumunda BMP sinyalizasyonun şematize gösterimi. *Drosophila* DV eksen oluşumunda BMP sinyalizasyonu (a). *scw*, *tkv* ve *sax* blastoderm aşamasında tüm embriyoda eksprese olurken, *dpp*, *tld* ve *tsg* amniyoserosada; *sog* nörojenik ektodermde eksprese olur. Yalnızca spesifik dokulardaki eksprese olan genler embriyo üzerinde gösterilmiştir. (b-c) *C.floridanus*'ta ise tüm BMP genleri embriyoda eksprese olur. Koyu mor yüksek ekspresyonu ve açık mor düşük ekspresyonu göstermektedir. Ayrıca spesifik bölgelerde eksprese olan genler embriyolar üzerinde belirtilmiştir. Renkler farklı embriyonik dokuları temsil etmektedir ve şekillerin yanlarında belirtilmiştir. *Drosophila* embriyosu lateral, *C. floridanus* embriyoları ise ventral konumlandırılmıştır. Anterior solda, posterior ise sağdadır. 97

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Bhatkar Withcomb diyetinin hazırlanışı.....	31
Tablo 3.2: cDNA sentezi için revers transkriptaz reaksiyonunun pipetleme şeması.....	34
Tablo 3.3: <i>C.floridanus</i> BMP Genlerinin NCBI Erişim Numaraları.	35
Tablo 3.4: Hedef genlerin amplifikasyonu için tasarlanan primerler.	36
Tablo 3.4 (devam):	37
Tablo 3.4 (devam):	38
Tablo 3.5: PZR reaksiyonlarının pipetleme şeması ve reaksiyon koşulları.....	39
Tablo 3.6: Enzim kesim reaksiyonu ve koşulları.....	40
Tablo 3.6 (devam):	41
Tablo 3.7: Ligasyon reaksiyonu ve koşulları.....	41
Tablo 3.8: LB Agar ve sıvı besiyeri hazırlanışı.	42
Tablo 3.9: TOPO klonlama için ligasyon reaksiyonu.....	43
Tablo 3.10: SOC besiyerinin hazırlanışı.....	44
Tablo 3.11: Koloni PZR reaksiyonu ve koşulları.	45
Tablo 3.12: 10X PBS hazırlanışı	46
Tablo 3.13: PEM hazırlanışı.	47
Tablo 3.14: RNA problemlerinin sentezi için PZR reaksiyonu ve koşulları.	47
Tablo 3.15: <i>In vitro</i> RNA prob sentezi ve koşulları.....	48
Tablo 3.16: HYB tamponunun hazırlanışı.	49
Tablo 3.17: AP tamponu hazırlanışı.	51
Tablo 3.18: dsRNA sentezi için PZR reaksiyonu.	51
Tablo 3.19: <i>In vitro</i> dsRNA transkripsiyon reaksiyonu ve koşulları.....	52
Tablo 3.20: 5X TBE tamponu hazırlanışı.....	54

Tablo 4.1: Plasmid koleksiyonu.....	66
Tablo 4.1 (devam):	67
Tablo 4.1 (devam):	68
Tablo 4.1 (devamı):	69
Tablo 4.2: <i>C.floridanus</i> 'un aşama 1 yumurtalarında ve aşama 6 embriolarında zonlar arasında BMP genlerinin ifadesi.	86



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

°C	: santigrat derece
g	: gram
mg	: miligram
L	: litre
ml	: mililitre
µL	: mikrolitre
nl	: nanolitre
M	: molar
Mm	: mikromolar
%	: yüzde
U	: Ünite
∞	: Sonsuzluk

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

AP	: anterior-posterior
BMP	: Kemik Morfogenetik Protein (“Bone Morphogenetic Protein”)
bç	: baz çifti
cDNA	: komplementer (“complementary”) Deoksiribo Nükleik Asit
DIC	: Diferansiyel Girişim Kontrast (“Differential Interference Contrast”)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribo Nükleotit Tri Fosfat
dpp	: <i>decapentaplagic</i>
dsRNA	: çift sarmallı (double stranded) Ribo Nükleik Asit
DV	: dorsal-ventral
GD	: gastrulation-defective
gbb	: <i>glass-bottom boat</i>
GRN	: Gen Düzenleyici Ağ (“Gene Regulatory Network”)
ind	: <i>intermediate neuroblasts defective</i>
kb	: kilobaz
LB	: Luria Bertani

NTP	: N�kleotit Tri Fosfat
<i>mad</i>	: <i>mother against dpp</i>
pMAD	: Fosforillenmiş Mad
psi	: pound per square inch
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribo N�kleik Asit
RNAi	: RNA İnterferans
rpm	: revolutions per minute
sax	: <i>saxophone</i>
scw	: <i>screw</i>
sim	: <i>single minded</i>
sna	: <i>snail</i>
SOC	: Super Optimal Broth
sog	: <i>short gastrulation</i>
tkv	: <i>thickveins</i>
tld	: <i>tolloid</i>
tsg	: <i>twisted gastrulation</i>
twi	: <i>twist</i>
vnd	: <i>ventral nervous system defective</i>

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Camponotus floridanus'ta BMP SİNYALİZASYONU ve ZORUNLU ENDOSİMBİYONT VARLIĞINDA DEĞİŞİMİ

Nihan Sultan MİLAT

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ab. Matteen RAFIQI

Birbiriyle etkileşen genlerden oluşan Gen Düzenleyici Ağlar (GRN'ler, Gene Regulatory Networks), çok çeşitli gelişimsel bağlamlarda patern oluşumundan sorumludur. Tüm iki taraflı simetrik hayvanlar, embriyogenez sırasında gelişimsel patern oluşumu yoluyla simetri eksenlerini kurma sorunuyla karşı karşıyadır. GRN'ler bu gelişimsel patern oluşumu ve morfogenetik süreçlerin temelinde yer alır ve bu etkileşimlerdeki değişiklikler fenotipte değişikliklere neden olur. En kapsamlı şekilde karakterize edilen GRN'lerden biri, birçok böcekte Kemik Morfogenetik Protein (Bone Morphogenetic Protein, BMP) sinyal yolu tarafından yönlendirilen dorsoventral (DV) patern oluşum sistemidir. DV ekseninin oluşumu *Drosophila melanogaster*'da iyi çalışılmış olsa da, karıncalar söz konusu olduğunda bu süreçler büyük ölçüde bilinmemektedir. Ayrıca, hücresel endosimbiontlara ev sahipliği yapan böcekler söz konusu olduğunda, konak gelişimsel GRN'lerin, endosimbiont ve kendi hücreleri arasındaki sinyallerle etkileşimleri nedeniyle ek zorluklarla karşılaşılır.

Bu tezde, endosimbiont varlığının, konağın DV ekseninin oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Endosimbiontun mevcudiyeti durumunda DV ekseninin kurulmasının nasıl değiştirilebileceğini anlamak için, bu süreçler marangoz karınca *Camponotus floridanus*'ta karakterize edilmiştir. Bu amaçla hayvanlarda DV paternini temel olarak kontrol eden BMP sinyali karakterize edilmiştir. Moleküler klonlama, *in situ* hibridizasyon, RNA İnterferans gibi

moleküler teknikler özellikle DV eksenini oluşumunda yer alan gelişimsel genlerin ekspresyonunu ve işlevini incelemek için kullanılmıştır.

Sonuçlar, BMP sinyal yolunun *C.floridanus*'un erken gelişimi sırasında aktif olduğunu ortaya koymuştur. Gen ekspresyonu çalışmaları göstermiştir ki ligandlar *decapentaplegic (dpp)*, *glass-bottom boat (gbb)*; metalloproteaz *tolloid (tld)*; antagonistler *twisted gastrulation (tsg)*, *short gastrulation (sog)*; tip I reseptör *thickveins (tkv)* and tip II reseptör *punt* embriyo ve germline kapsülünde eksprese edilirken *dpp* ve *sog* hariç serosa ya da amniyonda eksprese edilmezler. *dpp* ve *sog* amniyonda *sog* ise serosa da eksprese edilir. *dpp*, *gbb* ve *tkv* erken aşamalarda bakteri bölgesinde, *tld*, *sog* ve *tkv* ise daha sonraki aşamalarda yumurtadaki bakteriyosit bölgesinde eksprese edilir. Gen fonksiyonu çalışmaları, BMP sinyalinin azalmasının veya kaybının, üç embriyonik germ tabakasının - ektoderm, mezoderm ve endoderm - kimliğini etkilediğini ortaya koymuştur. Ek olarak, ekstraembriyonik serosanın oluşumu, BMP sinyalinin azalmasından etkilenirken, amniyonun kimliği bu yoldan bağımsız olabilir.

Ağustos 2022, 126 sayfa.

Anahtar kelimeler: endosimbioz, gen düzenleyici ağlar, BMP.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

BMP SIGNALING in *Camponotus floridanus* and ITS ALTERATION in the PRESENCE of OBLIGATE ENDOSYMBIONTS

Nihan Sultan MİLAT

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat PEKMEZ

Co-Supervisor: Dr. Ab. Matteen RAFIQI

Gene Regulatory Networks (GRNs) composed of interacting genes are responsible for pattern formation in a wide variety of developmental contexts. All bilaterally symmetric animals face the problem of setting up their axis of symmetry through developmental patterning during embryogenesis. GRNs underlie these developmental patterning and morphogenetic processes, and changes in the interactions cause changes in phenotype. One of the most thoroughly characterized GRN is the dorsoventral (DV) patterning system, driven by Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling pathway in many insects. Although the establishment of the DV axis is well studied in *Drosophila melanogaster*, it is largely unknown in the case of ants. Moreover, in the case of insects that host cellular endosymbionts, additional challenges are faced because of the interactions between the endosymbiont and intercellular signals of the host developmental gene regulatory networks.

In this thesis, the effect of the presence of endosymbiont on the formation of the DV axis of the host was investigated. In order to understand how the establishment of the DV axis can be altered in case of the presence of the endosymbiont, these processes were characterized in carpenter ant *Camponotus floridanus*. BMP signaling, which primarily controls DV patterning in animals, was characterized. Molecular techniques such as gene cloning, *in situ* hybridization,

and RNA interference were used to examine the expression and function of developmental genes that are particularly involved in DV axis formation.

Our results revealed that BMP signaling was active during early development of *C.floridanus*. Gene expression studies showed that ligands *decapentaplegic (dpp)*, *glass-bottom boat (gbb)*; metalloprotease *tolloid (tld)*; antagonists *twisted gastrulation (tsg)*, *short gastrulation (sog)*; type I receptor *thickveins (tkv)* and type II receptor *punt* were expressed in the embryo and germline capsule while they were not expressed in the extraembryonic serosa or amnion excluding *dpp*, *sog*. *dpp* and *sog* were expressed in the amnion while *sog* was expressed in the serosa. *Dpp*, *gbb* and *tkv* were expressed in the bacterial region at early stages as well as *tld*, *sog* and *tkv* were expressed in the bacteriocyte region in the egg at later stages. Gene function studies revealed that the reduction or loss of BMP signalling affects the identity of the three embryonic germ layers – ectoderm, mesoderm, and endoderm. In addition, the formation of the extraembryonic serosa was affected by the reduction of BMP signalling, whereas the identity of the amnion may be independent of this pathway.

August 2022, 126 pages.

Keywords: endosymbiosis, gene regulatory networks, BMP.

1. GİRİŞ

Gelişmekte olan organizmalardaki karmaşık etkileşimler, çoğu zaman simbiyontların varlığında ilerler. Simbiyontlar ile konak arasında birlikteliğin devamını sağlayan besinsel, metabolik, ekolojik ve genetik bir karşılıklı bağımlılık vardır. Konak ya da simbiyontun işlevlerinden herhangi biri kaybolursa, bir değeri bu eksikliği giderir [1-9]. Konağın hücrelerinin içinde bulunan simbiyontlara 'endosimbiyontlar' denir [10] ve hemen hemen tüm böcekler endosimbiyontlarla ilişkilidir. Birçok endosimbiyont, konağı ile mutualistik bir ilişki kurabilir [1]. Bu endosimbiyontlar ebeveyninden yavruya dikey olarak aktarılabilir veya çevreden yatay olarak geçebilirler. Dikey olarak aktarılan endosimbiyontlar, organizmaların tek hücreli evrelerinden üreme ve ölümüne kadar eşlik eder ve bu nedenle gelişim süreçlerini önemli ölçüde etkiler. Endosimbiyontlar ve konak gelişimi arasındaki etkileşimin belirli bir mekanizmanın kontrolü altında olduğu düşünülebilse de bu etkileşim henüz tam olarak keşfedilememiştir.

Karıncalarda endosimbiyontların varlığı oldukça kısıtlıdır [11-13]. Formicinae alt familyasında ve Camponotini kabilesine ait karıncalar, '*Blochmannia*' adı verilen endosimbiyont bakterileri bulundurur [10, 14-18]. Camponotini karıncaları, *Blochmannia*'ya çoğalma ve yeni nesillere dikey aktarım için özel bir hücresel ortam sağlar [10, 19]. *Blochmannia*, konağına tek hücre aşamasından organizmanın üremesine ve ölümüne kadar eşlik eder. Bu nedenle karıncalar, endosimbiyontlar ve konağın gelişimsel yolları arasındaki etkileşimi incelemek için mükemmel bir sistem sağlar. Yakın zamanda yapılan çalışmada da Camponotini karıncalarında, bakteri endosimbiyontunun edinilmesinden sonra gelişimin radikal bir şekilde değiştiği ve bakteriler antibiyotikler kullanılarak uzaklaştırıldığında, konağın gelişimsel gen ekspresyon profilinin değiştiği gösterilmiştir [19]. Dolayısıyla endosimbiyontlar ve konak gelişimi arasındaki etkileşimi sıkı bir şekilde düzenlemek için karmaşık bir mekanizmaya ihtiyaç duyulduğuna dair şüphe yoktur, ancak bu süreç hala büyük ölçüde bilinmemektedir.

Endosimbiyontlar ve konak gelişimi arasındaki genel etkileşim mekanizmasını anlamak için gelişimin kilit düzenleyicileri araştırılmalıdır. Vücut ekseninin oluşumundan ve hücre tipi spesifikasyonundan sorumlu birbiriyle etkileşimli genlerden oluşan düzenleyici ağlar, bu kilit düzenleyicilerden bazılarıdır. Tüm iki taraflı simetrik hayvanlar, embriyogenez sırasında

gelişimsel patern oluşumuyla simetri eksenlerini kurma sorunuyla karşı karşıya kalırlar. Gen düzenleyici ağlar (GRN'ler, "Gene Regulatory Networks") bu gelişimsel patern oluşumunun ve morfogenetik süreçlerin temelini oluşturmaktadır. Dolayısıyla GRN'lerin etkileşimlerindeki değişiklikler, fenotipte de değişikliklere neden olur. En kapsamlı şekilde karakterize edilen GRN'lerden biri, çoğu böcekte çoğunlukla Kemik Morfogenetik Protein ("Bone Morphogenetic Protein", BMP) sinyal yolu tarafından yönlendirilen dorsal-ventral (DV) patern oluşumu sistemidir. DV patern oluşumu *Drosophila melanogaster*'de başlangıçta Dorsal adı verilen bir proteinin nükleer lokalizasyonu ile sonuçlanan bir dizi maternal gen ürünü tarafından belirlenir. Dorsal transkripsiyon faktörü, birkaç erken zigotik geni aktive ederek ve baskılayarak hücre kaderini oluşturmaya yardımcı olur [20]. Yumurtanın dorsal alanı içinde, salgılanan en az beş zigotik gen ürününün aktivitesi, üç ek hücre dışı protein, short gastrulation (Sog), twisted gastrulation (Tsg) ve tolloid (Tld) aktivitesi yoluyla düşük BMP sinyalleri alan hücrelere karşı yüksek alan hücreler arasında keskin bir geçiş oluşturur [21-25]. Hem Sog hem de Tsg, decapentaplegic (Dpp) veya screw (Scw) ligandlarıyla üçlü bir kompleks oluşturabilen ve onların reseptörlerine bağlanmalarını engelleyen BMP bağlayıcı proteinlerdir. Sog/ligand kompleksi, aktif ligandları serbest bırakmak için Tld tarafından kesilir [23]. Bu kesilme, aktive edici ligand seviyesinde yerel yükselmeye yol açar [23, 25]. Mevcut hipoteze göre, Sog, Tsg ve Tld, BMP'leri dorsal orta hatta taşımak üzere birlikte hareket eder [23, 25-27]. Sog ventrolateral olarak üretilir ve dorsal bölge üzerinde bir gradyan oluşturur [22]. Bu gradyan, lateral bölgeden dorsal orta hatta doğru yayılan BMP'lere bağlı net Sog akışının yönünü belirler [27, 28]. BMP sinyalleri, Smad transkripsiyon faktörleri ailesinin üyelerini fosforile eden tip I ve II reseptörlerinin heteromerik bir kompleksi tarafından iletilir. *Drosophila*'da thickveins (Tkv) ve saxophone (Sax), sırasıyla Dpp ve Scw sinyallerini iletmek için sinerjistik olarak hareket eden tip I reseptörler iken [29, 30, 31] Punt, tip II BMP reseptörüdür [32]. Fosforillendikten sonra, reseptör ile aktive olan Smad'lar (R-Smad'lar) ortak bir Smad (Co-Smad) ile bir kompleks oluşturur ve hedef gen aktivitesini düzenledikleri nükleusa geçiş yaparlar.

Ekstraembriyonik zarlar da böcekler dahil bir dizi hayvanda DV eksenini spesifikasyon mekanizmalarının kontrolü altında oluşur [33-35]. Böceklerde tam olarak bulunduğu takdirde ekstraembriyonik zarlar: serosa, amniyon ve yumurta kesesini içerir [36, 37]. Bu zarlar, embriyo bağışıklığı, kuruma direnci ve morfogenezde önemli roller oynarlar ve ek fizyolojik roller de üstlenebilirler [38]. Ekstraembriyonik zarların böcek morfogenezindeki rolüne ilişkin araştırmaların çoğu *D. melanogaster*'de, "dorsal kapanma" bağlamında kapsamlı bir şekilde

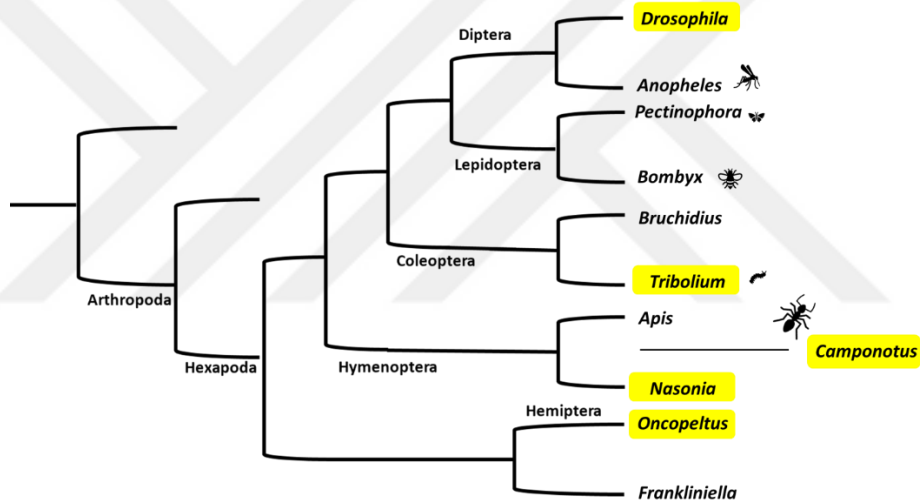
incelenmiştir. Bununla birlikte, bu türde, ekstraembriyonik zarlar kısmen azaltılmıştır ve amniyoserosa bulunmaktadır. Dolayısıyla *Drosophila*'daki ekstraembriyonik zarların tam tamamlayıcısı olan böcekler nasıl uygulanabileceği iyi anlaşılamamıştır. Ayrıca, yakın zamandaki çalışma da bu süreçlerin endosimbiontlardan etkilenebileceğini göstermiştir. Endosimbiontun varlığının, ekstraembriyonik zarların yumurtanın ortasına kayması ile ilişkili olduğu görülmektedir [19]. Bu, ekstraembriyonik zarların yumurtanın anterior-dorsal veya dorsal tarafında olduğu diğer böceklerin çoğunun tersi bir oluşumdur [37]. Camponotini karıncalarında konak fenotipi ile endosimbiont arasındaki korelasyon, endosimbiontun bu karıncalardaki hücreler arası sinyal mekanizmalarıyla etkileşime girme olasılığını, dolayısıyla ekstraembriyonik zarların oluşumunu da etkileme olasılığını yükseltir.

Bu tezde, Camponotini kabilesine ait *Camponotus floridanus* karıncalarında bakteriyel endosimbiont varlığının konak gelişimi, vücut ekseninin oluşumu ve ekstraembriyonik zarların oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu süreçleri daha iyi anlamak amacıyla birçok böcekte DV ekseninin oluşumundan sorumlu olan BMP sinyal yolağı, gen ekspresyon ve gen fonksiyonu çalışmalarıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *C.floridanus*'ta DV ekseninin oluşumunun karakterizasyonu, BMP sinyal yolağının rolünü ve endosimbiontun bu süreçler üzerindeki etkisinin anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Uzun vadede ise organizma düzeyinde endosimbioz sürecinin daha derin bir şekilde anlaşılmasının yolunu açmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. FLORİDA MARANGOZ KARINCA: *Camponotus floridanus*

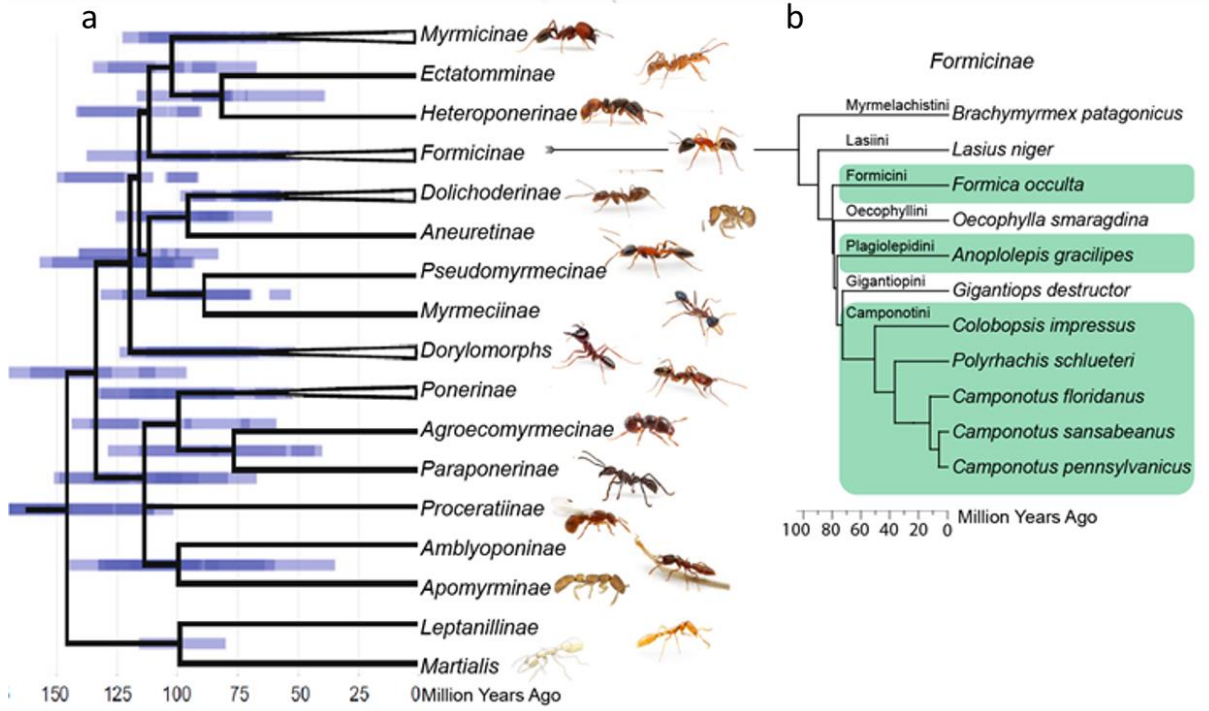
Böcekler, Arthropoda filumu içinde Crustacea, Chelicerata ve Myriapoda olmak üzere alt filumlarla birlikte sınıflandırılır [39]. Bunlar da başka bir alt filumda, Hexapoda'da bulunurlar. Tüm böcekler tek bir sınıfta tanımlanırlar ve farklı takımlara ayrılırlar. Bu bağlamda incelenen beş büyük böcek takımı vardır: Diptera (gerçek sinekler), Lepidoptera (kelebekler ve güveler), Coleoptera (kurtlar), Hymenoptera (arılar, karıncalar ve yaban arıları) ve Hemiptera (gerçek böcekler) (Şekil 2.1). Hymenoptera, böceklerin büyük bir takımıdır ve hatta belki de herhangi bir böcek takımı açısından en zengin türlere sahiptir [40, 41].



Şekil 2.1: Böcek filogenisinin genel gösterimi. Filogenetik ağaç, filum Arthropoda, subfilum Hexapoda ve büyük böcek takımlarını temsil eder. Takımlar ilgili dalların üstüne veya altına yazılmıştır. Cinsler italik yazı tipiyle yazılmış ve sarı renkle vurgulanan türler daha sonra metin içerisinde tartışılacaktır.

Hymenoptera takımına ait karıncalar, en gelişmiş ve baskın böcek gruplarından biridir. Tür çeşitliliği ve çok sayıda birey açısından büyük bir böcek ailesidir. 16000'den fazla karınca türü tanımlanmış ve adlandırılmış, 17 alt aileyi oluşturan 334 cinse göre sınıflandırılmıştır (Şekil 2.2a) [42]. Bilinen bu karınca alt aileleri arasında endosimbiontlar sadece bir alt ailede, Formicinae'de bulunur. Formicinae, 51 mevcut cins ve 3.000'den fazla tanımlanmış ve birçok bilinen ancak tanımlanmamış tür ile karıncaların ikinci en büyük alt ailesidir [43]. Bu ailede endosimbiontları olan sadece üç kabile vardır: Formicini, Plagiolepidini ve Camponotini (Şekil 2.2b). Bu karıncalar ile birbirinden bağımsız olarak ortaya çıkmış gibi görünen üç farklı

bakteri türü arasında endosimbiyotik bir ilişki vardır [11-13]. Camponotini kabilesinde, *Blochmannia* adı verilen tek bir bakteri cinsi bulunmaktadır [10, 12, 14, 15, 17, 44-47]. Camponotini kabilesine dahil olan, *C. floridanus*'un, karşılaştırmalı çalışmalar ve güvenilir evrimsel çıkarımlar için sayısız kardeş taksona sahip olan karınca filogenisi içindeki konumu iyi bir şekilde çözülmüştür.



Şekil 2.2: Endosimbiyontlar bir karınca ailesi içinde üç kabile ile sınırlıdır. a) Karınca alt ailelerinin filogenetik ağacı, göreceli bollukları (uç noktaların kalınlığı) ve yaklaşık olarak kökenlendikleri zamanlar (mor çubuklar) gösterilir. b) Formicinae alt familyasının 7 kabilesindeki farklı türler (yeşil gölgeleme), endosimbiyontları içeren üç kabileyi vurgulayarak gösterilmiştir. Ölçek altta gösterilmiştir [19, 42].

C. floridanus (alt filum: Hymenoptera, familya: Formicidae, alt familya: Formicinae, kabile: Camponotini), Florida'daki hemen hemen tüm doğal ve bozulmuş habitatlarda yaşayan çok bol bir tür olan bir marangoz karıncadır [48]. *C. floridanus* karıncaları, yumurta, larva, pupa ve yetişkinlerden oluşan tam bir yaşam döngüsüne sahip, holometaboliktirler. Kastları esas olarak bir kraliçe, erkekler, küçük ve büyük işçileri içerir. Yumurtalar, larvalar ve pupalar topluca 'brood' olarak adlandırılır. Genel olarak koloni gelişimi şu şekildedir: koloni, çiftleşme uçuşundan sonra kanatlı kraliçeler kanatlı erkeklerle çiftleştiğinde kurulur. Çiftleşmeden sonra erkekler ölür, yeni çiftleşen kraliçe kanatlarını döker ve korunaklı bir yer bulur veya toprakta bir yuva kazar. Bu yuva içinde, bir grup yumurta bırakır, bu yumurtalar larva ve pupalara

dönüşür ve kraliçe onlara yetişkin olana kadar bakar. Bu yetişkinler genellikle işçi kastı olan kısır dişilerdir ve yeni yavruya özen göstererek, yiyecek arayarak ve yuvayı genişleterek kraliçeye yardımcı olurlar. Karınca kolonilerinin hayatta kalmasının ve büyümesinin önemli bir yönü, ‘troflaksi’ adı verilen yuva arkadaşları arasında gıda değişimidir. Troflaksi, ana kraliçe ve yavru da dahil olmak üzere koloninin tüm üyelerine gıdanın dağıtılmasını sağlar. Koloni iyi bir şekilde kurulduğunda, yeni kanatlı kraliçeler ve erkekler üretilir, çevre koşulları uygun olduğunda çiftleşme uçuşuna geçilir. Kraliçe canlı yumurta üretebildiği sürece orijinal koloni korunmaya ve yeni koloni kuracak bireyler üretmeye devam eder [49].

C. floridanus son on yılda sinirbilim, mikrobiyoloji, feromon, kimyasal iletişim, endosimbiyotik etkileşimler, endokrinoloji, genomik, epigenomik ve gelişimsel epigenetik dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanları için odak tür olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır [45, 50-57]. *C. floridanus*, kolonileri on yıldan daha uzun süre yaşayan tek eşli ana kraliçelerden yaklaşık 10.000 işçiye kadar laboratuvarında verimli bir şekilde yetiştirilebilir. Ayrıca embriyonik, larva ve pupa evreleri kolaylıkla elde edilebilir. Kolonilerden kurulan deneysel tekrarlar, genetik ve çevresel varyasyonu kontrol etmek ve fonksiyonel ve davranışsal fenotipleri test etmek için tasarlanabilir. *C. floridanus*, laboratuvar deneylerinin yapılmasının nispeten kolay olduğu Formicidae familyasının birkaç temsilcisinden birini temsil eder [19, 58].

2.1.1. *C. floridanus*’un Embriyonik Gelişimi

C. floridanus’un embriyonik gelişim evrelerine karşılık gelen 17 farklı aşama vardır ve yaklaşık 13 gün sürer. Bu gelişim evreleri yumurta kraliçe tarafından bırakıldıktan sonra *D. melanogaster*’in gelişimi dikkate alınarak belirlenmiştir [59]. Birçok böceğin aksine, *C. floridanus* embriyonik gelişimine hücrel endosimbiyont “*Blochmannia*” eşlik eder. Yumurta bırakıldığında, *Blochmannia*, yumurta hacminin yaklaşık altıda birini kaplar. Aşama 1-4, yumurtanın anterior (ön) kutbunda nükleus artışına yol açan nükleer bölünmeler ile karakterize edilir. 1. Aşamada (Şekil 2.3a), yumurta hacminin yaklaşık altıda birini kaplayan endosimbiyont bakteri *Blochmannia*, yumurtanın posterior (arka) kutbunda bulunur. 2. aşamada, nükleus bölünmeleri devam eder ve nükleuslar non-spesifik bir şekilde anterior kutupta konumlanır. Bu aşamada, kutuptaki *Blochmannia* hafifçe dorsal olarak kayar (Şekil 2.3b). 3. aşamada, nükleuslar nükleer bölünmelerin geri kalanıyla eşzamanlı olarak embriyonun çevresine göç eder. Bu aşamada dışa doğru nükleer göç, embriyo içinde 3 ayrı bölge oluşturan özel bir patern izler: 1) anterior zon, yüksek bir nükleus yoğunluğuna sahip olan anterior bölge,

bu bölge embriyonun ventral anterior bölgesinde germdiskini oluşturur. Bu zon endosimbiyontları içermez. 2) Orta zon, nükleus yoğunluğu düşük olan orta bölge, bu bölge ilerleyen evrelerde ekstraembriyonik zarları oluşturur. Bu bölge de endosimbiyontları içermez 3) Posterior zon, düşük bir nükleus yoğunluğuna ve yüksek bir endosimbiyont bakteri yoğunluğuna sahiptir. Bu evrede endosimbiyontlar dorsal anteriora doğru kaymaya devam eder (Şekil 2.3c). 4. aşamada, *Drosophila* kutup hücrelerinden çok daha fazla sayıda ve orantısız olarak daha büyük boyutta kutup hücresi benzeri hücrelerin varlığı gözlenir. Düşük yoğunluklu nükleus ve yüksek endosimbiyont yoğunluğuna sahip posterior bölge hücreleşir; hücre zarları, sitoplazmanın bölümleri ve her biri yaklaşık 40-50 mikron çapında olan büyük hücreler oluşturan birkaç zigotik nükleus ile birlikte endosimbiyontları sarar. Bu hücreler, 'bakteriyosit' adı verilen hücrelerin ilk görünümünü işaret eder (Şekil 2.3d).

Germdiskinin hücreleşmesi 5. aşamada başlar. Embriyonun ventral anterior kısmındaki germdisk bölgesindeki nükleuslar, periferik zardan başlayarak plazma zarlarının içe büyümesi yoluyla hücre zarlarını oluşturur. Bu, germdisk içinde altıgen şeklinde paketlenmiş sütun benzeri hücrelerin oluşumuna yol açar. Bu aşamada bakteriyosit bölgesinin hemen önündeki ventral posterior bölge, bakteriyosit bölgesinin geri kalanından ayrılır ve ventral olarak hilal şeklinde bir bölge oluşturur. Hilal şekli, 5. aşamanın sonu ile 7. aşamanın başlangıcı arasında kademeli olarak küresel şekle dönüşür (Şekil 2.3e). Germdiskinin gastrulasyonu, germdisk mezodermi, germdiskinin ön-arka eksenini boyunca ventral olarak bir çukur oluşturarak invajine olduğunda 6. aşamada başlar. Aynı zamanda ekstraembriyonik hücreler, etraflarında hücre zarı büyütürken embriyonun ortasında büyük küboidal epitel hücreleri oluştururlar. Bu aşama *Drosophila* ve diğer böceklerde tarif edildiği gibi steriotipik blastoderm aşamasıdır (Şekil 2.3f)

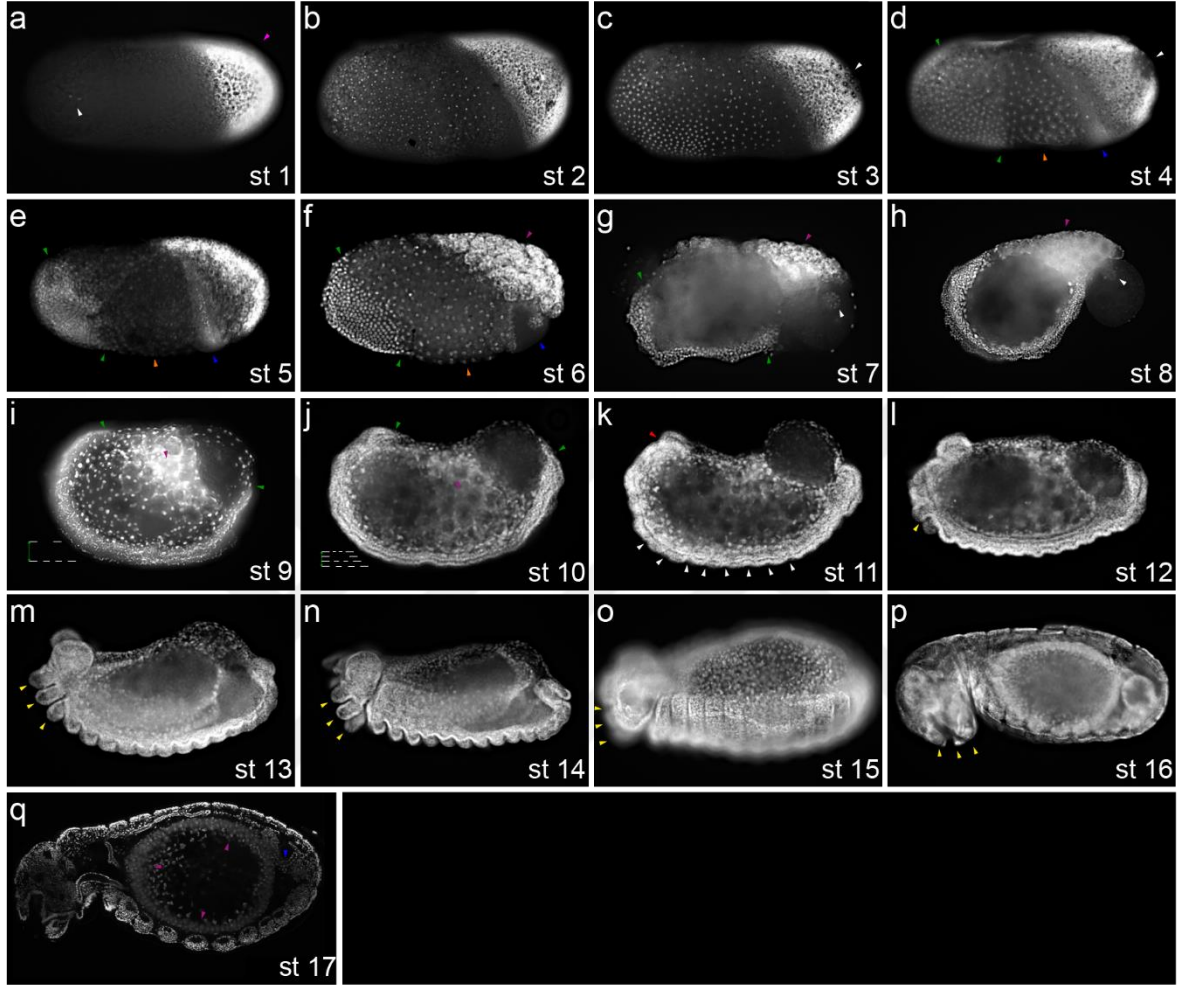
Germdiski, 7. aşamada ventral tarafında yumurtanın uzunluğu boyunca uzayarak germband haline gelir. Bu aşamada, ekstraembriyonik serosa bölgesi, embriyoya uygun tüm yapıları çevrelemek için çevresel olarak dışa doğru büyür. Serosanın büyük küboidal hücreleri, embriyoyu, yumurta kesesini, bakteriyositleri kaplayan embriyo boyunca görülebilir (Şekil 2.3g). 8. aşamada, germband ventral tarafta yumurta kesesine bitişik kalır. Germband ile lateral olarak bitişik olan amniyon, yumurta kesesinin sırt tarafını kaplar. Serosa tüm bu yapıları sarmaya devam eder. Bu aşamada bakteriyositler yumurtanın dorsal tarafında kümelenir ve kama şeklinde bir yapı oluşturur, şimdiye kadar ventral arka küresel yapı yumurtada en arka konuma hareket ederken, germbandın arka ucu bu kamanın ventral ucuna bağlanır ve ön tarafa

doğru devam eder (Şekil 2.3h). Bu aşamanın sonunda germbandda geçici segmentler oluşur. Germbandın uzaması yaklaşık olarak %80 tamamlanmıştır. 9. aşamada germbandın uzaması tamamen tamamlanır. Bu aşamanın sonunda germbandı, yumurtanın önden arkaya doğru tüm ventral tarafını kaplar. Germ hattı nükleusları, kapsül içindeki germbanda daha yakın olan merkez konumlarından hareket eder ve germbanda geçer. Amniyon, 8. aşamadan 9. aşamaya geçiş sırasında arka yapıların sarılmasını sağlamak için önemli morfogenetik hareketlerden geçer. Germband lateral epidermisin daha keskin bir sınırını oluşturur ve germbandın geçici bölümleri kaybolurken dorsal tarafa doğru lateral olarak büyümeye başlar. Bu aşamada küresel yapı, hücrel bir kese oluşturan bitişik, germbanddan kaynaklanan hücreler tarafından sarılır (Şekil 2.3i). Aşama 10, yalnızca germbandın genişliği kullanılarak önceki aşamadan güvenilir bir şekilde ayırt edilebilir. Lateral epidermisin sınırı 9, 10 ve 11. aşamalarda daha da keskinleşir (Şekil 2.3i-k).

Baş yapılarının gelişimi ve germbandda metamerik birimler oluşturan segmental olukların görünümü 11. aşamada gözlenir. T2 ila A8 segmentlerinde trakeal çukurlar görülür. Bu aşamanın sonunda procephalon ve clypeolabrum dahil olmak üzere baş yapıları ve mandibula, maksilla ve labiumun gnatal tomurcukları anteriorda çıkıntılar olarak görünür (Şekil 2.3k). 12. aşamada gnathal tomurcukları anteriordan uzaklaşır. Germbandı hafifçe düzelir, ancak bu, sinek veya kurt embriyosuna kıyasla çok incedir. Lateral epidermis dorsal olarak büyümeye devam eder (Şekil 2.3l). Aşama 13, dorsal kapanma başlangıcını işaret eder, ancak bu aşamada sadece en arkadaki iki abdominal segment ve gnathal segmentleri dorsal kapanmaya maruz kalır. Clypeolabrum geri çekilir ve gnathal tomurcukları anteriora ve ventrale hareket eder (Şekil 2.3m).

Aşama 14, ön kısımda biraz daha dairesel bir formasyona yaklaşan procefalik ve gnathal segmentleri ile karakterize edilir ve kısa bir ağız açıklığı gibi görünür (Şekil 2.3n). 15. aşamada dorsal kapanma lateral epidermis embriyonun ön ve arka uçlarından başlayarak ve orta bölgeye doğru kapanarak embriyonun dorsal tarafında birleştiğinde gerçekleştirilir. Aynı zamanda, gnathal yapıları, anterior tarafta küresel bir düzende yeniden düzenlenerek bir bofa balığının ağızına benzer görünüm verir (Şekil 2.3o). 16. aşamada, larva ağız ventral olarak hareket etmeye başlar ve sanki kapanıyor gibi daha da daralır. Karın segmentleri fiçı şeklinde bir görünüm verecek şekilde hizalanırken, torasik segmentler daha dar ve daha uzundur (Şekil 2.3p). Aşama 17, embriyogenezin sonunu işaret eder. Larva tamamen serosal kılıf, vitellin zar ve koryondan

oluşan yumurta kabuğunun içinde oluşur. Bu aşamada ağız daha da daralır ve göğüs bölgesi daha da incelir. Larva daha sonra yumurta kabuğundan çıkar (Şekil 2.3q).



Şekil 2.3: *C. floridanus* embriyonik gelişim aşamalarının geniş alan epiflorasan görüntüleri.

Nükleer DAPI ile boyanmış *C. floridanus* embriyoları: (a) aşama 1 (st 1), anteriordaki zigotik nükleuslar (beyaz ok ucu) ve posteriordaki bakteriler (magenta ok ucu), (b) aşama 2 (st 2) nükleer bölünmeler, (c) aşama 3 (st 3) nükleer bölünmeler, çevreye nükleer göç ve kutup hücrelerinin konumu (beyaz ok ucu) (d) aşama 4 (st 4) embriyodaki farklı bölgeler; embriyonik bölge (yeşil ok uçları), ekstraembriyonik bölge (turuncu ok ucu) ve germline kapsülü (mavi ok ucu) (e) aşama 5 (st 5) hücreleşme aşaması, (f) aşama 6 (st 6) blastoderm aşaması, bakteriyositlerin ilk görünümü (magenta ok ucu) (g) germbandın oluşumu (yeşil ok uçları), (h) aşama 8 (st 8), uzayan germband, kapsülün (mavi ok ucu) içindeki germ hattı nükleusları (beyaz ok ucu) (i) aşama 9 (st 9), tamamen uzatılmış germband (yeşil ok ucu), bakteriyositlerin (magenta ok ucu) yumurtanın içine doğru hareketi, germbandın AP eksenini boyunca tek tip görünümü (beyaz noktalı çizgiler) (j) aşama 10 (st 10) germbandın kalınlaşması ve desenlenmesi (beyaz noktalı çizgiler) (k) aşama 11 (st 11) segmentlerin görünümü (beyaz ok uçları), proktodeal invaginasyon (kırmızı ok ucu) ve germband düzleşmesinin başlaması, (l) aşama 12 (st 12) germbandın düzleştirilmesi, gnathal tomurcuklarının ilk görünümü (sarı ok ucu), (m) aşama 13 (st 13) dorsal kapanmanın başlaması, gnathal tomurcuklar (sarı ok uçları) (n) aşama 14 (st 14) baş uzantılarının yeniden düzenlenmesi (sarı ok uçları), (o) aşama 15 (st 15) dorsal kapanmanın tamamlanması, bofa balığı ağız benzeri gnathal tomurcukların görünümü

(sarı ok uçları) (p) aşama 16 (st 16) organogenez, , (q) aşama 17 (st 17), bakterinin yumurta kesesindeki dağılımı (magenta ok uçları) gösterilmiştir. Not; serosa (h-p) panellerindeki embriyolardan uzaklaştırılmıştır. Embriyolar laterale dönüktür, dorsal yukarı ve anterior sol taraftadır. (Embryonic, Larval and Pupal Development in the Carpenter Ant *Camponotus floridanus*'un yayınlanmamış verileridir.)

2.1.2. *C.floridanus*'un Bakterial Endosimbiontu: *Blochmannia floridanus*

Böcekler, dünyadaki açık ara en çeşitli ve oldukça başarılı bir hayvan grubudur; bu, yalnızca tür zenginliği ve bolluğuna değil, aynı zamanda yaşadıkları ekosistemlerin çeşitliliğine de yansımıştır. Böceklerin çeşitlenmesi ve evrimsel başarısı, mikroorganizmalarla kurduğu simbiyotik ilişkiler tarafından kolaylaştırılır [10]. Konakla ilişkili bakterilere 'birincil' veya 'ikincil' simbiyontlar denir. Birincil simbiyontlar, konağın gelişimi ve çoğalması için esastır, ikincil simbiyontlar ise konak organizmalar için gerekli olmayabilir [60]. Konak hücrelerde bulunan simbiyontlara 'endosimbiont' denir [10] ve birinin diğerinin vücudunda yaşadığı ve genellikle karşılıklı bir fayda içeren farklı türler arasındaki ilişkiye 'endosimbioz' adı verilir [10]. Hem tek hücreli hem de çok hücreli organizmalar söz konusu olduğunda, çok sayıda endosimbiyotik ilişki biçimi vardır. Endosimbiontlar hücre içi veya hücre dışı bulunabilir, zorunlu veya fakültatif olabilir, mutualistik, kommensal veya parazit olabilir [61]. Birincil endosimbiontlar, konaklarından bağımsız olarak çoğalma yeteneklerini kaybetmişlerdir [1, 62] ve onların böcek konakları içindeki lokalizasyonları, çoğunlukla 'bakteriyositler' adı verilen ve sıklıkla 'bakteriom' olarak adlandırılan çok hücreli simbiyotik organları oluşturan özel hücrelerle sınırlıdır [10].

Blochmannia cinsine ait bakteriler ile *Camponotus* cinsine ait marangoz karıncaları arasında zorunlu mutualistik bir endosimbiyotik ilişki söz konusudur. Bu, bakteri ve hayvanlar arasında şimdiye kadar tanımlanan ilk endosimbioz örneğidir [10, 14]. Uzak akraba Hymenoptera takımındaki karıncalar ise endosimbiozların varlığı açısından oldukça kısıtlıdır [11-13]. *Blochmannia* bakterileri ile *Camponotini* karıncaları arasındaki zorunlu endosimbiozun, bu organizmaların ekolojik ve evrimsel başarısına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [18, 47, 63, 64]. *Blochmannia*'nın atasının, yaklaşık 51 milyon yıl önce [16, 18, 65] hemipteran böceklerinden (uzaktan ilişkili bir böcek takımı) *Camponotini*'nin en son ortak atasına yatay olarak aktarıldığına dair güçlü filogenetik [12, 16, 18] ve ekolojik [66-68] kanıtlar vardır.

Blochmannia, *C.floridanus*'un orta bağırsak dokusundaki bakteriyositlerin sitoplazmasında ve ayrıca olgunlaşmış oositlerinde serbest olarak bulunur [14, 45]. Yetişkin karıncaların

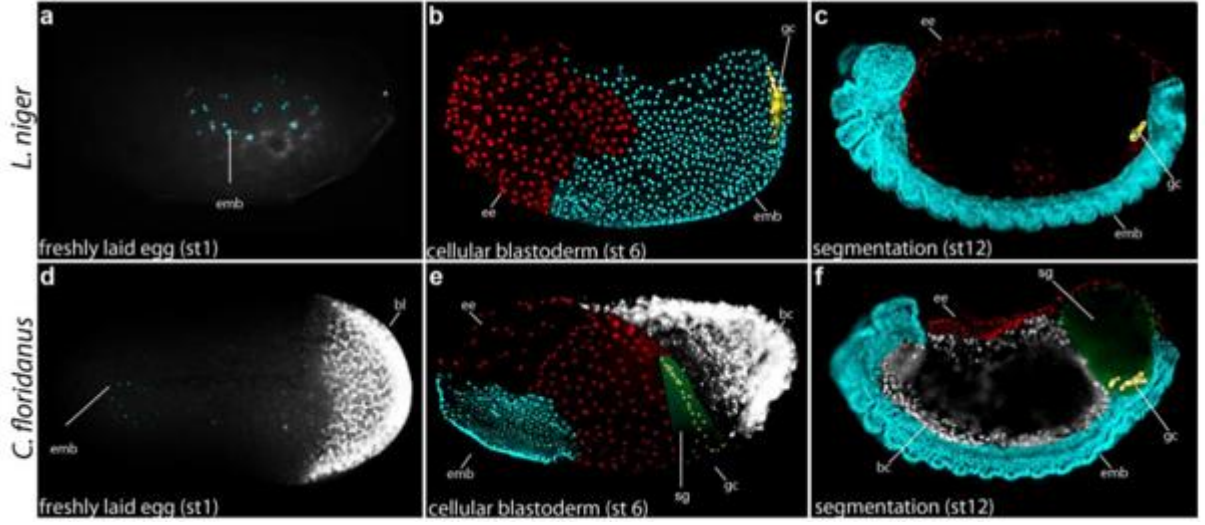
yumurtalıklarında, olgun oositlerin posterior kutbuna yerleşir. Oositler yeni bırakılan yumurtalara geçiş yaptığında da *Blochmannia* bu yumurtaların posterior kutbunda bulunur [10, 12, 14, 17, 44]. Sinsityal embriyolar hücresel sınırlar oluşturup bakteriyositler meydana geldiğinde, bakteriler yumurtanın posterior kısmındaki özel hücrelere sarılır. Bu hücreler yumurta kesesinin ortasına göç eder ve orta bağırsak epitelinin bir parçası haline gelir [19]. Daha küçük bir *Blochmannia* popülasyonu da germ hücrelerine göç eder ve gonadlar yoluyla bir sonraki nesle aktarılır [19].

Blochmannia, zorunlu endosimbiyozun bir gereği olarak konağına temel besinleri takviye eder. Nitrojeni geri dönüştürerek; amino asitlerin, yağ asitlerinin ve nükleotitlerin sentezine yardımcı olarak konak diyetini yükseltir [16, 63, 69, 70]. Karıncalar da *Blochmannia*'ya çoğalma için korunan bir hücresel ortam ve bu bakterilerin germ hattı yoluyla dikey aktarımını sağlar [17, 45, 71].

Serbest yaşayan bakteriler endosimbiyozla geçiş yaptıklarında, konağı birçok yönden etkilemeye başlarlar. Bu da endosimbiyontu veya konağı beslenme, metabolizma, bağışıklık, genetik, ekolojik veya bunların bir kombinasyonunda diğerine bağımlı hale getirir [19, 62, 72-74]. Şimdiye kadar *Blochmannia* ve *C. floridanus* ilişkisi için yapılan çalışmalar da konak ve endosimbiyont bağımlılığını bu açılardan ele almıştır. Oysaki zorunlu endosimbiyozda, bağımsız olarak var olan iki varlık ayrılmaz bir şekilde iç içe geçmiştir. Endosimbiyont, konağına tek hücreli evreden ölüme kadar eşlik etmektedir. Dolayısıyla çok hücreli konaklar için endosimbiyont, konak gelişimsel genetik ağı içine de entegre edilmelidir [75]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar endosimbiyoz sürecine genetik açıdan bir bakış sağlasa da bu entegrasyon tam olarak çözülememiştir.

2.1.3. *C. floridanus* Embriyonik Gelişiminin *Blochmannia* Varlığında Radikal Değişimi

Rafiqi ve ark., *C. floridanus* yumurtalarının diğer böcekler kiyasla radikal bir şekilde değiştiğini keşfetmiştir. Böcek embriyoları tipik olarak yumurtanın posterior bölgesinde veya tüm yumurta boyunca [76, 77] oluşurken *C. floridanus*'un anterior bölgesinde oluşur (Şekil 2.4) [19].

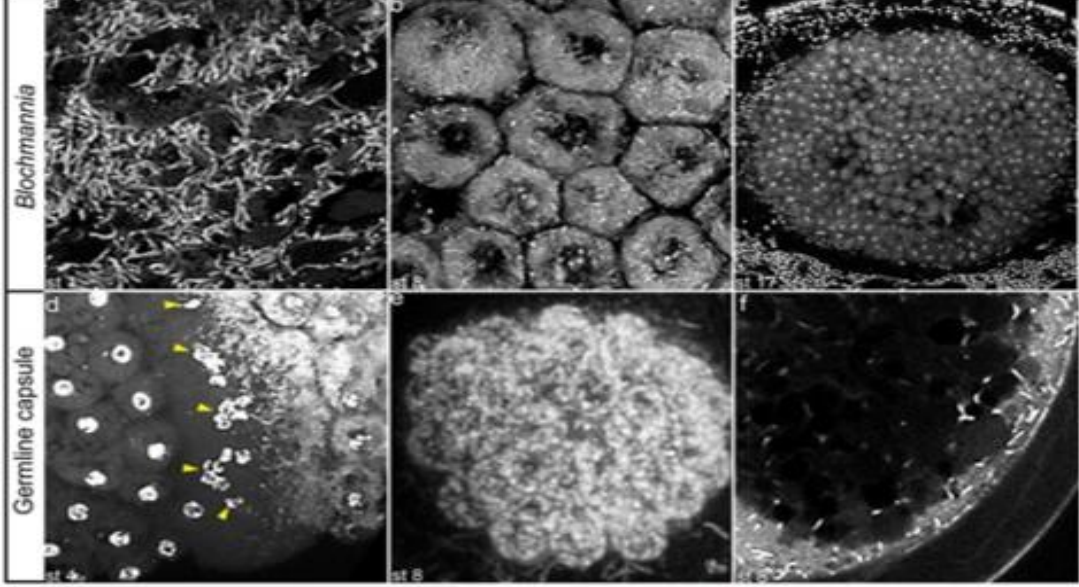


Şekil 2.4: *C.floridanus* yumurtalarındaki radikal değişiklikler. (a-f) *Lasius niger* ve *C. floridanus* embriyogenezisinin karşılaştırılması: yeni verilen yumurta aşaması (st 1, a,d), hücresel blastoderm (st 6, b,e), segmentasyon (st. 12, c,f). Mavi embriyoyu (emb), ters renklendirme *Blochmannia*'yı (bl), beyaz bakteriyositleri (bc), sarı germ hattını(gc), kırmızı ekstraembriyonik dokuyu (ee) ve yeşil somatik gonadı (sg) vurgular. Anterior solda, dorsal yukarıdadır [19].

C.floridanus'ta erken embriyonik gelişim, endosimbiontun edinilmesinden sonra radikal bir şekilde değiştirilmiştir, böylece bu karıncalar bir maternal germplazma ve aynı zamanda kısmen indüklenmiş bir germ hattına sahiptirler (Şekil 2.5) [19]. Bu karıncalarda, endosimbiont *Blochmannia*, yeni bırakılan yumurtalarda posterior kutupta bulunur (Şekil 2.5a) [10, 12, 14, 17, 44]. Sinsityal embriyolar hücresel sınırlar oluşturarak bakteriyositleri meydana getirdiğinde (Şekil 2.5b), bakteriyositler yumurta kesesinin ortasına göç eder ve orta bağırsak epitelinin bir parçası olur (Şekil 2.5c) [19]. Daha küçük bir *Blochmannia*, germ hücrelerine göç ederek gonadlar yoluyla bir sonraki nesle aktarılır [19] (Şekil 2.5d).

Son zamanlarda, Bithorax kompleksinin *Hox* genlerinin, *C. floridanus*'taki bakteriyositlerin modellenmesinde rol oynadığı da gösterilmiştir [19, 78]. *C. floridanus*'ta Bithorax kompleks genleri bakteriyositleri belirler ve sırayla *Blochmannia* tarafından düzenlenir [19]. Bu düzenleyici döngü, anterior-posterior (AP) modelleme bileşenlerinin endosimbiont ile etkileşime girme olasılığını artırır. Bununla birlikte, erken gelişimsel patern oluşum yollarının bileşenlerinin çoğunun tepkisi ve bunların karıncalardaki *Hox* genleri ve endosimbiontlar arasındaki etkileşimleri bilinmemektedir. Bununla birlikte, Camponotini kabilesinin karıncalarındaki ekstraembriyonik zarların, endosimbiont *Blochmannia* edinildikten sonra dorsalden ventral yöne ek olarak anteriordan posteriora doğru yönlendirilecek şekilde evrimleştiği gösterilmiştir [19]. Bu, endosimbiontun bu karıncalardaki eksen modelleme

mekanizmalarının her ikisi ile etkileşime girme olasılığını yükseltir. Bununla birlikte, hücreler arası sinyalleşme ve karıncalarda DV eksenli patern oluşum yolu şu ana kadar keşfedilmemiştir.



Şekil 2.5: *Blochmannia* bakteriyositler ve germline kapsül arasında segregasyon olur. (a-f), *Blochmannia*: yeni bırakılmış aşama 1 yumurtalarda arka kutupta (a); aşama 8 embriyolarda bakteriyositlerin içinde (b); 17. aşama embriyoların orta bağırsağını kaplayan bakteriyositlerde (c); gelecekteki germline kapsülünün tepesi boyunca germline öncü nükleusları (sarı ok uçları) ile birlikte (d); germline kapsülü içinde (e); ve dikey aktarım için germline kapsülünü çevreleyen küçük bir popülasyon olarak bulunur (f) [19].

Son olarak, endosimbiyontların bir konaktan diğerine yatay transferi olgusu, ikincil endosimbiyont olarak bilinir; bu tür olaylar, plastidleri oluşturan ilk simbiyogenez olayından sonra daha yüksek organizmaların organellerinin yayılmasında önemli rol oynamıştır [79]. Bakteriyosit gelişiminin Hemiptera [78] ve karıncalar [19] arasındaki aynı Hox genlerine bağımlılığı, bir endosimbiyontun, yararlanmak için birincil konak içinde edinilen organizmalar arası etkileşimlerden yararlanabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, endosimbiyontun daha uzaktan ilişkili bir konak organizma veya konak hücreler tarafından alınma olasılığı, birincil konak hücrelerden edinilen veya öğrenilen özelliklere bağlı olarak artabilir veya azalabilir. Bu, yüksek oranda korunmuş GRN'lerin, birincil konaklardan ikincil konaklara yatay transferde rol oynayabileceğini gösterir. Bunun *Blochmannia*'nın yatay transferiyle sınırlı özel bir durum mu yoksa organellerin evrimi de dahil olmak üzere yatay transferlerin genel bir özelliği mi olduğu halen araştırma gerektirmektedir.

Genel olarak, dikey olarak iletilen endosimbiyontlar, organizmalara tek hücre aşamasından, organizmaların üreme ve ölümüne kadar tüm yol boyunca eşlik eder ve bu nedenle gelişim süreçlerini önemli ölçüde etkiler. Dolayısıyla, hücrel endosimbiyontları barındıran böcekler söz konusu olduğunda, ev sahibi gelişimsel gen düzenleyici ağın endosimbiyont ve hücreler arası sinyaller arasındaki etkileşimler nedeniyle, ev sahibinin gelişimi için zorluklarla karşılaşılır. Endosimbiyontlar ve konak gelişimi arasındaki etkileşimi sıkı bir şekilde düzenlemek için karmaşık bir mekanizmaya ihtiyaç duyulduğuna şüphe yoktur, ancak bu süreç hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Tüm bu cevaplanması gereken sorular dikkate alındığında, endosimbiyont ve konak gelişimi arasındaki etkileşim mekanizması nispeten keşfedilmemiş kalır. Bu ağların endosimbiyontların varlığında nasıl çalıştığını incelemek, organizma düzeyinde endosimbiyoz sürecini ve gelişimsel sistemlerin evrimini anlamak için kritik öneme sahiptir.

2.2. *D. melanogaster*'in DV PATTERN OLUŞUMUNDA GEN DÜZENLEYİCİ AĞLARI

Oogenez ve erken embriyogenez sırasında gen ürünlerinin asimmetrik dağılımından kaynaklanan embriyonik polaritenin belirlenmesi, metazoan gelişiminde ilk adımdır. Embriyonun polarizasyonunu takiben, koordinat eksenleri belirlenir, böylece her hücrenin organizma içindeki konumunu algılamasına ve bu pozisyona uygun bir şekilde farklılaşmasına izin verilir. Eksenlerin sayısı değişkendir: radyal simetrik koelenteratların embriyoları sadece tek bir eksene sahipken, bilaterian embriyoların iki eksenidir: bir AP eksen ve bir DV eksen. Embriyonik eksenlerin özellikleri, döllenmeden önce oogenez sırasında meydana gelir [80, 81]. Yetişkin dişinin ve dolayısıyla yumurtalığın AP eksenini, doğrudan oositin ve dolayısıyla embriyonun AP ekseninin oluşumunu sağlar. Buna karşılık, DV eksenini stokastik bir süreçle tanımlanıyor gibi görünmektedir, bu nedenle annenin DV eksenini ile yumurtalıklarında gelişen oositlerin DV eksenini arasında bir uyum yoktur.

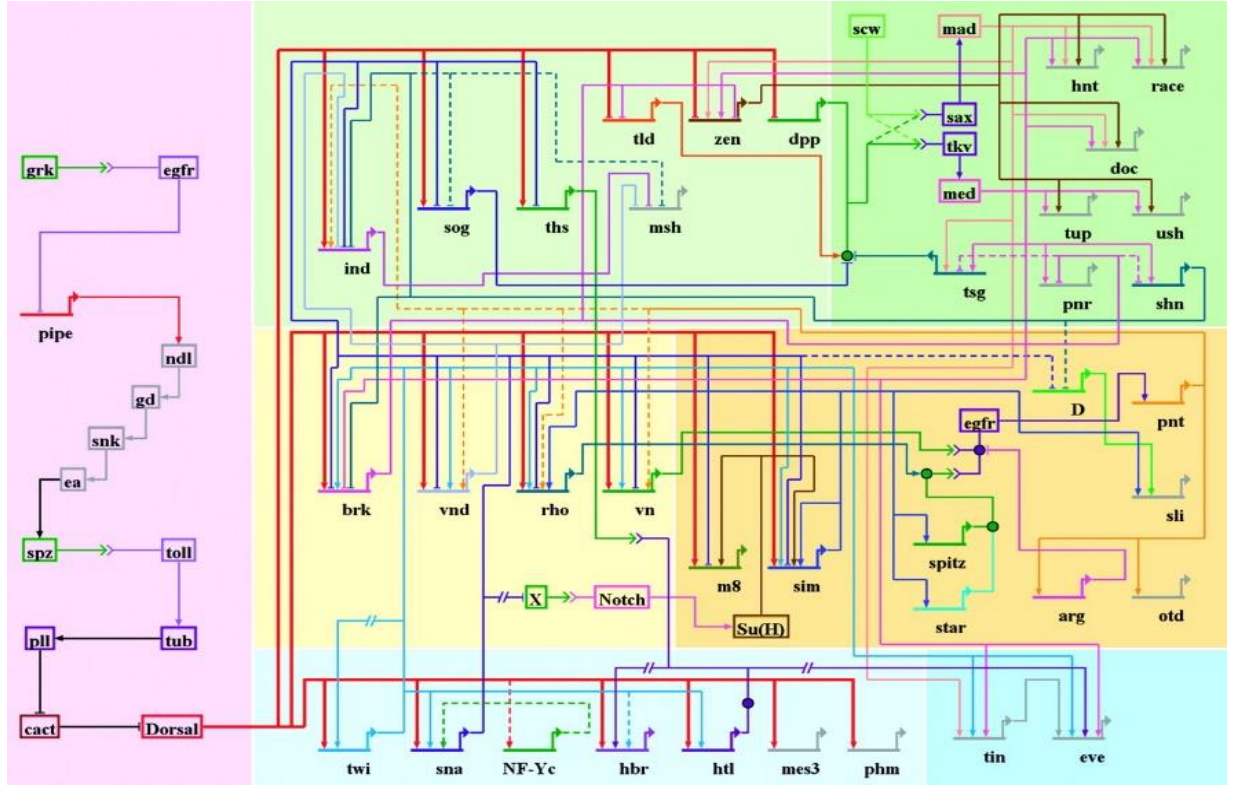
Vücut ekseninin belirlenmesinde en iyi çalışılmış model organizma *D. melanogaster*'dir. Temel olarak dört gen düzenleyici ağ, *Drosophila* embriyosunun polaritesini tanımlar ve gelişim eksenlerini belirler. Bunlardan üçü, AP ve terminal sistemleri, AP polaritesini ve AP eksenini tanımlamak için iş birliği yaparken, DV polaritesi ve DV ekseninin belirlenmesi DV sisteminin sorumluluğundadır [82]. Her sistem, mRNA ürünleri hemşire hücrelerinde sentezlenen ve oogenez sırasında geç oosit içine taşınan, maternal olarak gerekli bir dizi gen ve annenin gen

ürünlerinin regülasyonu altında döllenmeden birkaç saat sonra embriyoda kopyalanan zigotik olarak gerekli genleri içerir [83-85].

Drosophila'da, vücut polaritesinin belirlenmesi oogenez sırasında meydana gelir [86]. Döllenmeden sonra embriyo, on üç hızlı mitotik döngüden geçer. Bu nükleer bölünmelere sitokinez eşlik etmez, bu nedenle bu bölünmeler 5.000'den fazla nükleus içeren bir sinsityumun üretilmesiyle sonuçlanır. Sekizinci nükleer döngü sırasında, nükleuslar embriyonun çevresine göç eder ve plazma zarının tek bir nükleus tabakası ile kaplandığı sinsityal blastoderm embriyosunun oluşumu ile sonuçlanır. 13. nükleer döngünün tamamlanmasından sonra, hücre zarları embriyonun yüzeyinden ayrılarak onu hücresel blastoderm embriyosu adı verilen oval şekilli tek katmanlı epitele dönüştürür. Hücreleşmenin tamamlanmasını, DV ekseninin oluşumunun ve embriyonun DV eksenini boyunca geniş gelişim alanlarına ilk bölünmesinin tamamlandığı gastrulasyonun başlangıcını işaretleyen hücre hareketleri takip eder. Sinsityal blastoderm aşamasında embriyo, DV eksenini boyunca üç ana alana bölünür. Bunlar, gastrulasyon sırasında mezoderme yol açacak bir ventral alanı, ventral epidermi ve merkezi sinir sistemini doğuracak bir ventrolateral alanı (nörojenik ektoderm) ve bir dorsal epidermise ve amniyoserosayı verecek (embriyogenezin çoğu sırasında embriyonun en dorsal yüzeyini kaplayan, ancak embriyogenezin sonlarında epidermal hücreler tarafından kaplanan bir hücre tabakası) dorsal/dorsolateral alanı (dorsal ektoderm) içerir. Endoderm, gastrulasyondan sonra anterior ve posterior bölgelerden türetilir.

D. melanogaster'de farklı bölgelerinin DV eksenini, yaklaşık 60 genden oluşan karmaşık bir gen düzenleyici ağ içerir (Şekil 2.6). DV eksenini patern oluşumu için düzenleyici etkileşimler, oogenez sırasında meydana gelir. Döllenmeden sonra, transkripsiyon faktörlerinin ve sinyal moleküllerinin aktivite gradyanları daha sonra DV koordinat eksenlerini belirleyen embriyo içinde oluşur [87, 88]. Gradyanlar, eksen boyunca gen ekspresyonunun çoklu ayırık alanlarına yol açacak şekilde belirli eşik konsantrasyonları açısından yorumlanır [89-91]. Çoğu durumda, bu genler embriyonun daha ince alt bölümlerine yol açan ek gradyanlar oluşturan proteinleri kodlar [21, 92]. *Drosophila* embriyosunun DV eksenini boyunca alt bölümü, iki faktörün karşıt aktivite gradyanları tarafından yönlendirilir; bunlar, omurgalı NF- κ B'nin bir homologu olan transkripsiyon faktörü Dorsal ve bir hücre dışı sinyal proteini olan Dpp'dir. Dorsal embriyonun ventral bölgelerinde nükleuslarda yüksek seviyelere, ventral nörojenik ektodermi oluşturan lateral bölgelerde orta seviyelere ve dorsal nörojenik ektoderimde düşük seviyelere girer.

Nükleustaki, Dorsal konsantrasyonu ve dolayısıyla Dorsal aktivitesi, sinsityal blastoderm embriyosunun ventral bölgelerinde maksimumdur ve dorsal olarak azalır. Genel olarak Dorsal, zigotik olarak aktif DV patern oluşumundan sorumlu genlerinin uzamsal olarak kısıtlanmış ekspresyonunu yönlendirmek için hem bir transkripsiyonel aktivatör hem de bir baskılayıcı olarak işlev görerek bu alanları kurar [91]. Buna karşılık, Dpp sinyal aktivitesi dorsal orta hatta maksimumdur ve ventral olarak azalır.



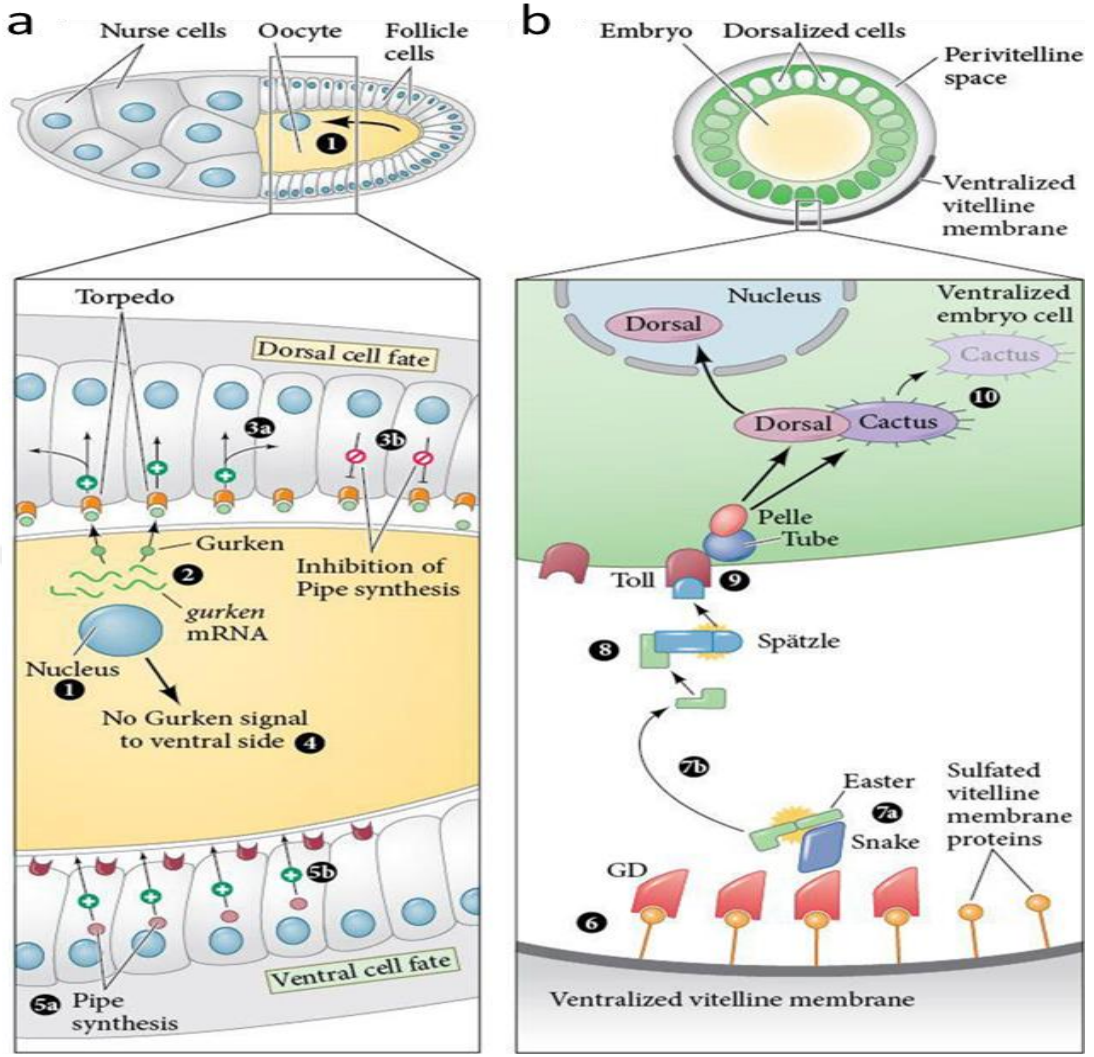
Şekil 2.6: *Drosophila*'da kompleks gen düzenleyici ağlar. Diyagram, döllenmeden sonra erken embriyoda eksprese edilen 46 gen için düzenleyici girdileri ve çıktıları temsil eder. Aşağıdan yukarıya doğru renk kodlaması, üç ana embriyonik dokuyu şu şekilde temsil eder: mezoderm (alt, mavi), ventral nörojenik ektoderm (orta, sarı) ve dorsal nörojenik ektoderm ve dorsal ektoderm (üst, yeşil). Diyagramın solu oogenez sırasındaki gen ekspresyon kaskadını gösterir. Embriyonik dokuları temsil eden bölgelerdeki açık renkli bölge, sinsityal aşamaları temsil eder. Sağdaki daha koyu bölge, gastrulasyon geçiren hücresel embriyoları temsil eder [93].

2.2.1. Dorsal, Nükleer Konsantrasyon Gradyanı Oluşturur

Dorsal nükleer konsantrasyon gradyanının oluşumu [86], anne tarafından kodlanmış iki sinyal kaskadının bir sonucu olarak ortaya çıkar. İlkinde, oositten oositi çevreleyen folikül hücre tabakasına ve ardından tekrar yumurta kabuğuna bir sinyal iletilir [94, 95]. Net sonuç, perivitellin boşlukta, yani iç yumurta kabuğu zarı (vitellin zarı) ve oosit plazma zarı arasındaki

boşlukta gizli bir asimetrik sinyalin birikmesidir. Döllenmeden sonra, bu gizli sinyal, sinyali zigotun iç kısmına ileten ve Dorsal'ın ventral-spesifik nükleer alımına yol açan ikinci sinyalleşme kademesini aktive eder.

Oosit hacmi arttıkça, oosit çekirdeği büyüyen mikrotübüller tarafından anterior-dorsal pozisyona itilir [96]. Oosit çekirdeği, *gurken* mRNA'yı lokalize ettiği oositin anterior-dorsal tarafına gider (Şekil 2.7a-1). Burada AP eksenini oluşturmada kritik olan *gurken* mesajı, DV eksenin oluşumunu başlatır. *gurken* mRNA, oosit çekirdeği ile oosit hücre zarı arasında bir hilal şeklinde lokalize olur ve protein ürünü, oositin dorsal yüzeyi boyunca bir AP gradyan oluşturur [97]. Sadece kısa bir mesafeye yayılabileceğinden, Gurken proteini sadece oosit çekirdeğine en yakın olan folikül hücrelerine ulaşır. Ve Torpedo proteinleri tarafından alınır (Şekil 2.7a-2). Torpedo sinyali, folikül hücrelerinin bir dorsal morfolojiye farklılaşmasına neden olur (Şekil 2.7a-3a) [98]. Bu, büyüyen oositi çevreleyen folikül hücre tabakasında DV polariteyi oluşturur.



Şekil 2.7: *Drosophila*'da DV polaritenin oluşturulması. (a) Oositin nükleusu, embriyonun dorsal tarafına dönüşecek alana gider. Oositin *gurken* genleri, oosit nükleusu ile hücre zarı arasında lokalize olan mRNA'yı sentezler ve burada Gurken proteinine çevrilir. Gurken sinyali, folikül hücreleri tarafından üretilen Torpedo reseptör proteini tarafından alınır. Sinyalin kısa yayılabilirliği göz önüne alındığında, yalnızca oosit nükleusuna en yakın folikül hücreleri (yani dorsal folikül hücreleri) Gurken sinyalini alır, bu da folikül hücrelerinin karakteristik bir dorsal folikül morfolojisi almasına neden olur ve Pipe proteininin sentezini engeller. Bu nedenle, Pipe proteini sadece ventral folikül hücreleri tarafından yapılır. (b) Ventral bölge, gelişimin biraz daha sonraki bir aşamasında. Vitellin zarfın ventral bölgesindeki sülfatlanmış proteinler Gastrulation- defective (GD)'i alır, bu da diğer proteinlerle kompleks oluşturarak, bölünmüş Spätzle proteininin Toll reseptörüne bağlanmasıyla sonuçlanan bir kaskadı başlatır. Ortaya çıkan kaskad, hücreyi ventralize eder. Şekil üzerindeki numaralandırmalar metinde detaylı bir şekilde verilmiştir [99].

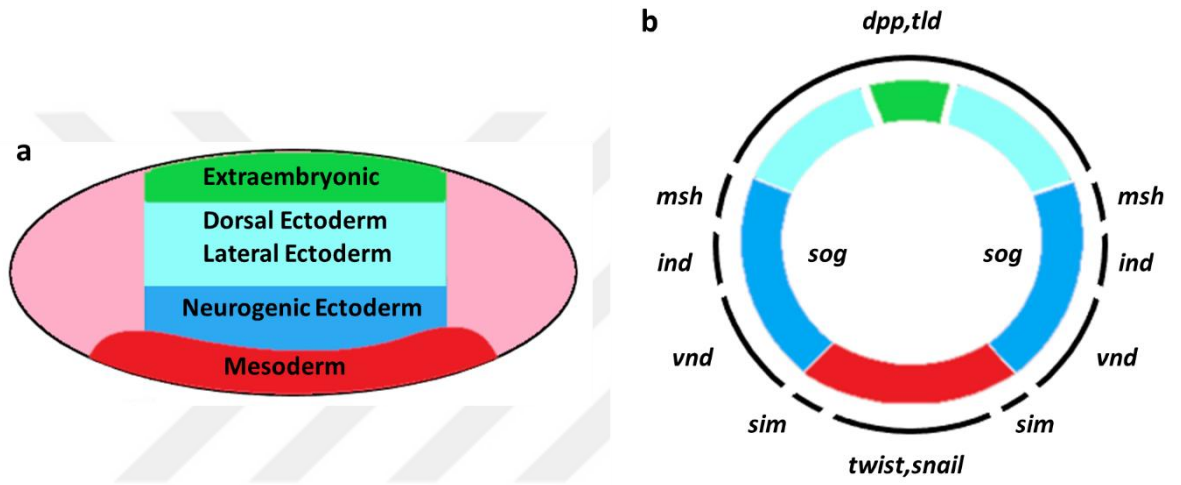
Dorsalize folikül hücrelerini belirten Gurken-Torpedo sinyali, embriyonun DV eksenini oluşturan bir gen aktivitesi kaskadı başlatır. Aktive edilmiş Torpedo reseptör proteini, *pipe* geninin ifadesini baskılayan bir transkripsiyon faktörü olan Mirror'ı aktive eder [100]. Sonuç

olarak dorsal folikül hücrelerinde Pipe sentezi inhibe olur (Şekil 2.7a-3b) [101]. Gurken ventral folikül hücrelerine yayılmaz (Şekil 2.7a-4a) ve sadece ventral folikül hücreleri Pipe sentezler (Şekil 2.7a-5a). Pipe proteini, proteinlerini sülfatlayarak ventral vitellin zarfını değiştirir (Şekil 2.7b-5b). Bu, GD proteinin vitellin zarfına bağlanmasına ve Easter proteinini (Şekil 8b-7a) aktif proteaz formuna bölecek bir kompleks oluşturmak için diğer proteinleri toplamasına izin verir (Şekil 2.7b-7b) [102]. Easter daha sonra Spätzle proteinini parçalar [103] ve burada bölünmüş Spätzle proteini, Toll reseptörüne bağlanan ve onu aktive eden ligand görevi görür (Şekil 2.7b-8). Spätzle bölünmesinin embriyonun en ventral kısmıyla sınırlı olması önemlidir. Bu, yumurtalığın folikül hücrelerinden bir proteaz inhibitörünün salgılanmasıyla gerçekleştirilir [104]. Toll proteini, yumurtanın hücre zarı boyunca eşit olarak dağılmış olan anneye ait bir üründür [105] ancak yalnızca yumurtanın ventral tarafında üretilen Spätzle'ı bağlayarak aktive olur [106]. Son olarak, Toll aktivasyonu, Cactus proteinini fosforile eden Tube ve Pelle'yi aktive eder (Şekil 2.7b-9). Dorsal'e bağlı halde olan Cactus, bu kompleksten ayrılır (Şekil 2.7b-10) [107, 108]. Dorsal protein nükleusa girer ve hücreyi ventralize eder [109]. Toll sinyal yolunun aktivasyonu, sonunda ventral orta hatta tepe seviyeleri ile stabil bir nükleer Dorsal gradyanına yol açar.

2.2.2. Dorsal, Blastoderm Embriyosundaki Genleri Etkinleştirir

DV eksenini boyunca tüm hücre kaderleri doğrudan veya dolaylı olarak Dorsal'a bağlıdır. Dorsal bu eksen boyunca bir morfojen görevi görür ve konsantrasyona bağlı bir şekilde 50'den fazla hedef geni de düzenler [91]. Dorsal hedef genlerinin nükleer Dorsal konsantrasyonlarına duyarlılığı, güçlendiricilerindeki Dorsal-bağlama bölgelerinin düzenlenmesi ve afiniteleri tarafından belirlenir [91]. Mezodermal belirleyicileri kodlayan *twist* (*twi*) ve *snail* (*sna*) gibi genler sadece ventral mezodermal alanda bulunan yüksek Dorsal konsantrasyonları tarafından aktive edilirken, nörojenik ektodermal gelişim için gerekli olan *sog* ve *ventral nervous system defective* (*vnd*), *intermediate neuroblasts defective* (*ind*), daha düşük Dorsal konsantrasyonlarda aktive edilebilir. *sog*, başlangıçta mezodermal ve nörojenik ektodermal alanda (blastoderm embriyosunun ventral %60'ı) boyunca aktive edilir [91]. Bununla birlikte, bu nörojenik ektodermal genler, *sna* olası mezodermde, *single minded* (*sim*) embriyonun her iki tarafında tek bir hücre katmanında eksprese edilir [110]. Sınırlı ekspresyon, embriyonun ventral tarafında *sna* tarafından baskılanmasının bir sonucudur. *sim* eksprese eden hücreler gastrulasyonun sonunda embriyonun ventral orta hattına hareket eder ve *sim* ekspresyonu ventral nöronların ve

epidermisin desenlenmesi için gereklidir. Dorsal, *dpp*, *zerknüllt* ve *tld* gibi dorsal ektodermal kader için gerekli olan genlerin baskılayıcısı olarak da işlev görür [111, 112]. Genel olarak, farklı genlerin farklı pozisyonlarda ekspresyonu, blastoderm evresindeki embriyoyu DV eksenı boyunca yukarıdaki bölümlerde tanımlanan farklı alanlara böler (Şekil 2.8). Bununla birlikte, Dorsal sadece *Drosophila* embriyosunun ventral ve lateral kısımlarını şekillendirmekle kalmaz, aynı zamanda embriyonun dorsal yarısını modelleyen BMP sinyal yolunun bileşenleri olan genlerin ekspresyonunu da düzenler.



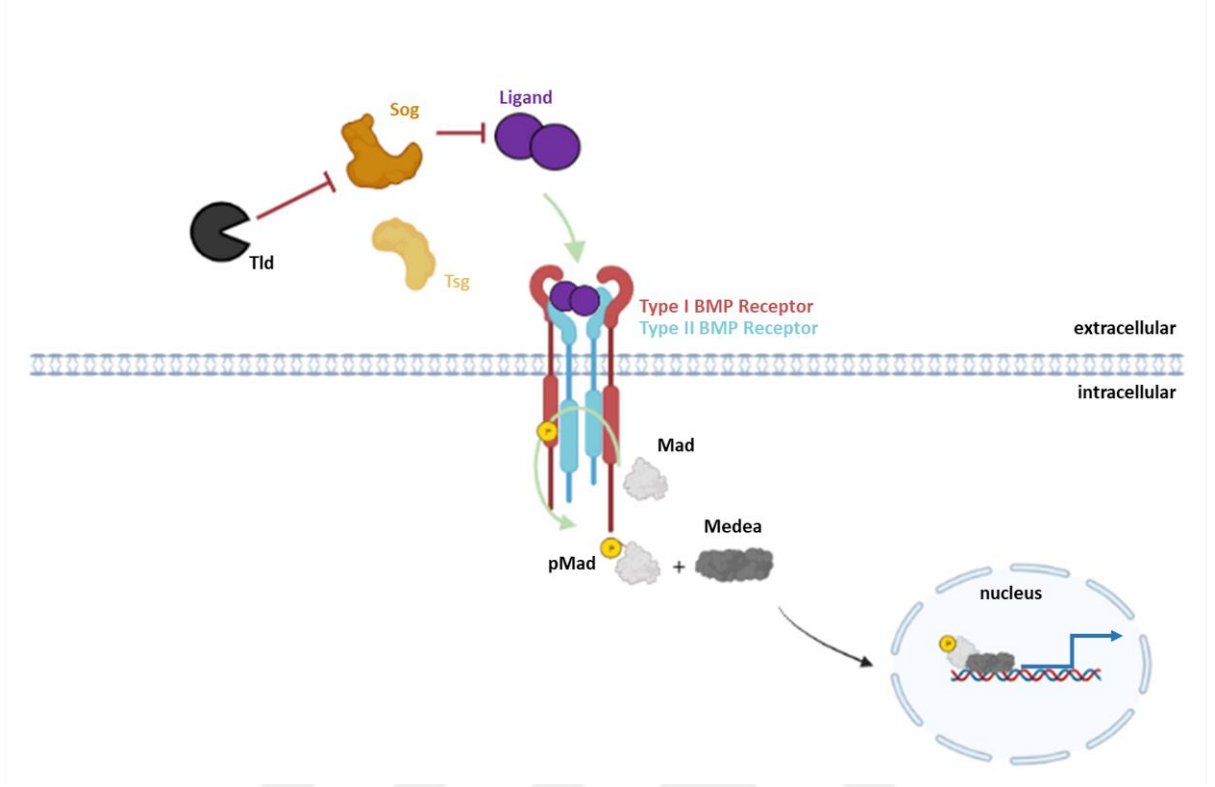
Şekil 2.8: *Drosophila*'da DV kader haritası ve DV eksenin oluşumundaki genlerin ekspresyon alanları. (a) Farklı nükleer Dorsal konsantrasyonları, farklı gen kümelerini harekete geçirir ve nihayetinde DV kaderlerini tanımlar. (b) Blastoderm embriyosunun tanımlanmış bölgelerinde eksprese edilen genler. Blastoderm embriyosunun kesiti gösterilmektedir. Renkler farklı DV alanlarını temsil etmektedir. *dpp*: *decapentaplagic*, *tld*: *tolloid*, *msh*: *muscle segment homeobox*, *ind*: *intermediate neuroblasts defective*, *vnd*: *ventral nervous system defective*, *sim*: *single minded*.

2.3. BMP SİNYALİZASYONU

Gelişmekte olan organizmada BMP sinyali için en erken gereksinim, embriyonik DV eksenı boyunca hücre kaderlerinin modellenmesi sırasında. Hem omurgalılar hem de omurgasızlar, DV paterni oluşumunda BMP sinyalini kullanır (Şekil 2.9), bu korunmuş yolun erken gelişimdeki rolü için eski bir kökene işaret eder [113]. Kanonik bir sinyal, hücre dışı ligandın tip I ve tip II transmembran serin/treonin kinazlardan oluşan iki molekülden oluşan bir heteromerik reseptör kompleksine bağlanmasıyla başlar. Bu ligand-reseptör kompleksinin oluşumu, yapısal olarak aktif tip II reseptör kinaz tarafından tip I reseptör içindeki GS (zara yakın glisin-serinden zengin bir bölüm) bölgesinin fosforilasyonu ile sonuçlanır. *Drosophila*'da

üç BMP tipi ligand bulunur: Omurgalı BMP'leri 2 ve 4'ün fonksiyonel bir ortologu olan Dpp, BMP 5,6,7 alt grubunun bir üyesi olan Gbb ve uzaktan akraba olan Scw. Embriyoda, ligand dimerleri, tip II reseptör Punt ve iki tip I reseptör Sax ve Tkv içeren ortak bir reseptör seti aracılığıyla sinyal verir [114]. Ligandın bağlanması üzerine, bu fosforilasyon olayı, tip I reseptör kinazı aktive eder ve onun uygun bir R-Smad substratı Mad'i fosforile etmesini sağlar. Fosforillenmiş R-Smad daha sonra *Drosophila* common-Smad (coSmad), Medea ile bir kompleks oluşturur ve bu kompleks, gelişimsel kaderi düzenleyen genlerini aktive edip baskılayabildiği nükleusa doğru yer değiştirir (Şekil 2.9).

BMP yolunun aktivasyonu *Drosophila*, sitoplazmik protein Mad'in fosforile edilmiş formunu tespit etmek için immünohistokimya kullanılarak doğrudan görselleştirilebilir. Fosforillenmiş Mad (pMAD), BMP reseptör aktivasyonunun doğrudan bir sonucu olarak birikir ve yanıt veren hücrelerin nükleusuna yer değiştirir [25, 115, 116], burada transkripsiyonel bir kofaktör olarak görev yapar . pMAD başlangıçta orta blastoderm evrelerinde oldukça geniş ve sığ bir modelde saptanır, ancak daha sonra dorsal orta hatta 5-7 hücreden oluşan nispeten keskin bir şerit haline gelir [25, 116, 117]. pMAD boyamasının bu zirvesini oluşturmak, Dpp'nin yanı sıra en az dört hücre dışı proteinin işlevini gerektirir: Sog [21, 22], Tsg [25, 118], Tld [23, 117], ve Scw [31, 119]. pMAD boyaması ile genlerin daha geniş dorsal paternlerdeki ekspresyonu arasındaki ilişki, muhtemelen BMP yanıtının farklı eşik seviyelerini yansıtmaktadır [120].



Şekil 2.9: DV patern oluşumunda BMP sinyal yolunun şematize gösterimi. BMP sinyalinin temel bileşenleri gösterilmektedir. Kör uçlu kırmızı çizgiler, hedef genin inhibisyonunu, yeşil oklar aktivasyonunu, siyah ok translokasyonunu ve mavi ok transkripsiyonunu gösterir. Kısaltmalar: Tld: Tolloid; Tsg: Twisted gastrulation; Sog: Short gastrulation, Mad: Mother against Dpp, pMAD: fosforillenmiş MAD, P: fosfat.

2.3.1. *D. melanogaster*'de BMP Sinyal Yolağının Temel Bileşenleri

2.3.1.1. BMP Ligandları

DV eksen, *Drosophila* ventral nükleuslarında transkripsiyon faktörü Dorsal'ın bir nükleer gradyanı ve yukarıdaki bölümlerde açıklandığı gibi dorsal bölgelerde bir BMP sinyal gradyanı ile modellenir [87]. Ventralden dorsala doğru konumlanmış nükleuslar, giderek daha az nükleer Dorsal sergiler. Bu nükleer lokalize Dorsal gradyanı, embriyonun erken DV modelini kurar (Şekil 2.10a) ve BMP sinyalleşmesini iki şekilde düzenler [91]. İlk olarak, BMP ligand geni *dpp*'nin ekspresyonunu ventral olarak baskılar ve ekspresyonunu embriyonun dorsal ~%40'ı ile sınırlandırır (Şekil 2.10b). İkincisi, düşük seviyelerde nükleer lokalize Dorsal, ventrolateral bölgelerde BMP antagonist *sog* ifadesini indükler (Şekil 2.10b). Dpp ve Sog'un eylemleri yoluyla, farklı BMP aktivitesi, embriyonun dorsal bölgelerindeki dokuları düzenler. Dorsal nörojenik olmayan ektodermin dorsal ektoderm ve amniyoserosa bölünmesi için Dpp gereklidir. Bu iki ana doku, amniyoserosa ve dorsal ektoderm, dorsal hücrelerin %40'ından

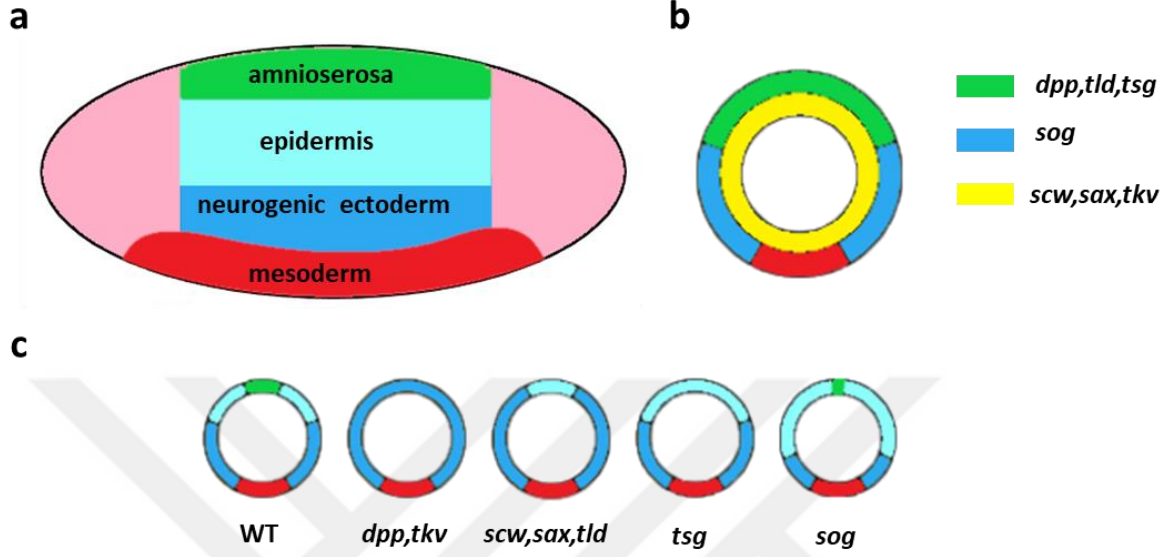
oluşur. Amniyoserosa, dorsal orta hatta bitişik olan sekiz ila on hücreden kaynaklanırken, dorsal ektoderm daha fazla lateral hücreden kaynaklanır.

Bir mutasyon sonucu Dpp'nin yokluğu, tüm ektodermin ventral nörojenik ektoderm olarak belirlenmesine neden olur (Şekil 2.10c) [121, 122]. Dpp'deki hipomorfik mutasyonlar ise amniyoserosa kaybına neden olur, ancak bazı dorsal epidermileri sağlam bırakırken, daha güçlü mutasyonlar, nöroektodermin ilerleyici genişlemesine neden olur. *dpp*'nin ektopik ekspresyonu, amniyoserosanın ve dorsal epidermisin doza bağlı genişlemesine neden olur [21]. Bu sonuçlar, yüksek seviyelerde amniyoserosa ve düşük seviyelerde dorsal epidermisi belirleyen erken sinek embriyosunda bir morfojen olarak hareket eden BMP sinyalleşmesinin rolünü desteklemektedir.

Dpp'nin etiketlenmiş formlarını kullanarak [123], Dpp proteininin dağılımını görselleştirmek mümkündür. Erken hücrel blastoderm oluşumu sırasında, Dpp proteini, *dpp* transkriptinin geniş dağılımını yansıtan geniş bir dorsal alanda konumlanır. Bununla birlikte, hücreleşme ilerledikçe, dramatik bir yeniden dağılım meydana gelir. Dpp, dorsal orta hat boyunca (varsayımsal amniyoserosa'da) bir şeritte yüksek konsantrasyonlarla ve dorsolateral bölgelerde (varsayımsal dorsal epidermis) daha düşük konsantrasyonlarla, kademeli bir gradyan içinde lokalize hale gelir [120]. Dpp'nin bu asimetric dağılımı, dorsal ektodermin amniyoserosa ve dorsal epidermise bölünmesini sağlayan şeydir.

Ek bir BMP ligandı olan Scw, *Drosophila* embriyosunun DV modellenmesinde Dpp ile birlikte hareket eder [119]. Dorsal nörojenik olmayan ektodermle sınırlı anlatımı yapılan *dpp*'nin aksine, scw embriyonun her yerinde eksprese edilir. (Şekil 2.10b). scw mutantları, amniyoserosadan yoksundur ve nöroektodermden bir genişleme sergiler, ancak *dpp* mutantlarının aksine, dorsal epidermis kalır (Şekil 10c). Bu nedenle, Scw yalnızca DV modellemede yüksek seviyelerde BMP sinyalleşmesi için gereklidir [122]. scw, embriyo boyunca geniş ölçüde eksprese edilmesine rağmen, ventral dokulardaki ekspresyonu scw mutantlarında dorsal dokuları kurtarmak için yeterlidir [30, 31]. Değişiklik ventral alanda eksprese edilmediğinden ve BMP dimerleri hücre içinde olduğundan, bu çalışmalar, dorsal embriyonik bölgelerde diferansiyel BMP sinyali oluşturmak için heterodimerler (aynı hücrelerde birlikte ekspresyonlarını gerektirecek) yerine homodimerler olarak işlev gören Dpp ve Scw'ye destek sağlar. Bununla birlikte, aşağıda tartışıldığı gibi, diğer çalışmalar Dpp-Scw

heterodimerlerinin amnioserosayı oluşturmak için gerekli olan en yüksek BMP sinyalleşme seviyesini ürettiğini ileri sürmektedir [124].



Şekil 2.10: *Drosophila*'da DV boyunca tanımlanmış bölgeler ve mutant fenotipler. (a) Dorsal yukarı ve anterior sola doğru konumlanmış bir embriyonun kader haritası. (b) Dorsalı yukarıda olan bir embriyonun enine kesitinde temsil edilen BMP sinyal bileşenlerinin gen ekspresyon alanlarının şeması. (c) Mutant fenotiplerin gösterimi. Farklı dokular veya genler renklerle temsil edilmiş ve şekil üzerinde belirtilmiştir [125]'dan modifiye edilmiştir.

2.3.1.2. BMP Reseptörleri ve Ligand-Reseptör Etkileşimleri

Dpp ve Scw'nin hücre kültüründe ve embriyoda heterodimerler oluşturduğunu bir çalışmayla göstermiştir [124]. Ayrıca, hücre kültüründe heterodimer, eşmolar bir Dpp ve Scw homodimer karışımından on kat daha fazla sinyal (pMAD fosforilasyonu) üretir. Dpp/Scw heterodimerinin artan sinyalleşme yeteneği, iki tip I reseptörü Tkv ve Sax arasındaki sinerjiden kaynaklanabilir. *In vitro*, Dpp/Scw sinerjistik çıktısı hem Tkv hem de Sax gerektirirken, Dpp homodimerlerinin sadece Tkv'ye ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir [124]. Embriyoda, aktive edilmiş *tkv* mRNA'nın enjeksiyonu, ancak Sax değil, Dpp eksikliği olan embriyoları doza bağlı bir şekilde kurtarır [30]. Ayrıca, *scw* mRNA enjeksiyonunun *dpp* sinyalini artırması gibi, aktive edilmiş *sax* mRNA enjeksiyonu da aktive edilmiş *tkv* sinyalini uyarır. Bu, Scw'nin muhtemelen Sax aracılığıyla sinyal verdiğini, oysa Dpp'nin öncelikle Tkv aracılığıyla sinyal verdiğini ve iki ligandın iki reseptörü sinerjistik olarak aktive ettiğini gösterir.

In vitro olarak, Dpp/Scw heterodimer, Sog ve Tsg için homodimerlerine göre daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Dolayısıyla, heterodimerlerin bir Dpp/Scw/Sog/Tsg kompleksinin parçası olarak dorsal orta hatta doğru yayılma olasılığı homodimerlere göre daha fazladır. Bu görüşle tutarlı olarak, Scw'nin yokluğunda, hücre dışı Dpp homodimerlerinin orta hatta lokalize olmadığı, bunun yerine geniş bir şekilde dağıldığı ve düşük seviyeli bir sinyal ürettiği gösterilmiştir [123, 124]. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar, dorsal hücrelerin iki dokuya bölünmesinin, hem homo- hem de heterodimerlerin benzersiz yönlerinden yararlanan iki fazlı bir sinyalden kaynaklandığını göstermektedir. Bu senaryoda, Dpp/Scw heterodimerleri tercihen Sog ve Tsg ile bir kompleks içinde dorsal orta hatta taşınır. Orada, Tld tarafından kesilerek kompleksten salınırlar ve bir Sax/Tkv heteromerik kompleksinin sinerjistik aktivasyonu yoluyla optimal çıktı üretirler, bu da amniyoserosa spesifikasyonu ile sonuçlanır. Buna karşılık, Dpp ve Scw homodimerleri, Sog/Tsg için daha düşük bir afiniteye sahip olduklarından verimli bir şekilde taşınmazlar. Bu nedenle, dorsal alanda geniş bir şekilde dağılmış halde kalırlar ve sırasıyla Tkv ve Sax'ın homomerik komplekslerine bağlanarak düşük seviyeli bir sinyal üretirler. Geniş, düşük seviyeli sinyal dorsal ektodermi önceden düzenler ve nörojenik aktiviteyi bastırır [116].

Yukarıdakiler dorsal patern oluşumunun birçok yönünü açıklayabilmesine rağmen, sinyalleşmede heterodimerlerin rolüne karşı kanıtlar, Dpp ve Scw'nin scw mutant veya dpp scw çift mutant embriyoların örtüşmeyen bölgelerinde eksprese edildiği deneylerden gelir [30, 31, 123]. Golgi'de salgı sırasında heterodimer oluşumunun meydana geldiği düşünüldüğünden, iki ligandın embriyonun farklı bölgelerinde ekspresyonu sadece homodimer oluşumuna izin vermelidir. Bu sonuçlar, homodimerler tarafından en azından orta düzeyde sinyal üretilebileceğini göstermiş ve bazı yeni yüksek dereceli reseptör komplekslerinin sinerjistik sinyalleşmeye katkıda bulunabileceği önerisine yol açmıştır. Bu bağlamda, omurgalı hücrelerine BMP ligandları eklendiğinde, muhtemelen tetramerleri temsil eden önceden oluşturulmuş reseptör komplekslerinin toplam boyutunun arttığının gösterilmesi ilginçtir [126]. Bu gözlemler, homo ve heterodimerlerin model oluşturma sürecine nispi katkılarını tespit etmek için ek çalışmanın gerekli olacağını göstermektedir.

Sinyal yayılımı için gerekli olan ligandların, reseptörlerin ve hücre içi efektörlerin korunmasına ek olarak, hücre dışı boşlukta ligandların mevcudiyetini düzenleyen birkaç hücre dışı faktör de korunur. Omurgalı ve omurgasızlar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar, DV

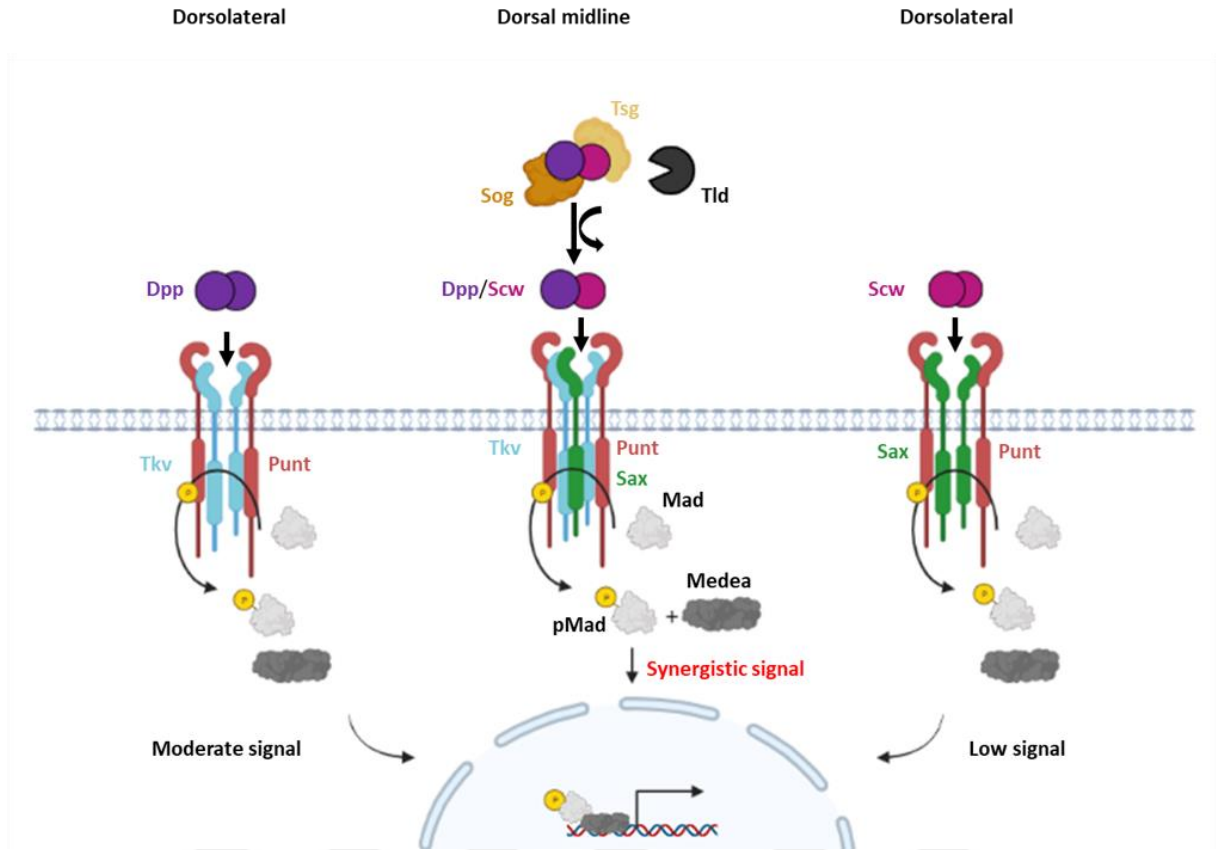
modellemesi bağlamında, bu hücre dışı modülatörlerin, farklı gen ekspresyon programlarını doza bağlı bir şekilde aktive eden farklı BMP sinyal seviyelerinin oluşumunda hayati roller üstlendiğini ve böylece geniş hücre alanları boyunca farklı hücre kaderleri belirlediğini ortaya koymuştur.

2.3.1.3. Hücre Dışı Modülatörler

Erken embriyoda Dpp aktivitesi dorsal orta hat yakınında en yüksek ve yan sınırlarda daha düşük olmasına rağmen, *dpp* tüm dorsal alan boyunca eşit olarak eksprese edilir. Başka bir deyişle, tek tip *dpp* ifadesinin bir alanı içinde keskin, adımlı gradyan oluşur. Bu nedenle, ligand aktivite gradyanını şekillendirmede ek hücre dışı faktörlerin dahil edilmesi gerekir. Bunlar, BMP antagonistleri Sog ve Tsg; metalloproteaz Tld'dir. Hem Sog hem de Tsg, Dpp'yi reseptörlerinden ayıran üçlü bir kompleks içinde bu proteinlerin Dpp'ye bağlanmasını kolaylaştıran sistein açısından zengin motifler içerir. [25]. Tld, Sog'u parçalayabilen bir metalloproteaz olarak iş görür [23, 127].

Sog ve Tsg dorsolateral hücrelerde sinyalleşmeyi inhibe eder, ancak en dorsal hücrelerde bunu destekler. Sog'un ventrolateral ifadesinin bu iki olayın anahtarı olduğu düşünülmektedir. Lateral bölgelerde, Sog, Tsg ve Dpp kompleksi, sinyali lokal olarak engellemek için Dpp'nin reseptörlerine bağlanmasını engellemelidir. Bununla birlikte, kompleks, Dpp'nin reseptörü veya diğer hücreye bağlı ligand bağlayıcı moleküller ile etkileşime girmesini engellediği için, uzun menzilli Dpp difüzyonunu da kolaylaştırmalıdır. Sog'un net akışı ventral lateral bölgelerde sentez yerinden uzakta ve dorsal orta hatta doğru olduğundan [128], akış Dpp'nin lateral bölgelerden orta hatta doğru taşınmasını kolaylaştıracaktır. Bu, dorsal orta hattaki Dpp konsantrasyonunu artırarak Dpp sinyalini desteklemelidir. [27].

Bu modelde (Şekil 2.11), Sog akışının yaratılmasına yardımcı olan bir anahtar bileşen, Sog'un metalloproteaz Tld tarafından kesilmesidir [27, 117]. Dorsal bölgede eksprese edilen bu proteaz, Dpp'ye bağlandığında Sog'u parçalamak için lokal olarak hareket eder [123]. Serbest bırakılan Dpp'nin iki olası kaderi vardır: alıcısına ve sinyaline bağlanabilir veya başka bir Sog/Tsg kompleksi tarafından yeniden yakalanabilir. Lateral bölgelerde olduğu gibi, Sog seviyeleri maksimum olduğunda, yeniden yakalama olasılığı yüksektir, oysa Sog seviyelerinin düşük olduğu orta hatta, salınan Dpp'nin reseptörlerine bağlanma ve sinyal verme olasılığı daha yüksektir [28].



Şekil 2.11: *Drosophila*'da BMP sinyalizasyonu. Erken embriyoda üç farklı BMP ligand türü bulunur. (A) Dpp homodimerleri, (B) Dpp/Scw heterodimerleri ve (C) Scw homodimerleri. (B) Dpp/Scw heterodimerleri tercihen Sog/Tsg ve Tld'nin hareketi yoluyla orta hatta taşınır. Orta hatta, heterodimer birikir ve Tld Sog'u keserken sinyalleşme için serbesttir. Bu heterodimer, iki tip II reseptörden (Punt) ve tip I reseptörler Tkiv ve Sax için bir alt birimden oluşan, plazma zarında bulunan ve tetramer olan bir heteromerik reseptör kompleksine bağlanır. Punt, Tkiv ve Sax'i, GS alanları içindeki kalıntıları fosforile ederek aktive eder. Aktive edildiğinde, tip I reseptörler Mad'i fosforile eder. Mad daha sonra ortak Smad Medea ile birleşir ve kompleks, hedef genlere bağlandığı ve hedef genleri aktive ettiği veya baskıladığı nükleusa yer değiştirir. Orta hatta, Sax ve Tkiv reseptörleri, yüksek eşikli hedef genlerin aktivasyonu ile sonuçlanan sinerjistik bir sinyal üretir. Yan bölgelerde, Scw ve Dpp'nin homodimerleri, düşük eşikli yanıt genlerini aktive edebilen sırasıyla orta ve düşük seviyeli sinyaller üretir.

sog, *tsg* ve *tld*'deki mutasyonlar, *dpp* mutantları tarafından sergilenenlere benzer ancak onlardan daha az şiddetli fenotipler üretir [122]. Aslında, bu mutasyonların tümü adım gradyanını bozar. *tld* mutantlarında, tüm sinyalleşme azalır, ancak *sog* ve *tsg* mutantlarında, dorsolateral bölgelerde sinyalleşme artar ve dorsal hücrelerin çoğunda sinyalleşme azalır, *dpp* ekspresyon paternine çok daha yakından benzeyen geniş bir pMAD dorsal bölgesi üretir [22, 24, 25, 119, 129].

2.3.2. Böceklerde DV Modelleme İçin İkinci Bir Sinyal Yolu

Böceklerde, DV paterninin oluşumu için ikinci bir sinyal yolu seçilmiştir. Klasik olarak Metazoa'da doğuştan gelen bağışıklık ile ilişkili olan Toll yolu, *Drosophila*'nın tüm DV eksenini boyunca gen ekspresyonunu kontrol eder [130]. Bu gradyan, ana embriyonik dokuların konumunu belirler ve BMP elemanlarının dorsal ektodermal ve ekstraembriyonik bölgeler oluşturması için ikincil bir rol bırakır. Dereceli BMP etkinliği, embriyonik DV patern oluşumu için atalardan kalma mekanizmayı temsil ediyorsa, ana oyuncu olarak Toll'a geçiş nasıl gerçekleştiği bir soru işaretidir.

Toll ve BMP yolları, bugüne kadar incelenen tüm böceklerin embriyonik DV patern oluşumunda temel roller üstlenir (Şekil 2.12). Bununla birlikte, etkileşim ağları ve hedef dokular üzerindeki etkilerinin kapsamı, böcek takımları boyunca büyük ölçüde değişir. Maternal Toll'un ventral aktivasyonu, ventral ve lateral gen ekspresyonunu aktive eden ve dorsal olarak kısıtlanmış genleri baskılayan dorsal tarafından kodlanan NFκ-B ailesi transkripsiyon faktörünün ventrodorsal nükleer gradyanını indükleyerek *D.melanogaster*'da tüm DV eksenini kurar [130]. Hedefleri arasında *D. melanogaster* Toll, *dpp*'yi baskılayarak ve lateral nöroektodermde *sog*'u indükleyerek zigotik BMP sinyallerini kontrol eder. Bu, dorsal olarak kısıtlanmış BMP sinyalleriyle sonuçlanır, çünkü lateral Sog, Dpp'nin nöroektoderm içinde otomatik olarak aktifleşmesini engeller. Daha sonra, Sog ve Tsg tarafından BMP proteinlerinin dorsal hareketliliğine bağlı olarak, *dpp* ekspresyonunun tek tip bir alanı içinde tepe BMP sinyali oluşur [131]. Amniyoserosa oluşumu ve dorsal kapanma için tepe BMP sinyalleri verilir.

Order	Species	Toll		BMP ligand		Sog		Tsg function	Tld function
		function	expression source	activity range	expression source	function in DV	asymmetry		
	<i>Drosophila melanogaster</i>	entire DV axis	Maternal	dorsal	zygotic	- and + (peak)	yes	Sog dependent anti- and pro-BMP	sog dependent
Diptera	<i>Musca domestica</i>	nd	nd	dorsal	zygotic	yes (+)	yes	nd	Restricted to dorsal-most cells
	<i>Clogmia albipunctata</i>	nd	nd	dorsal	nd	yes (+)	yes	nd	Dynamic expression
	<i>Tribolium castaneum</i>	entire DV axis	Zygotic	dorsal	zygotic	- and + (peak)	yes	sog independent pro-BMP	sog dependent
Coleoptera	<i>Nasonia vitripennis</i>	ventral only	nd	all DV	maternal	Sog absent		Pro-BMP	No DV function
	<i>Apis mellifera</i>	DV and AP	maternal in ventral (and in energids)	all DV (DV and AP)	maternal (dorsal and posterior)	Sog present, but not early		nd	nd
Hymenoptera	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	ventral polarizing only	nd	all DV	nd	ventral, polarized by Toll	yes	sog dependent anti-BMP	Essential for BMP
	<i>Rhodnius prolixus</i>	ventral	Maternal	all DV	maternal	nd	nd	nd	nd
	<i>Gryllus bimaculatus</i>	entire DV axis	Maternally polarized	dorsal	nd	Sog absent		nd	nd
Orthoptera									

Şekil 2.12: Farklı böcek takımlarının temsilcilerinde fonksiyonel analiz ile tanımlanan DV patern oluşum elemanları. Belirtilenler yalnızca Toll ve BMP yollarıyla ilgili öğelerdir. Sog, DV patern oluşumunda bir anti-BMP (-) veya bir pro-BMP (+; tepe sinyali için) işlevi uygulayabilir veya embriyonik DV patern oluşumu bağlamında BMP sinyallerini değiştirmek için hiçbir işlev sunmayabilir (Sog yoktur). 'nd': belirlenmemiş veya kesin olmayan kanıtı ifade eder. Böcek takımları arasındaki filogenetik ilişkiler solda sunulmuştur [132].

Benzer şekilde, Toll tüm DV eksenini kurarken, BMP'ler *Tribolium castaneum*'da [133] dorsal olarak kısıtlanmış bir işlev gerçekleştirir. Bununla birlikte, her iki yolun çoğu bileşeni zigotik olarak eksprese edilir ve doğru DV patern oluşumu, *Tribolium*'daki bu elementler arasındaki bir dizi zigotik geri besleme döngüsüne dayanır [77]. Daha da önemlisi, Toll, *Tribolium*'da *dpp* ifadesini kontrol etmez [77, 134]. Hymenoptera *Nasonia vitripennis*'te maternal Toll, ventral olarak kısıtlı bir rol sergilerken, neredeyse tüm embriyonun modellenmesi için BMP gereklidir. *N. vitripennis*'te *dpp*'nin, *Drosophila* ve *Tribolium*'dan farklı olarak anne tarafından anlatımı yapılır [135]. Toll ve BMP yolu genlerinin rolleri iki Hemiptera türünde de araştırılmıştır. *Oncopeltus fasciatus*'ta [136] ve *Rhodnius prolixus*'ta [137], Toll'un repress edilmesi embriyonun ventral elemanlarının kaybına neden olur. Tersine, *O. fasciatus*'ta *dpp* represyonu, ventral *twi* ve lateral *sog* gen ekspresyon bölgelerinin genişlemesi ile tamamen ventralize embriyolara yol açar [136]. *sog* ve *tsg* represyonu, ventral ve lateral gen ekspresyonunun kaybıyla birlikte ters fenotip ile sonuçlanırken, *tld* represyonun fenotipi *dpp* represyonuna benzer. Toll ve BMP *O. fasciatus* GRN'nin benzeri görülmemiş diğer iki yönü, *dpp*'nin *sog*

ifadesini engellemesi ve *sog* ifadesinin Toll'a bağılı olmayıp, Toll tarafından polarize edilmesidir.

Hemiptera ve Hymenoptera DV modelinde BMP proteinleri tarafından görüntülenen geniş fonksiyon, BMP'lerin tüm DV eksenini boyunca gen ekspresyonunu kontrol ettiğı omurgalı modeline daha çok benzemektedir. Bu nedenle, Toll'un böceklerde DV paterni için birlikte seçildiğı ve bazı dallarda daha fazla önem kazandığı hipotezini desteklerken, BMP işlevi kademeli olarak kısıtlanan atalardan kalma durumu temsil eder. Şaşırtıcı bir şekilde, yakın zamanda Toll'un *Gryllus* embriyosunun ventral yarısında doğrudan bir modelleme rolü olduğu da bildirilmiştir [138]. Bu organizmada, BMP aktivitesinin kaybı, amniyon ve dorsal ektoderm kaybına neden olduğu, ancak ventral mezoderm üzerinde hiçbir etkisi olmadığı, bu da BMP sinyalleme gereksiniminin embriyonun dorsal tarafı ile sınırlı olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca, Orthoptera'nın bu temsilcisinde BMP gradyan oluşumu için Toll sinyali gereklidir. Bu model, cırcır böcekleri ve sinekler arasındaki 390 milyon yıldan fazla evrimsel uzaklığa rağmen *Drosophila* ile büyük benzerlik göstermektedir [139]. Bu, böcek DV patern oluşumunda geniş bir Toll fonksiyonunun, yakınsak evrim nedeniyle böceklerde (*Gryllus* ve *Drosophila*'da) en az iki kez ortaya çıktığını göstermektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

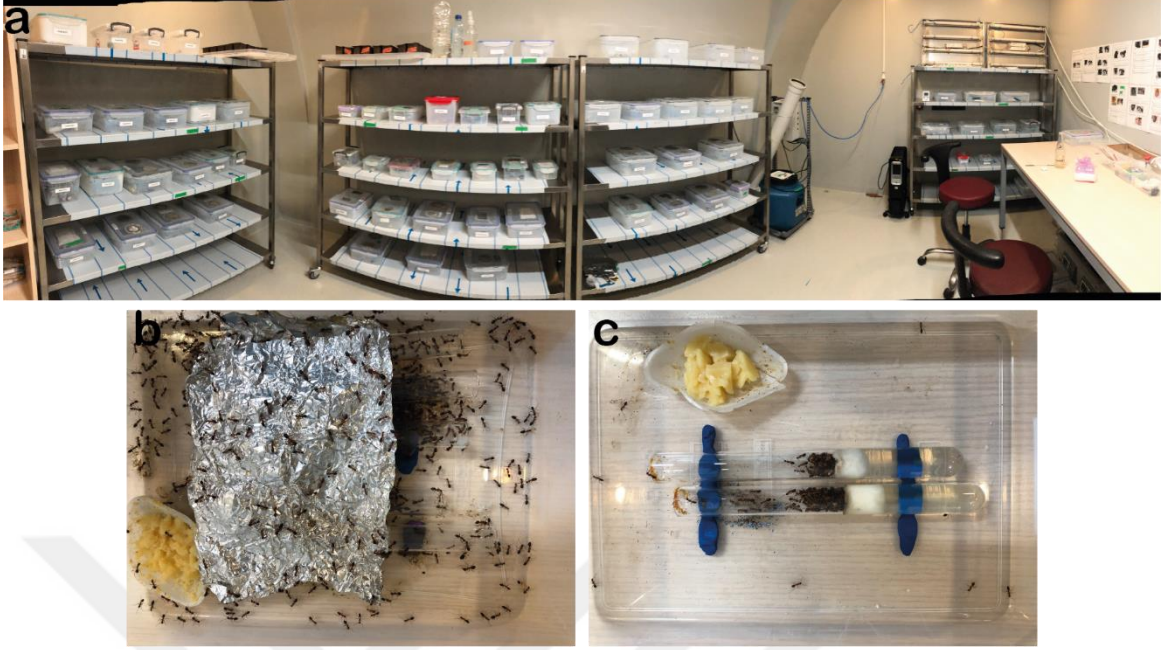
3.1. KARINCALARIN YETİŞTİRİLMESİ

Bu tez kapsamında, model organizma olarak *C. floridanus* karıncaları kullanıldı. Bu karıncaların kolonileri, laboratuvarında belirlenmiş protokollere göre modifikasyonlarla büyütüldü [140]. Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü Hayvan Laboratuvarlarında yetiştirilen on adet *C. floridanus* kolonisi (CFL00001, CFL00002, CFL00003, CFL00004, CFL00005, CFL00006, CFL00007, CFL00008, CFL00009, CFL000010) kullanıldı (Şekil 3.13 a).

Bir koloni düzeni (Şekil 3.1 b,c) kısaca kapaklarında 5 cm x 5 cm'lik bir havalandırma deliğine yapııştırılmış 200 mikron çapında metalik tel örgülü 6 ila 10 litre hacimli plastik kutulardan oluşur. Yaklaşık 18 mm x 65 mm ebadındaki cam test tüpleri bu plastik kutulara hacminin yarısı kadar su ilave edilerek ve pamuk ile tıkanarak yerleştirilir. Kutular 25°C, %70 bağıl nem ve 12 saatlik gündüz ve gece döngüsüne sahip karınca odasına yerleştirilir. Karıncalar *Tenebrio molitor* L. Coleoptera: Tenebrionidae) larvaları ile desteklenen Bhatkar Whitcomb diyeti [141] ile haftada iki kez beslenir. Bhatkar Withcomb diyeti tablo 3.1'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.1: Bhatkar Withcomb diyetinin hazırlanışı.

İçerik	Miktar
Agar	2 g
Bal	62 ml
Yumurta	2 adet
H ₂ O	500 ml



Şekil 3.1: Karıncaların yetiştirilmesi. Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü Hayvan Labaratuvarı'ndaki karınca odasının panoramik bir görünümü (a), karıncaların yetiştirildiği koloni kurulumları (b-c). b, CFL00009'u ve c, CFL00004'ü olmak üzere farklı boyutlarındaki kolonileri temsil etmektedir.

3.1.1. *C. floridanus* Kraliçe İzolasyonu

Kraliçelerin izolasyonu, bazı işçilerle birlikte yavrularını (embriyo, larva, pupa) çıkararak onları ayrı bir kutuya koymaktır. Temel olarak, farklı kolonilerden gelen her kraliçe, kendi kolonilerinden 5-10 işçi ile bölüm 3.1'de belirtildiği gibi aynı koloni kurulumlarına sahip ayrı birer kutuya yerleştirilir. İzolasyon süresi ve tarihi kutulara not edilir ve kraliçeler, gün içinde verilen yumurtaları toplamak için takip edilir. Tez kapsamında kullanılmak üzere yumurtaların kraliçeler tarafından verildiği tespit edildiğinde yumurtalar toplandı. Genellikle 0-1 günlük yumurtalar toplanarak mikroyenjeksiyonlar için kullanıldı veya bu yumurtalar daha sonra birkaç işçi ile birlikte ayrı tüplerde geliştirilerek *in situ* hibridizasyonlar için kullanıldı.

3.2. RNA İZOLASYONU VE CDNA SENTEZİ

3.2.1. RNA İzolasyonu

C. floridanus kolonilerinden farklı gelişim aşamalarına ait toplanan yumurtalardan RNA örnekleri izole edildi. Toplanan yumurtalar, TRI Reagent® (Sigma) içinde homojenize edildi. Ardından faz ayırma (kloroform ile), çöktürme (izopropanol ile), RNA yıkama (%75 etanol ile)

ve çözündürme (RNaz ve DNaz içermeyen su içinde) süreçleri takip edildi. Hazırlık aşaması olarak tezgahlar, pipetler, pipet ucu kutuları, %50 çamaşır suyu:etanol ile temizlendi. Santrifüj 4 °C'ye soğutuldu. İzopropanol ve %75 etanol sonraki adımlar için -20°C'de bekletildi.

Yumurtalar, 250 µL TRI Reagent® (on embriyo için 250 µL, embriyoların üzerine önce 10µL eklendi, ardından pipetle yukarı-aşağı hareketlerle yumurtalar parçalandı) içinde homojenize edildi ve vortekslendi. Daha sonra yumurtalar TRI Reagent® içerisinde, -150 °C'de 10 dakika süreyle 3 kez dondurulup çözündürüldü. Homojenat, nükleoprotein komplekslerinin tam ayrışmasına izin vermek için oda sıcaklığında 5 dakika saklandı. 1 ml TRI Reagent® için 0,2 ml kloroform ilave edildi ve 15 saniye boyunca homojen hale getirildi ve vortekslendi. Elde edilen karışım 2-15 dakika oda sıcaklığında saklandı ve 4 °C'de 30 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlendi. RNA, üst fazdan RNaz içermeyen bir tüpe toplandı. 125 ml soğuk izopropanol eklendi ve - 80 °C'de 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda, tamamen çözünene kadar bekletildi ve 4 °C'de 14.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, süpernatant uzaklaştırıldı ve RNA pelleti, %75 soğuk etanol ile vortekslenerek yıkandı ve ardından 4 °C'de 5 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüjlendi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Santrifüjlemeden sonra etanol uzaklaştırıldı ve gene özgü RNA pelleti 3-5 dakika steril kabin içerisinde kurutuldu. Çözünürlüğünü büyük ölçüde azaltacağından RNA pelletini tamamen kurutmaktan kaçınmak önemliydi. Son olarak pellet 30 µL RNaz içermeyen moleküler su ile çözündürüldü ve kullanılabilecek kadar -80 °C'de saklandı.

C. floridanus'a ek olarak daha sonra karşılaştırmalı analizlerde kullanılmak üzere aynı yöntemle, *C. aeugus*, *C. ligniperda*, *C. sanctus* ve kontrol grubu olarak *Lasius spp.*'den de RNA izolasyonları yapıldı.

3.2.2. cDNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA), ürün talimatlarına göre Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo, 200U/µL) kullanılarak *C. floridanus* embriyolarının izole edilmiş RNA'sından sentezlendi. Ayrıca, *C. aeugus*, *C. ligniperda*, *C. sanctus* ve kontrol grubu olarak *Lasius spp.* RNA 'ları da kullanılarak cDNA sentezlendi. Oluşturulan cDNA kütüphanesi kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı. cDNA sentez reaksiyonu ve reaksiyon koşulları tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: cDNA sentezi için revers transkriptaz reaksiyonu ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
5X Revers Transkriptaz Tamponu	5 µL	
Kalıp RNA	15 µL	
dNTP Karışımı (3µM)	2.5 µL	
RNAase out	1 µL	
Revers Transkriptaz	0.5 µL	
*Revers Primer Karışımı (10 µM)	1 µL	
Toplam Hacim	25 µL	
*Revers Primer Karışımı	1 µL RL070 Primeri (100 Mm), 1 µL Random RT Primer Karışımı (100 Mm)	

25 °C 10' } X3
50 °C 50'
8 °C ∞

3.3 MOLEKÜLER KLONLAMA

3.3.1. BMP sinyal yoluna ait gen dizilerin elde edilmesi ve primerlerin tasarlanması

BMP sinyal bileşenlerinin *D. melanogaster* (Diptera) ve *C.floridanus* (Hymenoptera) arasında korunup korunmadığını araştırmak için, Flybase Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak ilgili genlerin analizi yapıldı. *Drosophila* referans alınarak, *C.floridanus* genomunda araştırılan tüm BMP sinyal yoluna ait genler, *Nasonia vitripennis*, *Apis mellifera*, *Apis florea*, *Bombus terrestris*, *Acromyrmex echinator*, *Herpegnathos saltator*, *Linepithema humile* *Pogonomyrmex barbatus* türlerine ait BMP genleri ile Flybase BLAST üzerindeki karşılık gelen genomlarda protein BLAST ile hizalandı. Protein dizileri daha çok korunduğu için önce protein dizilerine göre hizalama yapıldı. Daha sonra en yüksek hizalamaya sahip Flybase BLAST sonucundan Genbank erişim numaraları kullanılarak, NCBI Genbank sayfasından ilgili genlere ait kodlama yapan bölgelerin dizileri elde edildi. Kodlama dizileri ile ayrıca Geneious Software [142] kullanılarak Clustal Omega temelli nükleotid hizalaması yapıldı. Varsayılan *C.floridanus* ortologlarının gerçekten de *D. melanogaster* ve hymenoptera içindeki organizmalarla en yakın akraba olduğunu doğrulamak için, Neighbor- joining metoduyla her filogenetik ağaç köklendi. Bu bağlamda *C.floridanus*'un en yakın dizisi,

ilgilenilen gen dizisi olarak tanımlandı. *C. floridanus* için belirlenen genlere ait NCBI erişim numaraları tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: *C.floridanus* BMP Genlerinin NCBI Erişim Numaraları.

Gen İsmi	NCBI Erişim Numarası
<i>Cfl-dpp</i>	XM_011259440
<i>Cfl-gbb</i>	XM_011254606
<i>Cfl-tld</i>	XM_025412842.1
<i>Cfl-tsg</i>	XM_011265006
<i>Cfl-sog</i>	XM_02002917
<i>Cfl-tnv</i>	XM_011271020
<i>Cfl-punt</i>	XM_025415360
<i>Cfl-babo</i>	XM_011265714.3
<i>Cfl-brinker</i>	XM_025413680.1
<i>Cfl-cactus</i>	XM_011260308.3
<i>Cfl-dorsal</i>	XM_025409733.1
<i>Cfl-sim</i>	XM_025409639.1
<i>Cfl-snail</i>	XM_011257450.3
<i>Cfl-spatzle</i>	XM_011257995.3
<i>Cfl-toll</i>	XM_011257311.3
<i>Cfl-twist</i>	XM_011258700.3
<i>Cfl-hnd</i>	XM_025408620.1
<i>Cfl-pnr</i>	XM_011266202.3
<i>Cfl-ind</i>	XM_011259520.3
<i>Cfl-msh</i>	XM_011252618.3
<i>Cfl-vnd</i>	XM_011258439.3
<i>Cfl-eng</i>	XM_011252307.3

*Sarı, bu tezde incelenen BMP sinyalleme ile ilgili genleri, mavi, DV pattern oluşumu ile ilgili genleri, yeşil, ekstraembriyonik doku ile ilgili genleri, kırmızı, nörojenik ektoderm ile ilgili genleri ve turuncu, segmentasyon ile ilgili genleri temsil etmektedir. Bu genler ayrıca BMP sinyalizasyonu ile ilişkili olup *C.floridanus*'taki spesifik dokular için belirteçler olarak araştırılacaktır.

Primerler, hizalama sonucunda elde edilen verilere dayanarak, dizilerin çoğunlukla farklı türler arasında korunan bölgelerinden tasarlandı. Primer tasarımı için Primer3 kullanıldı. Primerler 20-22 baz çifti uzunluğunda tasarlandı. pGEM-T (Promega) vektörü ile klonlama durumunda, forward primerlerin ucuna Sal I ve reverse primerlerin ucuna da Nco I kesim noktaları ilave edildi. *C. floridanus* BMP genlerini klonlamak için tasarlanan primerler tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Hedef genlerin amplifikasyonu için tasarlanan primerler.

Primer İsmi	Primer Dizisi
RL021_M13F	GTAAAACGACGGCCAGTG
RL022_M13R	GGAAACAGCTATGACCAT
RL023_T7	TAATACGACTCACTATAGGG
RL024_SP6	TACGATTTAGGTGACACTATAG
RL088BamCflzenF	TATGGATCCGATGTCTCGAAGCTTCTTAGTGGACTC
RL089SalCflZenR	GTAGTCGACTACACGATTCTCTCGACGGTGTGCTTC
RL090EcoCflTkvF	ATTTGAATTTCGATGCACGGCGAGGAGAAA
RL091SalCflTkvR	AGTGTCGACGTATACGTAAGTGTGTAATTATGATC
RL092CflTkvMutF	TATCGCGAAAGATTTAGCCATGTTCGACAGTGC
RL093CflTkvMutR	CATGGCTAAATCTTTCGCGATAGTCTGTTGC
RL111CflSogF	AGTGTCGACGGAACCTTCGTCGAGTCTAA
RL112CflSogR	AGCCATGGGGAGAGTTCCTCGTTGAAAA
RL113CflTldF	AGTGTCGACGAACGATGCGAATGGAGAAT
RL114CflTldR	AGCCATGGAAACGATGGGCTAGTGATGG
RL115CflTkv_XM020_F	CTCCATGGCTGGGCTCTCCGCTTCC
RL116CflTkvFJun	ATGCACGGCGAGGAGAAAACCTTTCTTTC
RL117CflTkvRJun	TATACGTAAGTGTGTAATTATGATCTAC
RL118CflTkvMutFJun	GACTATCGCGAAAGATTTAGCCATGTTCGACGTGCGTGGG
RL179CflTsgF	AGTGTCGACGAAGCTGGAGCGTATTATTCGT
RL180CflTsgR	AGCCATGGCCTCGTCTTGACCGTAATCG

Tablo 3.4 (devam):

RL193CflSogF2	AGTGTCGACGATCATCGCCAGAGTCCAAT
RL194CflSogR2	AGCCATGGCCTCGGTAAGGACCACGTAA
RL195CflPuntF	AGTGTCGACCAGTTTTGCTGCAGGTGGTA
RL196CflPuntR	AGCCATGGGCACTACGGTGCAATGAGAA
RL197CflDppF	AGTGTCGACAGTCGCTCAAGAAGCTCCAG
RL198CflDppR	AGCCATGGCGTGATTCGTCGAGTTGAGA
RL199CflGbbF	AGTGAGCTCGACTATCCGTCCGTCGAAAA
RL200CflGbbR	AGCCATGGCTGAAGAGCGCCATGTATCA
RL224CflEngrF	AGTGTCGACCAGGGAGGAGAACGGAAGAA
RL225CflEngrR	AGCCATGGGAGTGGTACCGTCGAGTGAT
RL239CflbaboF	AGTGTCGACGATCGGAAAGGGTCGCTTTG
RL240CflbaboR	AGCCATGGACACGACTTTCCGCATTTCC
RL241Cfl_Toll_F	AGTGTCGACGCGATTGCAACACTAAGAAC
RL242Cfl_Toll_R	AGCCATGGGATGCGGTAATGCGTATTTC
RL243Cfl_spatzle_F	AGTGTCGACAAGTCATCCTCACGCTTCCA
RL244Cfl_spatzle_R	AGCCATGGATGTTACCGTTGTTGCCAC
RL245Cfl_cactus_F	AGTGTCGACGGAACCCTGGCAGCTCTATT
RL246Cfl_cactus_R	AGCCATGGCGAATGCACTGTAGACGTCC
RL247Cfl_dorsal_F	AGTGTCGACGGTCAACAGCACACCAGAAA
RL248Cfl_dorsal_R	AGCCATGGCGTCCGATGGCCTTCTAAGT
RL249CflBrinker_F	AGTGTCGACTCAAGCCCTCGTGATTCTGT
RL250CflBrinker_R	AGCCATGGTCAGCGGCGAAAATCTTTGT
RL251Cfl_sim_F	AGTGTCGACCGGAATTTTCAGGAGCTAGCG
RL252Cfl_sim_R	AGCCATGGGATGCCCCGGAACATGAACAT
RL253Cfl_hnd_F	AGTGTCGACGCCGTATCCATGCAACATGT
RL254Cfl_hnd_R	AGCCATGGCTGCTCAGATCCAGAACAAACG
RL255Cfl_pnr_F	AGTGTCGACATCACTCCTTCCCCACTTCG

Tablo 3.4 (devam):

RL256Cfl_pnr_R	AGCCATGGGAGGTGGTGGTTTCGTGATC
RL257Cfl_ind_F	AGTGTCGACCAATTCACCGCCTTCGTACC
RL258Cfl_ind_R	AGCCATGGAGATTGATCGCTCGAGACGT
RL259Cfl_msh_F	AGTGTCGACGACACCTCCAAGATATCCCGA
RL260Cfl_msh_R	AGCCATGGTCTTCACCTGTGTCTCCGTG
RL261Cfl_vnd_F	AGTGTCGACCGATACCAAGCCGTACAAG
RL262Cfl_vnd_R	AGCCATGGGACATCGGAACCTGATTGCT
RL266Cfl_snail_F	AGTGTCGACCACAATGAGAGTTCCACGGC
RL267Cfl_snail_R	AGCCATGGCCCAGACTGACGTACACCTT
RL268Cfl_twist_F	AGTGTCGACGCGACTCATCTGATGGACCT
RL269Cfl_twist_R	AGCCATGGGTCGATGTACCTAGCGGCTA

Primerlerin adlandırılması şu şekildedir: RL-primer dizayn sırası-tür adı kısaltması-ilgili gen isminin kısaltması-F yada R (Forward için F, Reverse için R olacak şekilde yapılmıştır).

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İlgilenilen genler, PZR ile amplifiye edildi. *C. floridanus*'un sentezlenen cDNA'sı DNA şablonu olarak kullanıldı. Tablo 3.4'te gösterildiği gibi her bir gen için gene özel primerler kullanıldı. PZR reaksiyonu tablo 3.5'te gösterilmiştir. Reaksiyon, bir Thermal Cycler (BIO-RAD) kullanılarak tablo 3.5'te gösterildiği gibi belirli koşullar altında yapılmıştır. TOPO klonlamada gerekli olduğundan DNA'nın uçlarına A' çıkıntıları eklemek için Taq polimeraz kullandı. Bu nedenle PZR reaksiyonu için Horse-Power™ Taq DNA Polimeraz (Canvax Biotech) ve MyTaq™ Red Mix (Bioline) kullanıldı.

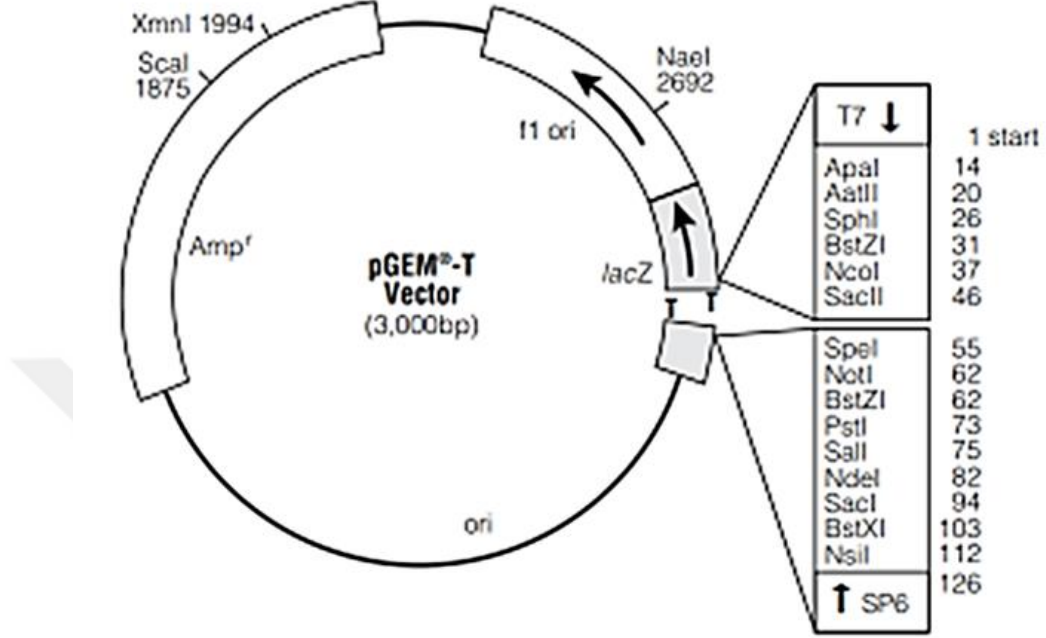
Tablo 3.5: PZR reaksiyonları ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar	Reaksiyon Koşulları
MyTaq™ Red Mix ile PZR Reaksiyonu		
cDNA Kalıbı (50 ng)	0,5	
MyTaq™ Red Mix	5µL	
5 µM Forward Primer	1µL	Pre Denatürasyon 95 °C 3’ Denatürasyon 95 °C 30’’ Bağlanma 55 °C 30’’ Uzama 72 °C 1’ Son Uzama 72 °C 5’ } X25
5 µM Revers Primer	1µL	
ddH ₂ O	2,5µL	
Toplam Hacim	10 µL	
Horse-Power™ Taq DNA Polimeraz İle PCR Reaksiyonu		
cDNA Kalıp (50 ng)	0,5	
10X PZR Tamponu	1µL	
3 µM dNTP karışımı	1µL	
MgCl ₂	1µL	
5 µM Forward Primer	1µL	Pre Denatürasyon 95 °C 3’ Denatürasyon 95 °C 30’’ Bağlanma 55 °C 30’’ Uzama 72 °C 1’ Son Uzama 72 °C 5’ } X25
5 µM Revers Primer	1µL	
Taq Polymeraz	0,2µL	
ddH ₂ O	4,3µL	
Toplam Hacim	10µL	

3.3.3. Restriksiyon Enzim Kesimi Temelli Klonlama

TOPO klonlama öncesinde ilgili genler pGEM-T (Şekil 3.2) vektörüne klonlanmaya başlandı. pGEM-T vektörü, NcoI-HF® (NEB) ve SalI-HF® (NEB) restriksiyon enzimleri kullanılarak doğrusallaştırıldı. Enzimlerle kesim reaksiyonu ve koşulları, tablo 3.6'da gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon ürünlerinin kontrolü, %0.5 agaroz jelde kontrol edildi.

Doğrusallaştırılan plazmit jelden kesildi ve Jel Ekstraksiyon Kiti (QIAGEN) ile saflaştırılarak geri kazanıldı.



Şekil 3.2: pGEM-T Vektör haritası. Restriksiyon enzimleri kesim noktaları sağda gösterilmiştir.

İlgili genin PZR ürünü, 5 kat daha yüksek hacimle tablo 3.5'te gösterildiği gibi PZR ile amplifiye edildi ve PZR Saflaştırma Kiti (QIAGEN) kullanılarak saflaştırıldı. Daha sonra PZR ürünü, pGEM-T plazmitine eklenecek yapışkan uçlar oluşturmak için NcoI-HF® ve SalI-HF® enzimleri ile kesildi. Enzim kesim reaksiyonu ve koşulları tablo 3.6'da gösterilmiştir. Kesilen PZR ürünü, PZR Saflaştırma Kiti kullanılarak saflaştırıldı.

Tablo 3.6: Enzim kesim reaksiyonu ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
PZR Ürünün Kesimi		
Saflaştırılmış PZR Ürünü (1 µg)	25 µL	37 °C- 3 saat
10X Cut Smart Tamponu	5 µL	*Enzimler 80 °C 'de 20 dakika inaktive edildi.
NcoI-HF®	1 µL	
SalI-HF®	1 µL	

Tablo 3.6 (devam):

ddH ₂ O	18 µL	
Toplam hacim	50 µL	
pGEM-T Plasmidinin Kesimi		
Plasmit (1 µg)	5 µL	
10X Cut Smart Tamponu	5 µL	37 °C- 3 saat
NcoI-HF®	1 µL	*Enzimler 80 °C 'de 20 dakika inaktive edildi.
SalI-HF®	1 µL	
ddH ₂ O	38 µL	
Total volume	50 µL	

Tablo 3.7: Ligasyon reaksiyonu ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
Digested pGEM-T plasmid (30ng)	3,6 µL	
Digested PZR Products (270 ng)	4,4 µL	
T4 DNA Ligase Buffer	1 µL	$\left. \begin{array}{l} 8\text{ }^{\circ}\text{C } 2\text{ h} \\ 16\text{ }^{\circ}\text{C } 2\text{ h} \end{array} \right\} \times 3$
T4 DNA Ligase	1 µL	
Total volume	10 ul	

Kesilmiş-saflaştırılmış plazmit ve PZR ürünü, ligasyon reaksiyonu için bir araya getirildi. Ligasyon reaksiyonu ve koşulları tablo 3.7'de gösterilmiştir. Ertesi gün, 1 µL ligasyon reaksiyonu ve 25 µL elektrokompetan DH5α *Escherichia coli* hücreleri, buz üzerinde 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpüne yerleştirildi ve daha sonra elektrotransformasyon küvetine aktarıldı. Transformasyon, GenePulser Xcell (BIO-RAD) kullanılarak yapıldı. Transformasyon, 3000 V voltaj, 25 uF kapasitans, 200 Ω direnç koşullarında gerçekleştirildi. Transformasyonun hemen ardından transformant hücrelere 1 ml LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri ilave edildi ve 180 rpm 37°C çalkalayıcıda inkübe edildi. 1 saat sonra, transformant hücreler ampisilin seçici LB agar plakalarına yayıldı ve etüvde 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Klonlanan genler RNA prob

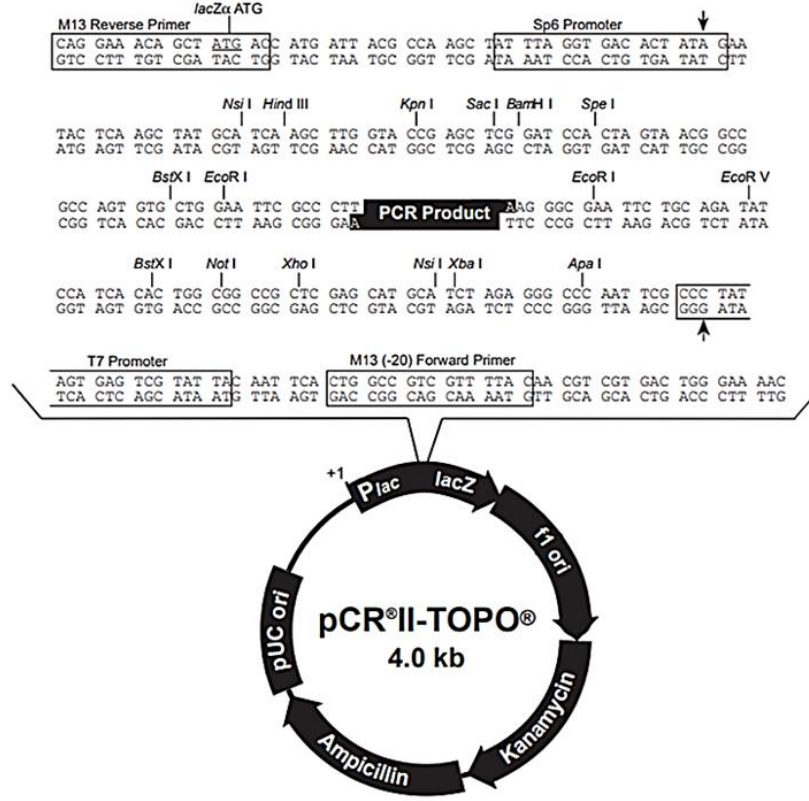
sentezi ve dsRNA sentezinde kullanıldı. LB agar ve sıvı besiyerinin hazırlanması tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.8: LB Agar ve sıvı besiyeri hazırlanışı.

İçerik	Miktar
LB Agar	
H₂O	1 L'ye kadar
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Maya Özütü	5 g
Agar	20 g
LB Sıvı Besiyeri	
H₂O	1 L'ye kadar
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Maya Özütü	5 g
*Karışımlar 20 dakika, 15 psi'de otoklavlanır. Antibiyotikler besi yerleri 55 °C'ye soğuduğunda ilave edilir.	

3.3.4. TOPO Klonlama

İlgili genler ayrıca TOPO TA Klonlama Kiti (Invitrogen) kullanılarak PZR II TOPO vektörüne de (Şekil 3.3) klonlandı. Kitte bir tuz çözeltisi, saf su, ligasyon reaksiyonu için PZR II TOPO vektörü ve transformasyon için Mach1™ T1 Faj Dirençli Kimyasal Olarak Yetkin *E. coli* (Invitrogen) hücreler bulunmaktadır. Kit, ligasyon ve transformasyonun aynı gün içinde yapılmasını mümkün kılar.



Şekil 3.3: PCR II-TOPO vektör haritası. Restriksiyon enzimleri kesim noktaları, PZR ürününün yerleşeceği alan gösterilmiştir.

Tablo 3.9: TOPO klonlama için ligasyon reaksiyonu.

İçerik	Miktar
PZR Ürünü	1.5 µL
PCR II TOPO Vektör	0.5 µL
Tuz Çözeltilisi	0.5 µL
ddH ₂ O	0.5 µL
Total Hacim	3 µL

Ligasyon reaksiyonu, tablo 3.9'da gösterildiği gibi gerçekleştirildi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Bundan sonra reaksiyon, Mach1™ T1 Faj Dirençli Kimyasal Olarak Yetkin *E.coli* hücrelerinin bulunduğu tüpe eklendi ve 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Daha sonra her transformasyon tüpü 42°C su banyosuna 30 saniye yerleştirilerek ısı şoku uygulandı ve hemen ardından kit içerisinde kullanıma hazır olan 250 µL Super Optimal Broth (SOC) (Invitrogen)

besiyeri eklendi. Daha fazla kullanım için, SOC besiyeri yüksek hacimde hazırlandı ve hazırlanışı tablo 3.10'da gösterilmektedir. (Not*: Solüsyon geri kalan bileşenlerle otoklavlandıktan ve soğumaya bırakıldıktan sonra Glikoz eklendi. SOC ortamı 0,2 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.). Tüpler çalkalayıcıda 180 rpm'de inkübe edildi. 1 saat sonra transformant hücreler, kanamisin(Mutlicell) veya ampisilin(Multicell) seçici LB agar plakaları üzerine yayıldı. Plakalar gece boyunca 37°C etüvde (Thermo) inkübe edildi. PZR II TOPO vektörleri hem kanamisin hem de ampisiline dirençli genlere sahip olduğundan, plazmit seçimi için her iki antibiyotik de kullanılabilirdi. Klonlanan genler RNA prob sentezi ve dsRNA sentezinde kullanıldı.

Tablo 3.10: SOC besiyerinin hazırlanışı.

İçerik	Miktar
Maya Özü	%0,5
Trypton	%2
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glikoz*	20 mM
*Karışım 20 dakika, 15 psi'de otoklavlanır.	

3.3.5. Koloni PZR

Transformasyon sonucunda seçici antibiyotik içeren LB agar üzerinde üreyen koloniler, koloni PZR ile kontrol edildi. Başlıca, 10 µL'lik bir pipet ucu bir koloniye dokunduruldu ve 3 µL moleküler su içinde 0.2 ml'lik bir PZR tüpünde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Pipet ucu uzaklaştırıldıktan sonra reaksiyon reaktiflerinin geri kalanı PZR tüpüne eklendi. Koloni PZR reaksiyonu tablo 3.11'de gösterilmiştir. Koloni PZR reaksiyonu için MyTaq™ Red Mix kullanıldı. Genler M13F ve M13R primer bağlanma bölgeleri arasına yerleştikten, PZR reaksiyonu için M13F ve M13R evrensel primerleri kullanıldı. %1'lik agaroz jelde kontrol edilip doğru bant veren koloniler 15 ml'lik santrifüj tüpünde 5 ml LB sıvı besiyerine 5 µL antibiyotik ilave edilerek hazırlanan tüplerde gece boyunca inkübe edildi.

Tablo 3.11: Koloni PZR reaksiyonu ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
MyTaq™ Red Mix	5	
5 µM M13 Forward Primer	1	Pre Denatürasyon 95 °C 3' Denatürasyon 95 °C 30'' Bağlanma 55 °C 30'' Uzama 72 °C 1' Son Uzama 72 °C 5'
5 µM M13 Revers Primer	1	
ddH ₂ O	3	
Toplam Hacim	10	

3.3.6. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu, bir Plasmid Miniprepkit (Thermo) kullanılarak yapıldı. İzolasyon, kitin talimatlarına göre küçük değişikliklerle yapıldı. Gece boyunca çalkalanan sıvı kültürler, 4 °C'de 4000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatantlar tüplerden uzaklaştırıldı ve 250 µL Resüspansiyon tamponu eklendi ve hücre peletleri çözüldü. Karışım, 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Ardından 250 µL Lizis tamponu eklendi ve tüpler 4-6 kez alt üst edildi. 2 dakikalık inkübasyondan sonra 350 µL Nötralizasyon tamponu eklendi, tüpler 4-6 kez alt üst edildi ve karışım oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatantlar kitin dahilinde bulunan kolonlara aktarıldı ve 1 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Alt tüpte toplanan sıvı atıldıktan sonra 500 µL Yıkama tamponu eklendi, 2 dakika oda sıcaklığında beklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Bu adım iki kez tekrarlandı ve daha sonra tamponun geri kalanını kolondan uzaklaştırmak için boş kolonlar tekrar santrifüjlendi. Son olarak kolonlar bir santrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolonlara 35 µL Elüsyon tamponu eklendi, 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Daha sonra kolonlar atıldı ve tüpte toplanan plazmit konsantrasyonları bir spektrofotometre ile ölçüldü.

3.3.7. Plazmitlerin Doğrulanması

BMP sinyal yolağına ait genlerin klonlandığı plazmitler, genlerin doğru bir şekilde girip girmediğini doğrulamak amacıyla dizilendi. Dizleme, M13F ve M13R primerleri ile çift yönlü olarak yapıldı. Kısaca, 10 µL plazmit (100 ng/µL), 10 µL M13F (3.2 µM) ve M13R (3.2µM) primerleri 0.2 ml PZR tüplerine ayrı ayrı yerleştirildi. Plazmitlerin dizi analizi için McLAB firmasından hizmet alımı yapıldı.

3.4. *İn Situ* HİBRİDİZASYON (ISH)

3.4.1. Embriyo fiksasyonu

İzolasyon kutularından taze bırakılan yumurtalar veya daha önce toplanmış ve geliştirilmiş yumurtalar telden yapılmış bir sepet içinde su ile toplandı. Daha sonra Fiksasyon Solüsyonu I (20 ml Phosphate-Buffered Saline (PBS) + %10 100 µL Triton [son konsantrasyon, %0.05 olmalıdır]) mikrodalga fırında 30 saniye kaynatıldı ve embriyo sepeti kaynamakta olan fiksasyon solüsyonu içine yerleştirildi. Forseps yardımı ile sepet, solüsyon içerisinde 30 saniye bekletildi. Daha sonra embriyo sepeti 4°C'ye soğutulmuş 1X PBS'ye yerleştirildi. Embriyolar sepetten boya fırçası ile alındı ve 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpündeki Fiksasyon Solüsyonu II (500 µL heptan (Merck) + 400 µL PEM + 60 µL formaldehit (Sigma)) içerisine yerleştirildi ve çalkalayıcıda 25 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra fiksatif solüsyon uzaklaştırıldı ve 1 ml 4°C'ye soğutulmuş su ilave edilerek ters yüz edilen tüp içerisinde 15-30 saniye embriyolar bekletildi. Daha sonra su uzaklaştırılıp ve 4°C'ye soğutulmuş 1 ml metanol eklendi. Sabitlenen embriyolar, soyulmaya (vitellin membranın çıkarılması) kadar -20°C'de metanol içinde tutuldu veya *in situ* hibridizasyon için metanol içinde %2'lik su agar plakasında soyuldu. 10 X PBS ve PEM'in hazırlanması sırasıyla tablo 3.12 ve 3.13'te gösterilmiştir.

Tablo 3.12: 10X PBS hazırlanışı.

İçerik	Miktar
NaCl	80 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
H ₂ O	1 L'ye kadar
*Karışım 20 dakika 15 psi'de otoklavlanır.	

Tablo 3.13: PEM hazırlanışı.

İçerik	Miktar
PIPES (10M)	100 mM
EGTA	1 mM
MgSO ₄	1 mM
*Karışım 20 dakika 15 psi'de otoklavlanır.	

3.4.2. RNA Problarının Sentezi

BMP genlerinin klonlandığı plazmitler, RNA problemlerinin sentezi için gerekli olan PZR ürünlerini elde etmede kullanıldı. T7 ve SP6 RNA Polimeraz bağlama dizileri de dahil olmak üzere istenen gen dizilerini çoğaltmak için M13F ve M13R primerleri kullanıldı. PZR reaksiyonu, tablo 3.14'te gösterildiği gibi gerçekleştirildi. PZR ürünleri, PZR Saflaştırma Kiti (QIAGEN) kullanılarak saflaştırıldı ve prob sentezi için kullanıldı. Genlerin oryantasyonuna bağlı olarak, BMP gen dizilerinin antisens ipliklerini sentezlemek için T7 RNA Polimeraz (Thermo) veya SP6 RNA Polimeraz (Thermo) kullanıldı. RNA problemlerinin işaretlenmesinde DIG RNA Labeling Mix (Roche) veya Biotin RNA Labeling Mix (Roche) kullanıldı. Alkalın fosfataz ikincil antikor anti-DIG-AP (Roche), DIG etiketli problemleri saptamakta ve streptavidin-AP (Roche) reaktifi biotin etiketli problemleri saptamakta kullanıldı. *In vitro* transkripsiyonu, tablo 3.15'te gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon yapıldıktan sonra kalan DNA'yı uzaklaştırmak için 1 µL DNAaz eklenmiş ve Thermocycler'da 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

Tablo 3.14: RNA probleminin sentezi için PZR reaksiyonu ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
Kalıp plasmid DNA (2ng/10µL)	5	
MyTaq™ Red Mix	25	
5 µM M13 Forward Primer	5	Pre Denatürasyon 95 °C 3' Denatürasyon 95 °C 30'' Bağlanma 55 °C 30'' Uzama 72 °C 1' Son Uzama 72 °C 5'
5 µM M13 Revers Primer	5	
ddH ₂ O	10	
Total Hacim	50	

Tablo 3.15: *In vitro* RNA prob sentezi ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
5x Transkripsiyon Tamponu	4	
Kalıp DNA ~500 ng		
DIG/Biotin Labelling Mix	2	
Sp6 or T7 RNA Polimeraz	2	37 °C – 4 saat
RNAse out	1	
ddH ₂ O	20'kadar	
Toplam Hacim	20	

3.4.3. RNA Probleminin Saflaştırılması

Sentezlenen RNA problemleri fenol:kloroform:izoamil alkol (Merck) kullanılarak saflaştırıldı. Hazırlık aşaması olarak tezgahlar, pipetler, pipet ucu kutuları %50 çamaşır suyu:etanol ile temizlendi. Santrifüj 4 °C'ye soğutuldu. İzopropanol ve %75 etanol sonraki adımlar için - 20 °C'de bekletildi. 5 µL reaksiyon, çamaşır suyu (1/1000) eklenerek hazırlanan %0.5 agaroz jelde kontrol edilmek üzere kullanıldı.

Hacmi arttırmak için önce 260 µL RNAaz içermeyen su eklendi. Daha sonra, RNA'yı bağlamak ve çöktirmek için 30 µL RNAaz içermeyen Na-Asetat ve 10 µL torula maya çözeltisi (su içinde 10 mg/ml) ilave edildi. Daha sonra faz ayrımı için 500 µL fenol:kloroform:izoamil alkol

solüsyonu eklendi. Nihai karışım 1 dakika vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz yeni bir RNAaz içermeyen tüpe aktarıldı ve saflığını arttırmak için 500 µL kloroform eklenerek bir kez daha faz ayrımı yapıldı. Nihai karışım 1 dakika vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz yeni bir RNAaz içermeyen tüpe aktarıldı ve RNA problemlerini çöktürmek için 250 µL izopropanol eklendi ve -80 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra karışım çözülür ve 4 °C'de 30 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml etanol eklenerek RNA pelletini yıkamak için 14.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüjlendi. Bu adım iki kez tekrarlandı. Etanol süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra, RNA pelleti çok fazla kurumasına müsaade etmeden 5-10 dakika steril kabin altında bekletilerek kurutuldu. Son olarak, RNA prob pelleti Hibridizasyon Tamponu (HYB) ile yeniden süspanse edildi.

3.4.4. Prob Hibridizasyonu

In situ hibridizasyonun tüm adımları toplamda üç gün sürmektedir İlk gün yumurtaların rehidrasyonu, post-fiksasyonu ve prob hibridizasyonu adımlarını içerir. Embriyoların rehidrasyonu için, sabitlenmiş ve vitellin zarı uzaklaştırılmış yumurtalar adım adım metanolden 1X PBTW/Metanol'e (1/1) ve ardından 1X PBTW 'e (20 ml 1X PBS + 50 µL %20 Tween20) aktararak 5 dakika PBSTW ile yıkandı. Daha sonra Proteinaz K-PBSTW solüsyonu (her 100 µL PBSTW için 1 µL) ile 2 dakika muamele edildi ve glisin solüsyonuna (PBSTW içerisinde 2 mg/ml) transfer edilerek 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra PBSTW ile 5 dakika yıkandı. Fiksasyon sonrası adım için yumurtalar %5 formaldehit solüsyonuna (67.5 µL formaldehit (%37 formaldehitten yapılmıştır), 4315 µL PBSTW içinde) aktarıldı ve çalkalayıcı üzerinde 25 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra formaldehit solüsyonu çeker ocak altında uzaklaştırıldı ve 3 kez PBSTW ile yumurtalar yıkandı. Yumurtalar, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde iki kez 5'er dakika PBSTW ile yıkandı. Prob hibridizasyon aşaması için, PBSTW uzaklaştırıldıktan sonra PBSTW/HYB (1/1) solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra sadece HYB ile 2 dakika yıkanarak ve 56 °C'de su banyosunda (Thermo) 1 saat HYB tamponunda ön hibridize edildi. Problemler, ısıtıcı blok (Thermo) üzerinde 80°C'de HYB içinde 0.5-1 ng/ul konsantrasyonunda ısıtıldı ve yumurtalar, su banyosunda 56°C'de gene özgü problemlerle gece boyunca hibridize edildi. HYB'ın hazırlanması tablo 3.16'da gösterilmiştir.

Tablo 3.16: HYB tamponunun hazırlanışı.

İçerik	Miktar
Formamid	%50
SSC	5X
Torula Maya RNA	5 mg/ml
Heparin	50 µg/ml
Tween 20	%0.1
20X SSC Stok	
NaCl (3M)	175.3 g
Trisodyum Sitrat (300 mM)	88.2 g
dH ₂ O	1 L'ye kadar

İkinci gün, hibridizasyon tamponu su banyosunda 20 dakika boyunca 56°C'ye ısıtıldı. Daha sonra problemler yumurtaların bulunduğu tüplerden alınarak yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı ve -80 °C'de daha sonraki kullanımlar için saklandı. Isıtılmış HYB tamponu yumurtalara ilave edildi ve embriyolar 56°C'de HYB içerisinde post-hibridize edildi. 30 dakika sonra HYB Tamponu uzaklaştırıldı ve yumurtalar, çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında PBSTW/HYB (1/1) ile 30 dakika yıkandı. Daha sonra embriyolar 3 kez PBSTW ile hızlıca yıkanarak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 30 dakika PBSTW ile yıkandı. PBSTW ile bu yıkama adımı 4 kez tekrarlandı. Daha sonra yumurtalar bloklama için PBSTW'de %5 keçi serumu (Molecular Biology Labs) içinde çalkalanarak 30 dakika inkübe edildi. Antikor çözeltileri (1:1000), sonraki adım için PBSTW içindeki %5 keçi serumunda da hazırlandı. Alkalın fosfataz ikincil antikor anti-DIG-AP (Roche), DIG etiketli problemleri saptamak için kullanıldı ve streptavidin-AP (Roche) Biotin etiketli problemleri saptamak için kullanıldı. Bloke edildikten sonra yumurtalar, çalkalanarak oda sıcaklığında 2 saat antikor solüsyonu ile inkübe edildi. Daha sonra yumurtalar üç kez PBSTW ile durulandı ve çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında dört kez 20 dakika PBSTW ile yıkandı. Embriyolar ertesi güne kadar PBSTW'de 4 °C'de tutuldu.

Üçüncü gün, yumurtalar boyama solüsyonuyla muamele edilir. İlk olarak yumurtalar 100 mM Tris-Cl (pH 9.5) içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika çalkalanarak inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığında iki kez Alkalın Fosfataz (AP) Tamponu ile de 5 dakika çalkalanarak yıkandı.

AP Tamponunun hazırlanması tablo 3.17'de gösterilmiştir. NBT/BCIP (Roche) solüsyonu (500 µl/örnek) (1 ml AP Tamponunda 7 µL NBT ve 7 µL BCIP) AP tamponu içerisine eklenerek hazırlandı ve yumurtalar cam bir plaka üstünde karanlıkta 400 µl NBT/BCIP solüsyonu ile inkübe edildi. Embriyolardaki reklenmeleri görmek için embriyolar her 15 dakikada bir kontrol edildi. Embriyolar 15 dakika ile 8 saat arasında boyandı (Probun kalitesine göre bu süre değişiklik gösterdi.). Yumurtalarda net bir boyama paterni görüldükten sonra tekrar tüpe alınarak, oda sıcaklığında PBSTW ile 5 dakika yıkanarak boyama durduruldu. Daha sonra yumurtalar oda sıcaklığında 5 dakika PBSTW/Etanol (1/1), ardından 10 dakika etanol ile çalkalanarak yıkandı. Yumurtalar tekrar PBSTW/Etanol (1/1) ile hızlıca yıkanıp ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında üç kez PBSTW ile 5 dakika yıkandı. Bu arada 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche) boyama solüsyonu PBSTW (1/2000) içinde hazırlandı. PBSTW uzaklaştırıldığında, DAPI solüsyonu eklendi ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Daha sonra yumurtalar sırasıyla %25 gliserol/PBS, %50 gliserol/PBS ve %75 gliserol/PBS içine yerleştirildi. Problemlerle muamele edilerek ilgili gene dair boyama gösteren yumurtalar, mikroskopi aşamasına kadar 4 °C'de saklandı. Aynı gün içinde konfokal (Leica) veya DIC (Leica) mikroskopları kullanılarak görüntülenmesi durumunda preparatlar hazırlandı.

Tablo 3.17: AP tamponu hazırlanışı.

İçerik	Miktar (µL)
NaCl (1M)	1000
Mgcl ₂ (2M)	250
Tris pH= 9.5 (1M)	1000
Tween 20 (20%)	50
dH ₂ O	7700

3.5. RNA INTERFERANS (RNAI)

3.5.1. dsRNA sentezi

BMP genlerinin klonlandığı plazmitler, çift sarmallı RNA'ların (dsRNA'lar) sentezi için gerekli olan PZR ürünlerini elde etmede kullanıldı. T7 ve SP6 RNA Polimeraz bağlama dizileri dahil olmak üzere istenen gen dizilerini çoğaltmak amacıyla M13F ve M3R primerleri ile PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. PZR protokolü ve koşulları tablo 3.18'de gösterilmiştir. PZR

ürünleri, PZR Saflaştırma Kiti (Qiagen) kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılmış PZR şablonları, ürünün talimatlarına göre T7 ve Sp6 RNA polimerazı (Thermo) kullanılarak dsRNA oluşturmak için kullanıldı. *In vitro* transkripsiyon reaksiyonu ve koşulları, tablo 3.19'da gösterildiği gibidir.

Tablo 3.18: dsRNA sentezi için PZR reaksiyonu ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
Kalıp plasmid DNA (2 ng/10 µL)	5	
MyTaq™ Red Mix	25	
5 µM M13 Forward Primer	5	Pre Denatürasyon 95 °C 3' Denatürasyon 95 °C 30'' Bağlanma 55 °C 30'' Uzama 72 °C 1' Son Uzama 72 °C 5'
5 µM M13 Revers Primer	5	
dH ₂ O	10	

Tablo 3.19: *In vitro* dsRNA transkripsiyon reaksiyonu ve koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)	Reaksiyon Koşulları
5x Transkripsiyon Tamponu	20	
Kalıp DNA ~1µg		
10 mm NTP Karışımı	10	
Sp6 RNA Polimeraz	4	37 °C – gece boyu
T7 RNA Polimeraz	4	
RNAse out	1	
dH ₂ O	100'e kadar	

3.5.2. dsRNA'ların saflaştırılması

dsRNA örnekleri, TRI Reagent® kullanılarak saflaştırıldı, ardından faz ayırma (kloroform ile), çöktürme (izopropanol ile), RNA yıkama (%75 etanol ile) ve çözündürme (RNAaz ve DNAaz içermeyen suda) işlemleri uygulandı. Hazırlık aşaması olarak tezgahlar, pipetler, pipet ucu kutuları %50 çamaşır suyu:etanol ile temizlendi. Santrifüj 4 °C'ye soğutuldu. İzopropanol ve %75 etanol sonraki adımlar için -20 C'ye kondu.

Hacmi arttırmak için 99 µL dsRNA reaksiyonuna 200 µL RNAaz içermeyen su ilave edildi. Ardından 100 µl TRI Reagent® ve 10 µL proteinaz K eklenerek oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dakika inkübasyondan sonra üzerine 200 µL kloroform eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı. Karışım 12.000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüjlendi. Üsteki faz yeni tüpe alınarak ve 500 µL izopropanol eklendi. Tüp 5-6 kez alt üst edildi ve 80 °C'de 10 dakika saklandı. Daha sonra karışım çözülerek ve 12.000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden sonra, süpernatant uzaklaştırıldı ve RNA pelleti, %75 4 °C soğuk etanol ile vortekslenerek yıkandı ve ardından 4 °C'de 5 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüjlendi. 1 ml %75 etanol eklendi ve 4 °C'de 5 dakika 14.000 rpm santrifüjlendi. Santrifüjden sonra etanol uzaklaştırıldı ve RNA pelleti 3-5 dakika süreyle steril kabin altında kurutuldu. Çözünürlüğünü büyük ölçüde azaltacağından RNA peletini tamamen kurutmaktan kaçınıldı. Son olarak pellet 20 µL RNAaz içermeyen moleküler su ile süspanse edildi ve kullanılabilecek kadar -80 °C'de saklandı.

3.5.3. dsRNA'nın yumurtalara mikroenjeksiyonu

Yeni verilmiş yumurtalar, birkaç işçi ile izole edilmiş kraliçelerden toplandı. Koloni veya enjeksiyon günü ile ilgili etkileri ortadan kaldırmak için, birden fazla kraliçeden embriyolar toplandı ve aynı gün enjekte edildi. Yumurtalar, ince bir %2 sulu agar tabakası ile kaplanmış ve 10 µl 10 µg/ml ampicilin yayılmış bir petri kabı kapağı üzerinde ince bir cam kılcalın yanında sıralanmıştır. Enjeksiyon iğneleri, 'micropipette capillary puller' kullanılarak hazırlandı. Mikroenjeksiyonlar, aşağıdaki ayarlar kullanılarak Narischage mikroenjeksiyon cihazı ile yapıldı: kontrol basıncı 5 psi, enjeksiyon basıncı 21 ps ve enjeksiyon süresi 0.1 s. İğne ucu, halokarbon yağına batırılmış bir cam lamel üzerine hafifçe itilerek kırılarak açıldı. İğne kırıldıktan sonra enjeksiyon hacmi ayarlandı. Enjeksiyon hacimleri 0,5 ile 1 nl arasındaydı. Enejkete edilen yumurtalar, oda sıcaklığında cam tüplerde işçilerle geliştirildi. İşçiler haftada iki kez beslendi. Yumurtalar 10-15 gün sonra toplandı ve bölüm 3.4.1'de gösterildiği gibi sabitlendi. Vitellin zarın uzaklaştırılması ve mikroskopik görüntülemeye kadar metanol içinde - 20 °C'de saklandı.

Görüntülemeleri gerektiğinde, embriyoların vitellin zarları, metanol içinde tungsten iğneler kullanılarak %2'lik sulu agar plakaları üzerinde uzaklaştırıldı. 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne konuldu, metanol uzaklaştırıldı ve çalkalayıcı üzerinde 5 dakika oda sıcaklığında PBSTW ile yıkandı. PBSTW yıkamasından sonra uzaklaştırılarak, DAPI çözeltisi (PBSTW içinde 1:1000) ilave edildi ve nükleuslar, çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca boyandı.

Tüp alüminyum folyo ile kaplandı ve yumurtalar daha sonraki aşamalar için karanlıkta tutuldu. DAPI solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yumurtalar sırasıyla %25 gliserol/PBS, %50 gliserol/PBS ve %75 gliserol/PBS içine yerleştirildi. Daha sonra mikroskopi görüntüleme için kullandı.

3.6. SPEKTROFOTOMETRİK VE ELEKTROFORETİK ANALİZ

Amplifiye edilmiş ve saflaştırılmış PZR ürünleri, plazmitler ve dsRNA'ların miktar ve saflık kontrolleri spektrofotometrede ("Nanodrop 8000", Thermo Scientific) 260 ve 280 nm'de ölçülmüştür. Önce 2 µL ddH₂O, ardından "blank" olarak elüsyon tamponu veya su ve son olarak örneklerden alınan DNA veya RNA cihazda okunarak konsantrasyonları ng/µL cinsinden ölçüldü.

PZR ürünleri, 1X Tris Buffer EDTA (TBE) ile hazırlanan %1'lik, RNA ürünleri ise %0.5'lik agaroz jelde kontrol edildi. Gerekli miktarda agaroz ve 1X TBE karıştırılarak mikrodalga fırında agaroz TBE tamponunda tamamen eriyene kadar kaynatıldı. dsRNA'nın kontrol edilmesi gerektiğinde agaroz jel solüsyonuna %0.1 çamaşır suyu da eklendi. 50-55°C'ye soğutulduktan sonra 0,5 µg/mL konsantrasyonda Ethidium bromür (10 mg/mL, Sigma) eklenerek ve jel karışımı yatay olarak elektroforez kasetine dökülerek 15-20 dakika jel polimerize oluncaya kadar beklendi. Daha sonra jel, 1X TBE tamponu içeren bir elektroforez tankına yerleştirildi ve her 5 µL örnek, 1 µL 6X yükleme boyası (NEB) ile karıştırılarak jele yüklendi. DNA Ladder (Biotek, 100-10.000 bç), standart bir DNA olarak birinci kuyucuğa yüklendi. Agaroz jel üzerine yüklenen örnekleri, 120 V ve 400 A'da 25 dakika yürütüldü. Jel, jel dokümantasyon sistemi (Biorad) kullanılarak 302 nm ultraviyole ışığı altında görüntülendi. TBE tamponu 5X konsantrasyon olarak hazırlandı ve hazırlanışı tablo 3.20'de gösterildi.

Tablo 3.20: 5X TBE tamponu hazırlanışı.

İçerik	Miktar
Trizma baz	54.8 g
Borik Asit	24.5 g
EDTA (0.5 M)	20 ml
H ₂ O	1L'ye kadar

3.7 MİKROSKOPİ

3.7.1. Yüksek İşlem Hacimli Cytation 5 ile Eş Zamanlı Görüntüleme

C. floridanus yumurtalarının görüntüleri daha önce ışık ve floresan mikroskopları ile çekilmişti. (yayınlanmamış veriler). Embriyonik gelişimi hakkında bilgimizi artırmak ve her aşamanın gelişim süresini belirlemek için, Cy5 (628.685), DAPI (377.447), GFP (469.525), RFP (531.593), Bright Field, Phase Contrast ve Renkli Parlak Alan Filtresi küpleri ve 4X PL ACH, 4X PL FL Aşaması, 10X PL FL Aşaması, 20X PL FL Aşaması, 40X PL FL Aşaması, 60X PL FL objektifleri içeren çok modlu plaka okuyucu Cytation™ 5 (Biotek, Winooski, VT) kullanılarak, kraliçe tarafından yeni verilmiş yumurtalar toplanarak 14 gün süreyle canlı olarak görüntülendi.

Yumurtalar izolasyon kutularından toplamadan önce, 96 oyuklu bir hücre kültürü plakasının oyuklarının dibine heptan tutkalı (gece boyunca çift taraflı yapışkan bantla infüze edilen heptan) uygulandı ve kurumaya bırakıldı. Taze bırakılan yumurtalar toplandı ve plakanın tutkalla kaplı kuyularına yerleştirildi ve yönlendirildi. Embriyolar bir damla halokarbon yağı 700 (Sigma, H8898) ile kaplandı. Hızlandırılmış kayıtlar, hücre görüntüleme çok modlu plaka okuyucu Cytation™ 5 kullanılarak yapıldı. Embriyonun yüzeyi ve merkezinden oluşan 2 pozisyon dan oluşan Z-serisi, toplama zamanından başlayarak 5 dakikalık aralıklarla her kuyu için yakalandı. Görüntülemeye 14 gün devam edildi. 4X faz kontrastlı objektif kullanıldı. İç yapıları görselleştirmek için optimumdan daha yüksek pozlama kullanıldı. Her zaman noktası için ayrı odak düzlemleri seçmek için Gen5™ yazılımı (Biotek, Winooski, VT) kullanıldı. Görüntüler hizalandı ve ardından Image-J yazılımı kullanılarak video haline dönüştürüldü.

3.7.2. Diferansiyel Girişim Kontrast (DIC) Mikroskopisi

%75 gliserol/PBS içindeki yumurtalar mikroskop slaytlarına yerleştirildi. Kısaca, slaytların sol ve sağ kenarlarına üç adet lamel (18x18) konuldu ve oje ile üst üste olacak şekilde sırayla yapıştırıldı. Bu yumurtaların ezilmesini engelleyen bir köprü görevi gördü. Lamellerin ortasına bir yumurta yerleştirildi. Bir lamel (24x50) açılı olarak, üst lamel ile temas eden lamın üzerine yerleştirildi ve hava kabarcıklarından kaçınarak lamel yavaşça indirildi. Lamellerin sol ve sağ kenarları oje ile kaplandı ve kuruması beklendi. Yumurtalar, 10X plan objektifi altında görüntülendi. Embriyoları görüntülemek için DIC eki ve LASX yazılımı olan bir Leica DM2500 optik mikroskop kullanıldı.

3.7.3 Konfokal Mikroskopi

Yüksek çözünürlüklü görüntüleme için Leica SP8 konfokal mikroskobu kullanıldı. Leica SP8, Diode 405 (UV Işığı), OPSL 488 (Görünür), OPSL 552 (Görünür), Diode 638 (Görünür) nm lazerler ve 20X ve 40X havanın yanı sıra 40X ve 63X yağa daldırma objektifleri içeren bir Dmi8 mikroskobu üzerinde çalışır. Slaytlar 3.7.2'de bahsedildiği gibi hazırlandı ve DAPI ile boyanmış embriyolar LASX yazılımı kullanılarak 405 nm dalga boyunda görüntülendi.



4. BULGULAR

4.1. *C. floridanus*'ta EMBRİYONİK GELİŞİMİNİN EŞ ZAMANLI GÖRÜNTÜLENMESİ

C.floridanus'ta embriyonik gelişim, kraliçe tarafından bir yumurtanın verilmesinden itibaren farklı 17 aşama ile yaklaşık 13 gün sürer. Embriyonik gelişim (yayınlanmamış veriler) 2.1.1 bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmış ve canlı görüntüleme sonrasında elde edilen yeni bulgular aşağıdaki başlıklar halinde burada açıklanmıştır.

4.1.1. Nükleer Bölünmeler (Aşamalar 1-4)

Yumurta kraliçe tarafından bırakıldıktan sonra, ilk dört aşamada zigotik nükleus bölünmeye başlar ve bu da nükleusların yumurtanın farklı pozisyonlarına göç etmesine neden olur. Eş zamanlı görüntülemeler ile elde edilen verilere göre toplamda on nükleer bölünme saptandı. Nükleer bölünmeler, canlı görüntülemelerde yaklaşık olarak her 115 dakikada bir meydana gelen sitoplazmik kasılma dalgaları olarak tespit edildi. Nükleer bölünmeler dikkate alındığında aşama 1'in (Şekil 4.1a) 5 saat 45 dakika, aşama 2'nin (Şekil 4.1b) 5 saat 45 dakikadan kadar 16 saat 30 dakikaya kadar ve aşama 3'ün (Şekil 4.1c) ise 16 saat 30 dakikadan kadar 18 saate kadar sürdüğü saptandı. 3. aşama sırasında, dışa doğru nükleer göç nedeniyle bölüm 2.1.1 'de açıklandığı gibi embriyo içinde 3 ayrı bölge oluşturan belirli bir model meydana gelir. Bunlar, yüksek bir nükleus yoğunluğuna sahip olan anterior zon, nükleus yoğunluğu düşük olan orta zon ve düşük nükleus yoğunluğuna ve yüksek bir endosimbiyoz yoğunluğuna sahip olan posterior zonlardır. Bu zonlar canlı görüntülemelerde açık veya koyu renkli bölgeler olarak ayırt edilebilir. 4. aşamada (Şekil 4.1d), kalan nükleer bölünmeler tamamlanır ve nükleusların yumurtanın çevresine göç etmeye devam eder. Bu aşamada, *Drosophila*' kutup hücrelerine benzer bir hücre topluluğu posterior uçta belirir. 4. aşama toplamda 18 saat 30 dakikadan 24 saat (1 günlük)' e kadar devam eder.

4.1.2. Blastoderm Oluşumu

Böcekler tipik olarak erken embriyogenez sırasında yüzeysel, tek katmanlı "blastoderm" embriyo oluşturmaları [143]. *C. floridanus*'ta da embriyogenezin 5. aşaması (Şekil 4.1e) sırasında bu yapı kurulur. Bu aşamada hücreleşme başlatılır ve sinsityal tek tip blastoderm, 6. aşamada hücreleştirilmiş, tek tip bir blastoderme dönüştürülür. Blastoderm aşaması canlı

görüntülemeye lateral bölgelerde oluşan hücrelerle takip edilebilir. Bu aşamada germline kapsülü görünmeye başlar. Aşama 5, 24 saatten (1 gün) 35 saate (~1.5 gün)'e kadar devam eder.

4.1.3. Gastrulasyon

6. aşama (Şekil 4.1f), germdiskin hücreleşmesi ve gastrulasyonunun tamamlanması ile karakterize edilir. Anterior uçta gastrulasyon, germdiskinin orta hattının anterior-posterior eksenini boyunca ventral olarak bir 'oyuk' olarak görünen mezodermi oluşturan invajinasyonla başlar. Canlı görüntülemeye embriyo dorsal veya lateral taraftan bakıldığında ön kutuptan katlanmış gibi görünür. Aynı zamanda yumurtanın ortasında ekstraembriyonik serosa hücreleri büyük küboidal epitel hücreleri olarak bulunur ve amniyon germdiskinin ön kısmında yer alır. Serosal hücreler, serosakütikül adı verilen vitellin zarın altında kahverengimsi yarı saydam bir tabaka salgılamaya başlar. Bu aşama 35 saat (1.5 gün) ile 60 saat (2.5 gün) arasında meydana gelir.

4.1.4. Germbandın Uzaması ve Segmentasyonu

Aşama 7 (Şekil 4.1g), germbandın uzamasının başlaması ve ekstraembriyonik zarların büyümesi ile karakterize edilir. Bu aşamada germdisk, germband haline gelir ve yumurta kesesi boyunca uzayarak kalınlaşır. Bu aşama canlı görüntüleme ile net bir şekilde germbandın hareketinin takibiyle ayırt edilebilir. Aşama 7, 60 saat (2.5 gün) ile 79 saat (~3 gün) arasında meydana gelir. Aşama 8'de (Şekil 4.1h), germbandın uzaması yaklaşık olarak %80 tamamlanmıştır. Germbandda geçici segmentler oluşur. Serosa tüm yapıları sarar ve 79 saatten (~3 gün) 120 saat (5 gün)' kadar bu aşama devam eder. Aşama 9 (Şekil 4.1i), germbandın uzamasının tamamlanması ile karakterize edilir. Bakteriyositler, yumurta kesesinin içine doğru hareket etmeye başlar. Bu hareket canlı görüntülemeye koyu renkli bir alanın hareketi şeklinde takip edilir. Amniyon, kapsülün yanı sıra bakteriyositleri de kapsayacak şekilde dorsal-posteriora doğru uzanır. Germbandın son uzaması sırasında, germ hattı kapsülü, germband ile karşılaştırıldığında bir iç pozisyon alır ve kısmen yumurta kesesi zarına çöker. Bu aşamanın sonunda germbandın, yumurtanın önden arkaya doğru tüm ventral tarafını kaplar. Serosa artık tüm yapıları tamamen sarar. Bakteriyositlerin yanı sıra germ hattı kapsülü de artık bir amniyon hücresi tabakası ile dorsal olarak kaplanmıştır, böylece ektodermi germbandının ön, yan ve arka kenarları arasında birleştirir. Bu aşama 120 saat (5 gün) ile 154 saat (~6.4 gün) arasında meydana gelir. Aşama 10 (Şekil 4.1j), germbandın genişliğinde bir artış ve germbandın ön arka

ekseni boyunca yapılandırılmış çoklu hücre sıralarının oluşumu ile karakterize edilir. Bakteriyositler yumurta kesesine girmeye devam eder ve çevresi boyunca sıralanır. Aşama 10, 154 saatten (~6.4 gün) 177 saat (~7.4 gün)'e kadar devam eder.

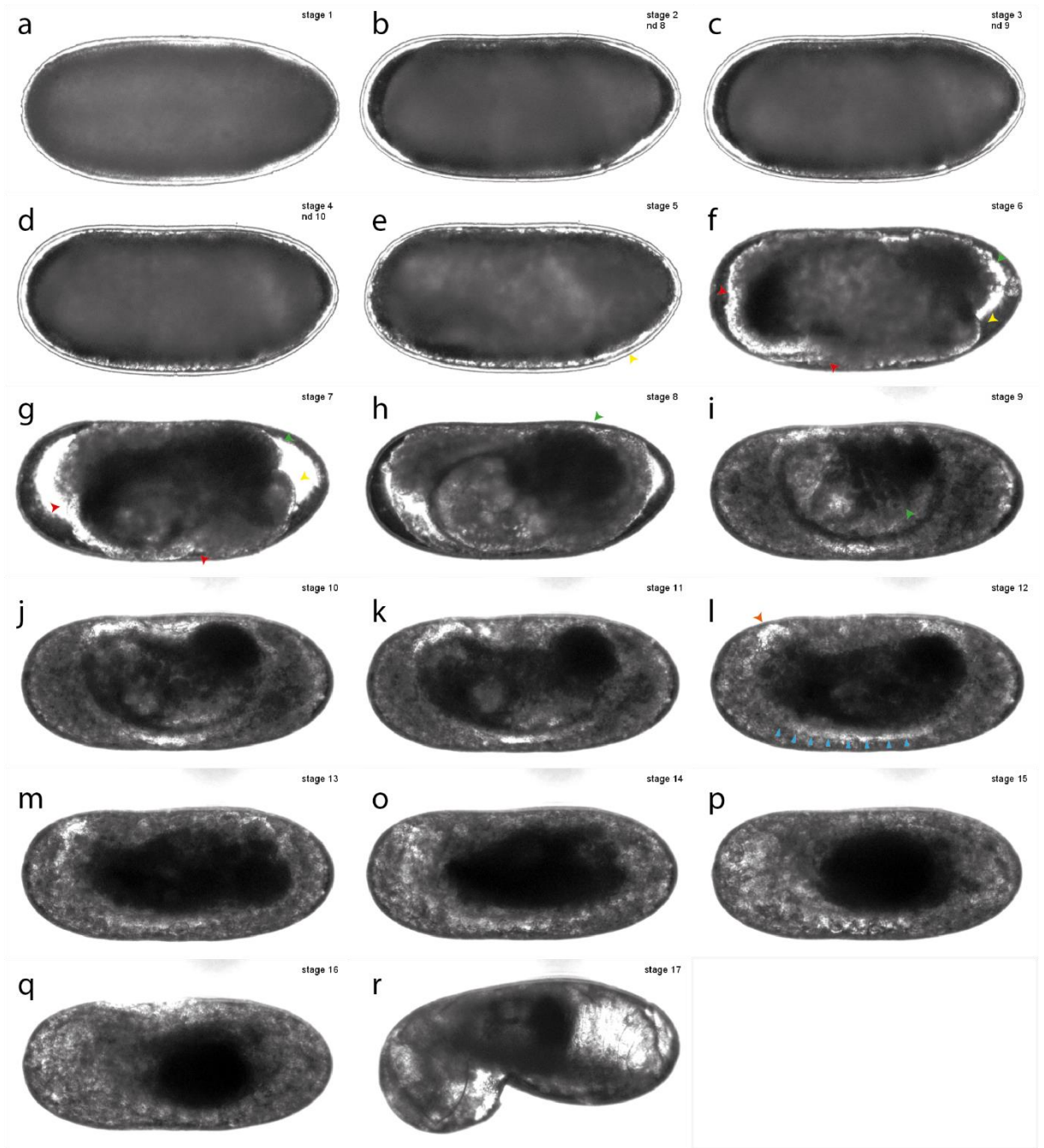
Aşama 11 (Şekil 4.1k), germbandında metamerik birimler oluşturan segmental olukların görünümü ile karakterize edilir. Embriyolar arasında değişken olarak, aşama 11 veya 12'de germbandın ön kısmında gelecekteki baş ve ağız yapıları için hafif tomurcuklar belirir. Bunlar arasında öne yerleştirilmiş gnatal tomurcukları veya mandibula, maksilla ve labium çıkıntıları ve antero-dorsal olarak görünen baş yapıları; clypeolabrum ve hipofaringeal lob. Germband, bir sonraki aşamaya kıyasla çok yavaş bir hızda düzelmeye başlar. Aşama 11, 177 saat (~7.4 gün) ile 184 saat (~7.7 gün) arasında gözlemlenir. 12. aşamada germbandının düzleşmesi hızlıdır (Şekil 17l) ve net bir şekilde canlı görüntülemeye saptanır. Bu aşama, 184 saatten (~7.7 gün) 209 saat (~8.7 gün)'e kadar sürer.

4.1.5. Dorsal Kapanma ve Baş Oluşumu

13. Aşama (Şekil 4.1m) dorsal kapanmanın başlangıcını işaret eder. Prosefalik tomurcuklar öne doğru kayar ve gnathal tomurcukları ventral olarak kayar. Gnathal tomurcukları daha uzun görünür. Bilateral olarak prosefalik tomurcuklara bitişik bir çift optik lob oluşur. Posteriorde proktodeal invaginasyon saptanabilir hale gelir. Germbandının düzleştirilmesi daha da ilerler ve bu aşamada tamamlanır. Bu aşamada germline kapsülü embriyonun içinde gömülü kalır. 209 saatten (~8.7 gün) 220 saat (~9 gün)'e kadar bu aşama devam eder. Aşama 14 (Şekil 4.1n), prosefalik ve gnathal segmentlerinin ön kısmında biraz daha dairesel bir formasyona yakınsaması ve kısa bir ağız açıklığı gibi görünmesi ile karakterize edilir. Bu aşama ise 220 saat (~9 gün) ile 232 saat (~10 gün) arasında meydana gelir. 15. aşamada (Şekil 4.1o) dorsal kapanmanın tamamlandığı görülmektedir. Dorsal kapanma, lateral epidermis embriyonun ön ve arka uçlarından başlayarak ve orta bölgeye doğru kapanarak embriyonun dorsal tarafında birleştiğinde gerçekleştirilir. Aynı zamanda, gnathal yapıları daha daralmış küresel bir deseni koruyarak ventral olarak hafifçe kayar. Bu aşama, 232 saatten (~10 gün) 252 saat (~10.5 gün)'e kadar sürer. 16. aşamada (Şekil 4.1p), larva ağız ventral olarak daha da hareket eder. Varsayımsal olarak tübüler hale gelmiş ve gelecekteki germ hattının somatik kısımlarını oluşturmuş olsa da, germ hattı kapsülünün akıbeti tespit edilememiştir. 16. Aşama 252 saat (~10.5 gün) ile 285 saat (~12 gün) arasında gözlemlenir.

Son olarak, aşama 17 (Şekil 4.1q) embriyogenezin son aşamasıdır ve larva tamamen gevşek bir şekilde bağlanmış serosa hücreleri, vitellin zar ve koryondan oluşan yumurta kabuğunun içinde oluşur. Larva, yumurta kabuğunun içinde hareket etmeye başlar ve serosa hücrelerinin patlamasına ve larva tarafından emilen içeriklerini serbest bırakmasına neden olur. Bu aşamada ağız daha da daralır ve göğüs bölgesi daha da incelir, larva uzar ve yumurta kabuğuna uyum sağlamak için başını eğir. Larva daha sonra yumurta kabuğundan çıkar.

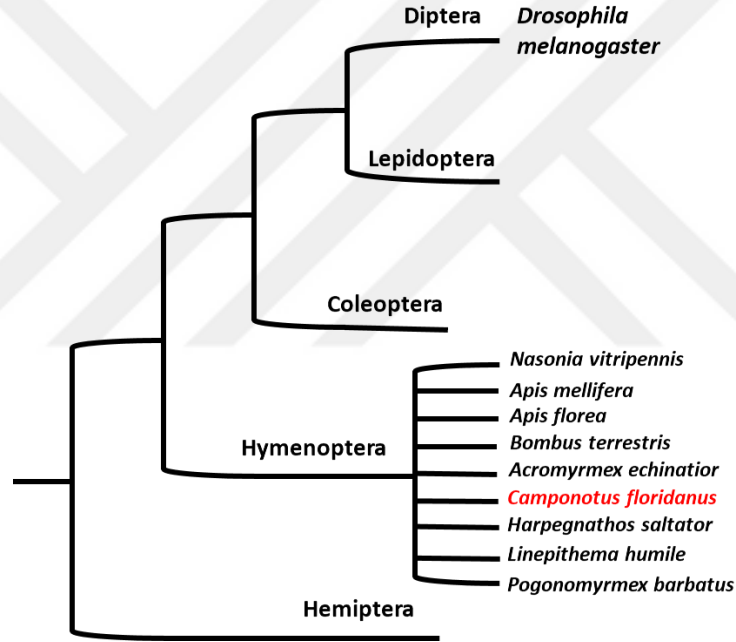




Şekil 4.1: *C. floridanus* embriyonik gelişiminin anlık görüntüleri. Farklı aşamalar ve aşamalara karşılık gelen nihai nükleer bölünmeler, her görüntünün sağ üst kısmında yazılmıştır. Germline kapsülünün oluşumu (sarı ok ucu), tam bakteriyositlerin ilk görünümü (yeşil ok ucu), germdiskin uçları (kırmızı ok uçları) 6. aşamada ve germband (kırmızı ok uçları) 7. aşamada, segmentlerin görünümü (mavi ok uçları) 12. aşamada proktodeal invaginasyon (turuncu ok ucu) belirtilmiştir. (Embryonic, Larval and Pupal Development in the Carpenter Ant *Camponotus floridanus* yayınlanmamış verileri).

4.2. *C. floridanus*'ta BMP SİNYAL GENLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ

C. floridanus'a ait BMP sinyal yolu ile ilişkili genlerini elde etmek için filogenetik analiz, bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi yapılmıştır. *D. melanogaster* ve hymenoptera içerisindeki türlere ait elde edilen kodlama yapan bölge dizileri hizalanmıştır. Bu hizalama kullanılarak filogenetik ağaçlar elde edilmiştir. Filogenetik analizler için kullanılan dizilerin ait olduğu türler şekil 4.2'de gösterilmiştir. *C. floridanus*'un ağaç içerisinde yakın olduğu dizi referans alınarak BMP sinyal yolağına ait genleri belirlenmiştir. Sonuçlar, *C. floridanus*'ta BMP ligandları *dpp* ve *gbb*; metalloproteaz *tld*; antagonistler *sog* ve *tsg*; tip I reseptör *tkv* ve tip II reseptör *punt* bulunurken, *scw* ligandı ve tip I reseptör *sax*'ın bulunmadığını ortaya koymuştur.



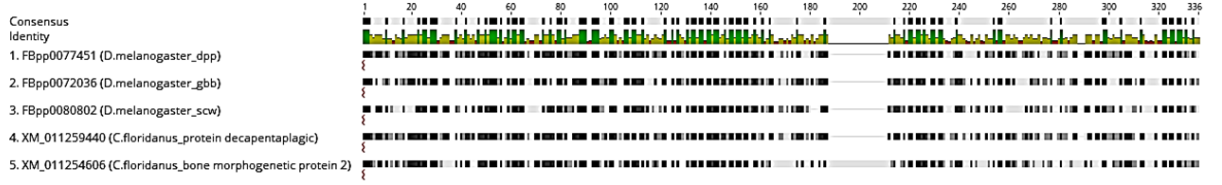
Şekil 4.2: Filogenetik analizlerde kullanılan türlerin ağaç üzerinde gösterimi. Ağaç, BMP yolu bileşenlerinin filogenetik karşılaştırması için kullanılan türler arasındaki ilişkiyi gösterir.

4.2.1. *C. floridanus* BMP Ligandlarının Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi

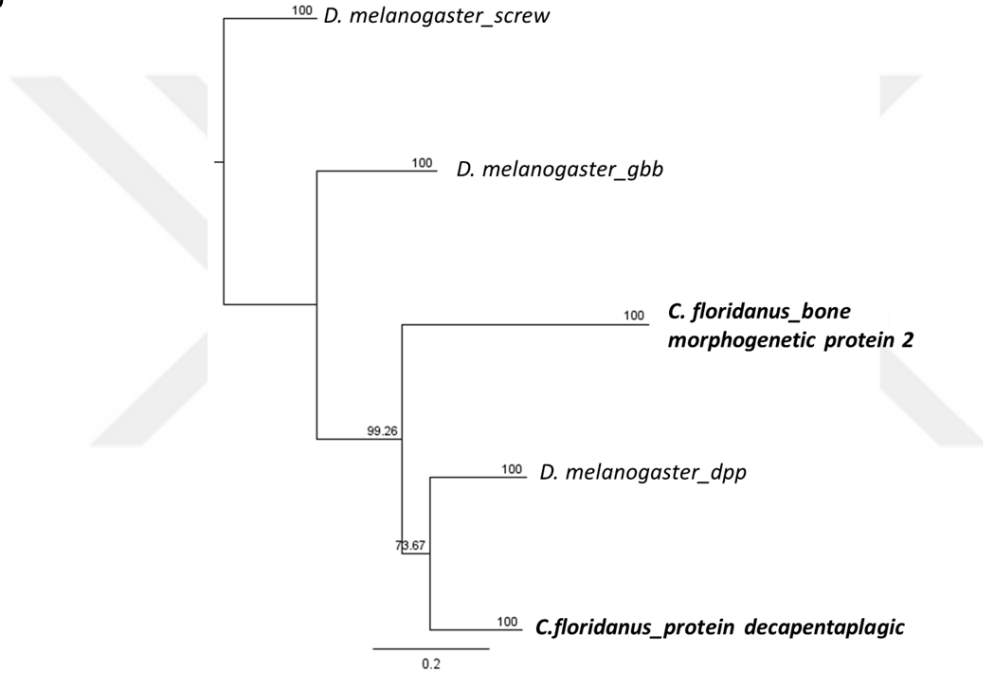
D. melanogaster ligandlarının protein dizileri temel alınarak yapılan BLAST sonucunda *C. floridanus* için “Protein Decapentaplastic” ve “Bone Morphogenetic Protein 2” olmak üzere iki aday ligand geni bulunmuştur. Ligand dizileri, *D. melanogaster* ligand dizileri ile hizalandığında *C. floridanus* ve *D. melanogaster*'e ait ortak yüksek oranda korunmuş bölgeler bulunmuştur (Şekil 4.3a). Filogenetik ağaç elde edildiğinde *C. floridanus* ligandlı gen dizilerinin

D. melanogaster gbb ve *dpp*'ye daha yakın konumlandığı ve bir diğer ligand olan *scw*'e ise uzak konumlandığı bulunmuştur (Şekil 4.3b).

a



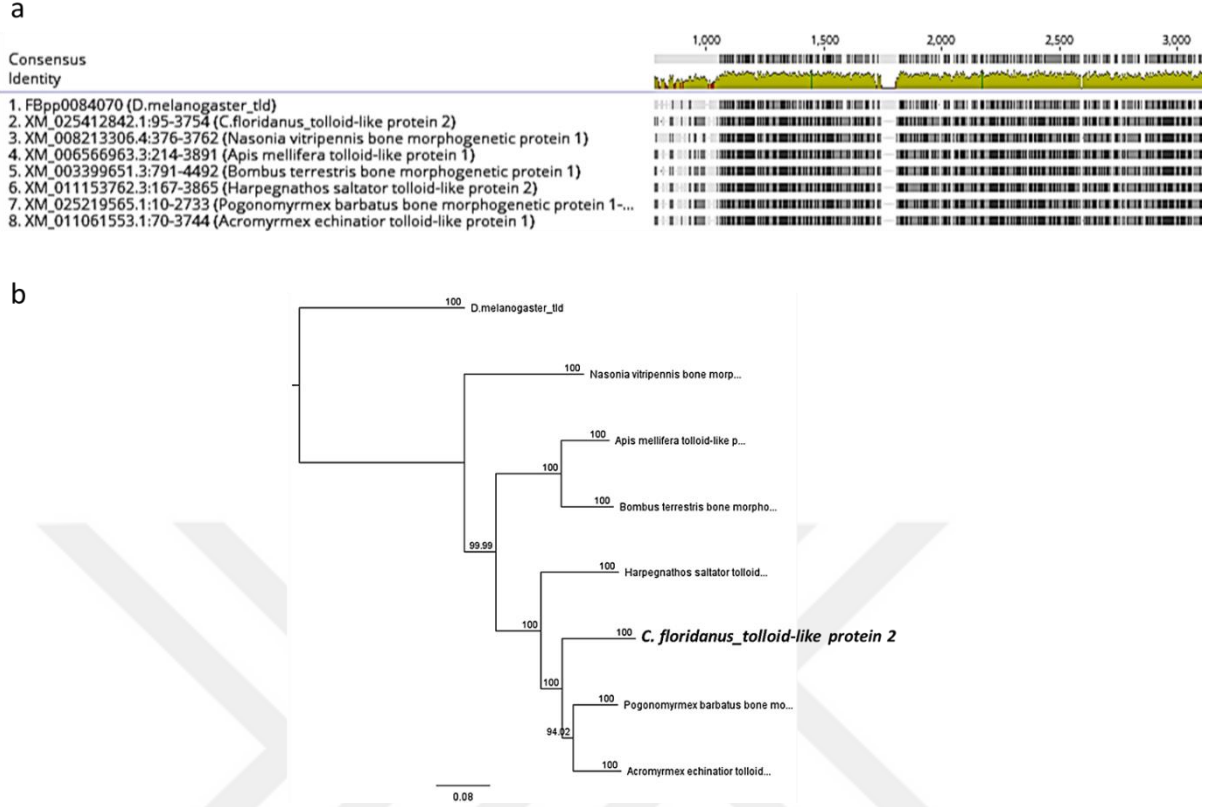
b



Şekil 4.3: *C.floridanus* BMP ligandlarının filogenetik analizi. (a) Clustal Omega'ya dayalı *D. melanogaster* ve *C.floridanus* BMP ligand dizilerinin nükleotid dizilimi, (b) nükleotid diziliminden oluşturulan Neighbor-joining'e dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, *D. melanogaster* ve *C.floridanus* BMP ligandları arasındaki ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir.

4.2.2. *C.floridanus*'un BMP Metalloproteazının Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi

D. melanogaster Tld protein dizisi temel alınarak yapılan BLAST sonucunda *C. floridanus tld* genine ait olduğunu düşünülen aday dizi, “tolloid-like protein 2”, *C.floridanus* genomunda bulunmuştur. Bu dizisi, *D. melanogaster* ve farklı hymenoptera türlerine ait kodlama yapan bölgelere ait dizilerle hizalandığında, yüksek oranda korunmuş bölgeler bulundu (Şekil 4.4a). Elde edilen diziler filogenetik ağaç ile de doğrulandı (Şekil 4.4b).

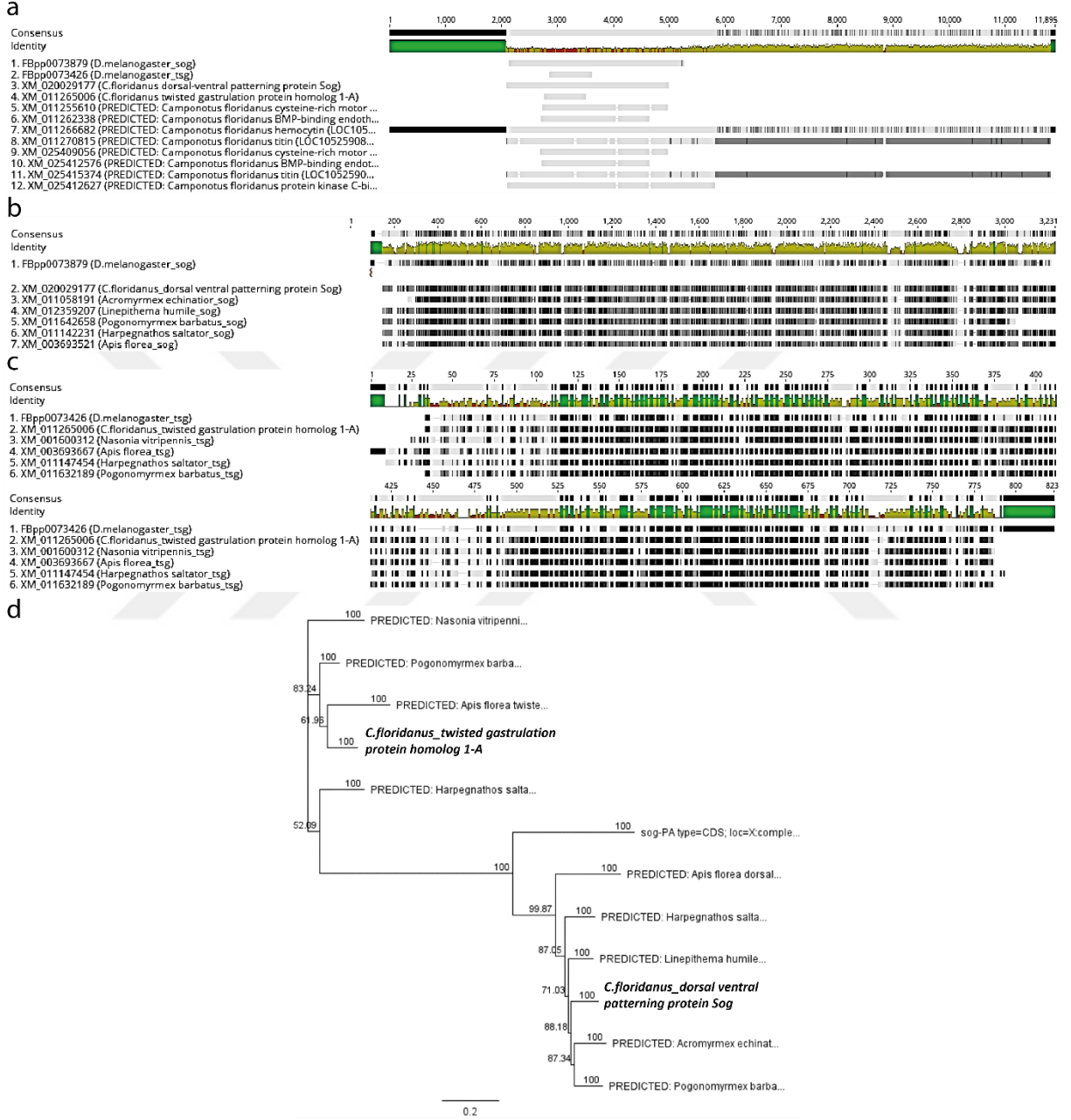


Şekil 4.4: *C.floridanus* BMP metalloproteazının filogenetik analizi. (a) Clustal Omega'ya dayalı *D. Melanogaster*, farklı hymenoptera türleri ve *C.floridanus* BMP metalloproteaz dizilerinin nükleotid hizalaması, (b) nükleotid diziliminden oluşturulan Neighbor-joining'e dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, *D. Melanogaster*, farklı hymenoptera türleri ve *C.floridanus* BMP metalloproteazları arasındaki ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir.

4.2.3. *C.floridanus* BMP Antagonistlerinin Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi

D. melanogaster protein dizileri esas alınarak yapılan BLAST analizleri sonucu *C.floridanus* antagonistleri için farklı aday diziler bulundu. *C.floridanus* antagonistlerinin dizileri *D.melanogaster*'e ait kodlama yapan bölge dizileri ile hizalandığında, yüksek düzeyde korunmuş bölgeler bulunamadı, ancak bunlardan ikisi *D. melanogaster* dizisiyle hemen hemen örtüşen bölgelere sahipti (Şekil 4.5a). Bunlar “dorsal ventral patterning protein sog” ve “twisted gastrulation protein homolog 1-A”. Bu nedenle doğruluğu artırmak için *C.floridanus*'a ait bu diziler, *sog* (Şekil 4.5b) ve *tsg* (Şekil 4.5c) genlerine ait ayrı gruplar şeklinde *D.melanogaster* ve ek olarak farklı hymenoptera dizileriyle hizalandı. Bu sonuçlar kendi içinde daha benzer bölgeler bulunmasına yardımcı oldu. Daha sonra bu hizalamaları kullanarak bir ağaç oluşturuldu. Filogenetik ağaç, *C.floridanus*'un “dorsal ventral patterning protein sog”un *sog* dizilerine daha yakın konumlandığını ve “twisted gastrulation protein homolog 1-A”nın *tsg*

dizilerine daha yakın konumlandığını gösterdi. Dizilerin hizalanmasından elde edilen ağaç da, *tsg* ve *sog* genleri için iki farklı ana dallara sahipti ve bu hizalama sonuçlarıyla örtüştü (Şekil 4.5d).

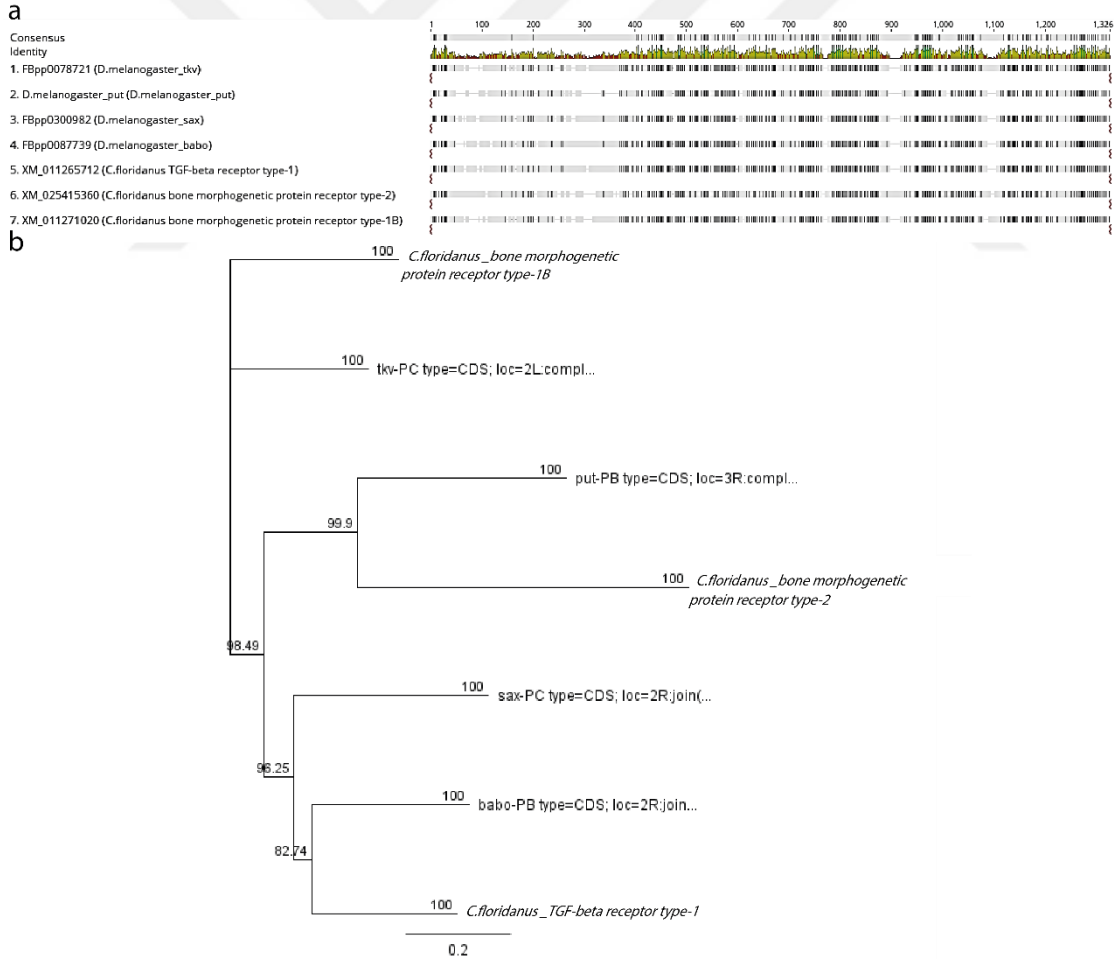


Şekil 4.5: *C. floridanus* BMP antagonistlerinin filogenetik analizi. (a) *D. melanogaster*, *C. floridanus* *sog* ve *tsg* kodlama dizilerinin nükleotid hizalaması, düşük benzerlik göstermektedir. (b) *D. melanogaster*, *C. floridanus* ve farklı hymenoptera türlerine ait *sog* kodlama dizisinin nükleotid hizalaması yüksek benzerlik göstermektedir. (c) *D. melanogaster*, *C. floridanus* ve farklı hymenoptera türlerine ait *tsg* kodlama dizisinin nükleotid hizalaması yüksek benzerlik göstermektedir. (d) Nükleotid hizalamasından oluşturulan Neighbor-joining'e dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, *D. melanogaster* ve farklı hymenopteranlarda *C. floridanus* *sog* ve *tsg* arasındaki

ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir. Nükleotid hizalamaları Clustal Omega ile yapılmıştır.

4.2.4. *C. floridanus*'un BMP Reseptörlerinin Veri Tabanlarından Tespit Edilmesi

C. floridanus genomunda “Bone morphogenetic protein receptor type-1B”, “Bone morphogenetic protein receptor type-2” ve “TGF-beta receptor type-1” olmak üzere üç aday reseptör dizisi bulunmuştur. *D. melanogaster*'e ait *tkv*, *sax*, *punt*, *babo* reseptör dizileri ile bu aday genlere ait diziler hizalandı (Şekil 4.6a). Hepsi benzer oranda korunmuş dizilere sahipti. Ardından elde edilen filogenetik ağaç ile, *C.floridanus* TGF-beta reseptörü tip-1'in *D. melanogaster sax*'a göre *babo*'ya daha yakın konumlandığı, “Bone morphogenetic protein receptor type-1B”'in *tkv*'ye, bone morphogenetic protein receptor type-2'nin de *punt*'a yakın konumlandığı bulunmuştur (Şekil 4.6b).



Şekil 4.6: *C. floridanus* BMP reseptörlerinin filogenetik analizi. (a) Clustal Omega'ya dayalı *D. melanogaster* ve *C.floridanus* BMP reseptör dizilerinin nükleotid dizilimi, (b) nükleotid diziliminden oluşturulan Neighbor-Joining dayalı filogenetik ağaç. Ağaç, *D. melanogaster*

BMP reseptörleri ile *C.floridanus* BMP reseptörleri arasındaki ilişkiyi açıklar. Dallardaki değerler yüzde olarak yakınlığı göstermektedir.

4.3. *C. floridanus*'un BMP GENLERİNİN KLONLANMASI

BMP sinyal yoluna ait temel bileşenler olan, *Cfl-dpp*, *Cfl-gbb*, *Cfl-tld*, *Cfl-tsg*, *Cfl-sog*, *Cfl-tkv* ve *Cfl-punt* genleri pGEM-T ve/veya PZR II TOPO vektörlerine bölüm 3.3'te açıklandığı gibi klonlanmıştır. Bu genlere ek olarak embriyonik farklı dokularda eksprese olan doku spesifik marker adayları da bu vektörlere klonlanmıştır. Bu amaçla, cDNA üzerinde tablo 3.4'te gösterildiği gibi gene spesifik primerlerle ilgili genler PZR ile amplifiye edildi. Yukarıda belirtilen BMP sinyal yoluna ait temel genlerin (Şekil 4.7) ve BMP sinyal yolu ile ilgili marker genlerinin (Şekil 4.8) amplifiye edilmiş PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri gösterilmiştir. Transformasyondan sonra, seçici LB agar plakalarındaki koloniler, koloni PZR ile kontrol edilmiş ve jel sonucu gösterilmiştir (Şekil 4.9). Genlerin oryantasyonu, M13F-gene spesifik forward primer veya M13R-gene spesifik forward primer çiftleri kullanılarak da kontrol edildi. Tablo 4.1'de gösterilen plazmit klon koleksiyonu, M13F ve M13R primer çiftleri kullanılarak sekanslama ile doğrulandı.

Tablo 4.1: Plazmid koleksiyonu

Klon Numarası	Tür	Plazmid İsmi	Kullanılan Plazmid
226	<i>C.floridanus</i>	pGTEZ:CflTld2.2	pGEM-T
227	<i>C.floridanus</i>	pGTEZ:CflTld2.4	pGEM-T
228	<i>C.floridanus</i>	pGTEZ:CflTld3.1	pGEM-T
231	<i>C.floridanus</i>	pGTEZ:CflPunt1	pGEM-T
232	<i>C.floridanus</i>	pGTEZ:CflPunt2	pGEM-T
233	<i>C.floridanus</i>	pGTEZ:CflPunt3	pGEM-T
234	<i>C.ligniperda</i>	TOPO:CligTld1.1	PZR II TOPO
235	<i>C.ligniperda</i>	TOPO:CligTld2.1	PZR II TOPO
236	<i>C.ligniperda</i>	TOPO:CligPunt2.1	PZR II TOPO

Tablo 4.1 (devam):

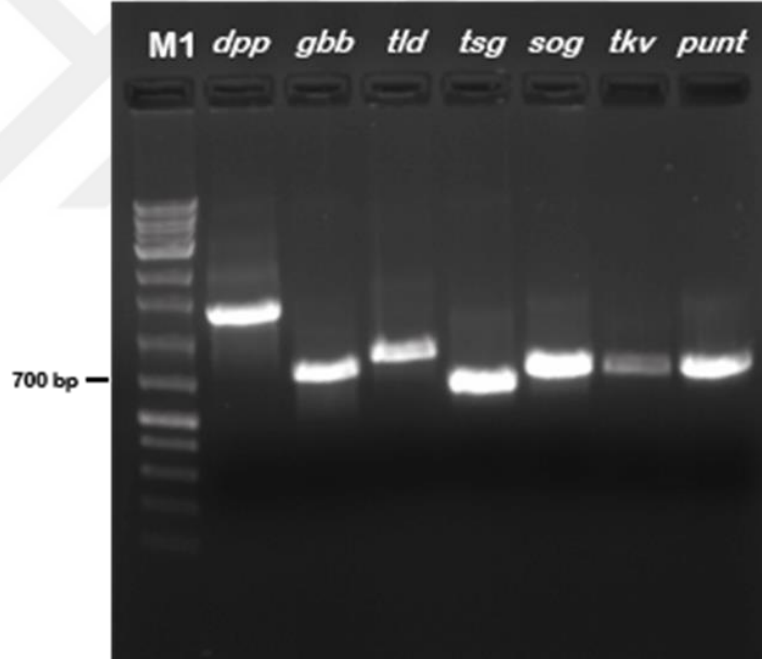
237	<i>C.aegius</i>	TOPO:CaeuTld1.2	PZR II TOPO
238	<i>C.aegius</i>	TOPO:CaeuTld2.2	PZR II TOPO
239	<i>C. sanctus</i>	TOPO:CsancTld2.3	PZR II TOPO
240	<i>C. sanctus</i>	TOPO:CsancTld1.1	PZR II TOPO
241	<i>Lasius spp.</i>	TOPO:ClasspTld1.2	PZR II TOPO
242	<i>Lasius spp.</i>	TOPO:ClasspTld2.2	PZR II TOPO
243	<i>Lasius spp.</i>	TOPO:ClasspPunt1.2	PZR II TOPO
244	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflGbb2.1	PZR II TOPO
245	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflTsg2.2	PZR II TOPO
246	<i>C.aegius</i>	TOPO:CaeuPunt1.1	PZR II TOPO
247	<i>C.sanctus</i>	TOPO:CsancTsg1.3	PZR II TOPO
248	<i>C.floridanus</i>	Cfl_Tkv_wildtype	pTwist ENTR Kozak
249	<i>C.floridanus</i>	Cfl_Tkv-a	pTwist ENTR Kozak
252	<i>C.floridanus</i>	Cfl_Punt	pTwist ENTR Kozak
253	<i>C.floridanus</i>	Cfl_Dpp	pTwist ENTR Kozak
254	<i>C.floridanus</i>	Cfl_Sog	pTwist ENTR Kozak
257	<i>C.ligniperda</i>	TOPO:CligDpp1.2	PZR II TOPO
258	<i>C.liginiperda</i>	TOPO:CligDpp2.2	PZR II TOPO
259	<i>C.aeugus</i>	TOPO:CaeuDpp4	PZR II TOPO
260	<i>C.aeugus</i>	TOPO:CaeuDpp11	PZR II TOPO
261	<i>C.ligniperda</i>	TOPO:CligGbb13	PZR II TOPO

Tablo 4.1 (devam):

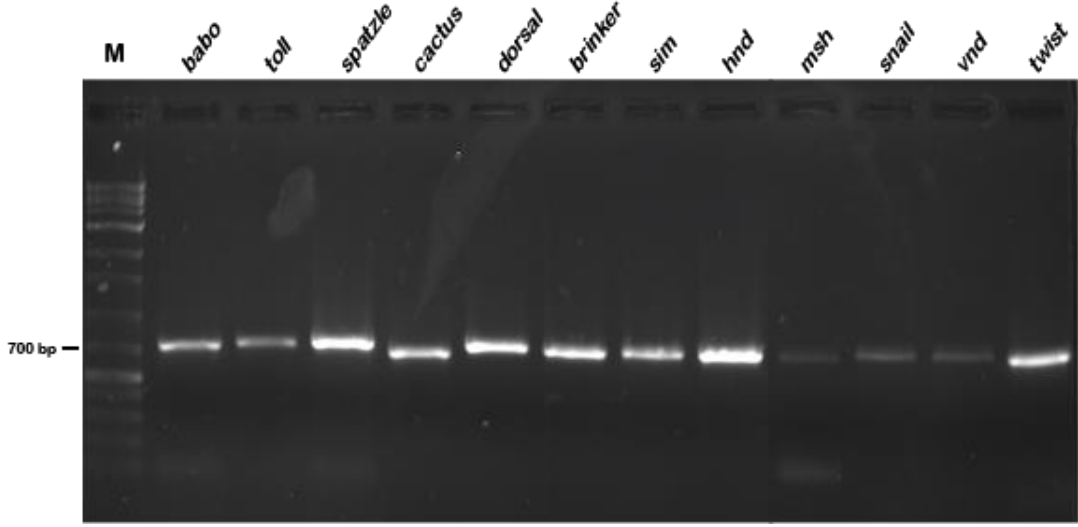
262	<i>C.ligniperda</i>	TOPO:CligGbb16	PZR II TOPO
263	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflDpp2.6	PZR II TOPO
264	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflTkv2.9	PZR II TOPO
265	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflTkv1.14	PZR II TOPO
266	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflSog1.3	PZR II TOPO
267	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflSog2.5	PZR II TOPO
268	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflEngC1	PZR II TOPO
269	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflEngC2	PZR II TOPO
270	<i>C.floridanus</i>	TOPO:Cflbaboo1.1A	PZR II TOPO
271	<i>C.floridanus</i>	TOPO:Cflbaboo1.2A	PZR II TOPO
272	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflToll2.2K	PZR II TOPO
273	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflToll2.2A	PZR II TOPO
274	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflSpatzle3.2A	PZR II TOPO
275	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflCactus4.1A	PZR II TOPO
276	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflCactus4.2A	PZR II TOPO
277	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflDorsal5.1A	PZR II TOPO
278	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflBrinker6.1A	PZR II TOPO
279	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflBrinker6.2A	PZR II TOPO
280	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflSim7.2A	PZR II TOPO

Tablo 4.1 (devamı):

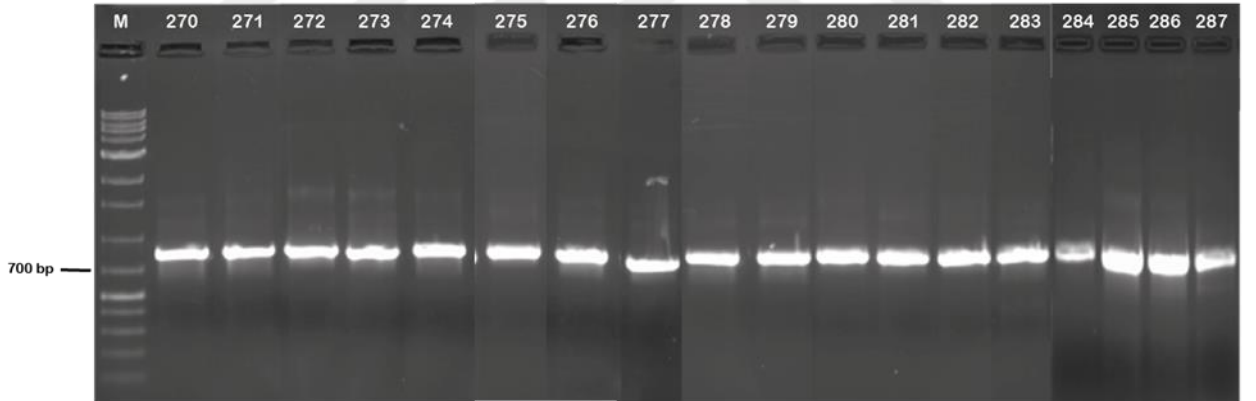
281	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflHnd8.1k	PZR II TOPO
282	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflHnd8.2K	PZR II TOPO
283	<i>C.floridanus</i>	TOPO:Cflmsh11.1K	PZR II TOPO
284	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflSnail13.1A	PZR II TOPO
285	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflSnail13.2A	PZR II TOPO
286	<i>C.floridanus</i>	TOPO:Cflvnd12.1	PZR II TOPO
287	<i>C.floridanus</i>	TOPO:CflTwist14.2	PZR II TOPO



Şekil 4.7: PZR ile amplifiye edilen *C. floridanus* BMP genlerinin agaroz jelde kontrolü. M1 ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) gösterir ve amplifiye edilen genler her bir kuyunun üzerine yazılmıştır. *dpp*: decapentaplagic, *gbb*: glass-bottom boat, *tld*: tolloid, *tsg*: twisted gastrulation, *sog*: short gastrulation, *tkv*:thickveins.



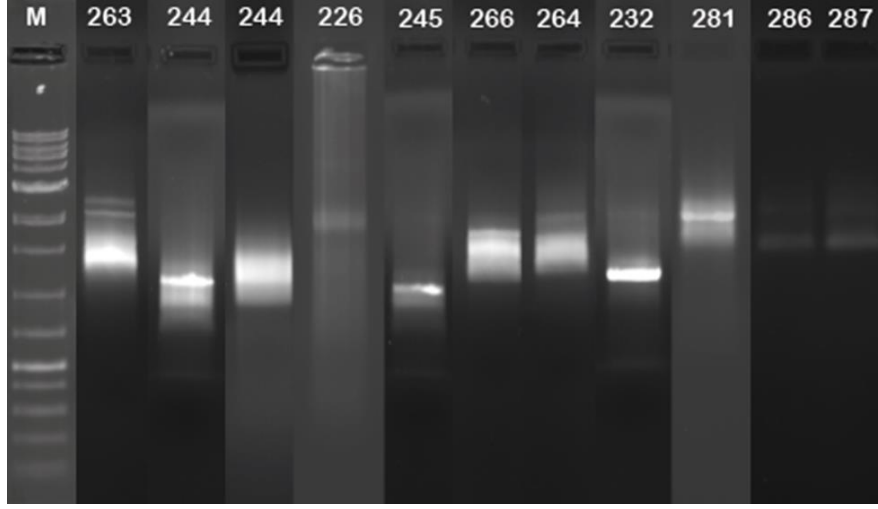
Şekil 4.8: PZR ile amplifiye edilen BMP sinyal yolu ilişkili genlerin agaroz jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) gösterir ve amplifiye edilen genler her bir kuyunun üzerine yazılmıştır. *sim*:single minded, *hnd*:hindsight, *msh*:muscle segment homeobox, *vnd*: ventral nervous system defective.



Şekil 4.9: BMP ilişkili genlerin koloni PZR ürünlerinin jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) göstermektedir ve klon numaraları (tablo 4.1) her kuyunun üzerine yazılmıştır.

4.4. *In situ* HİBRİDİZASYON İÇİN PROB SENTEZİ

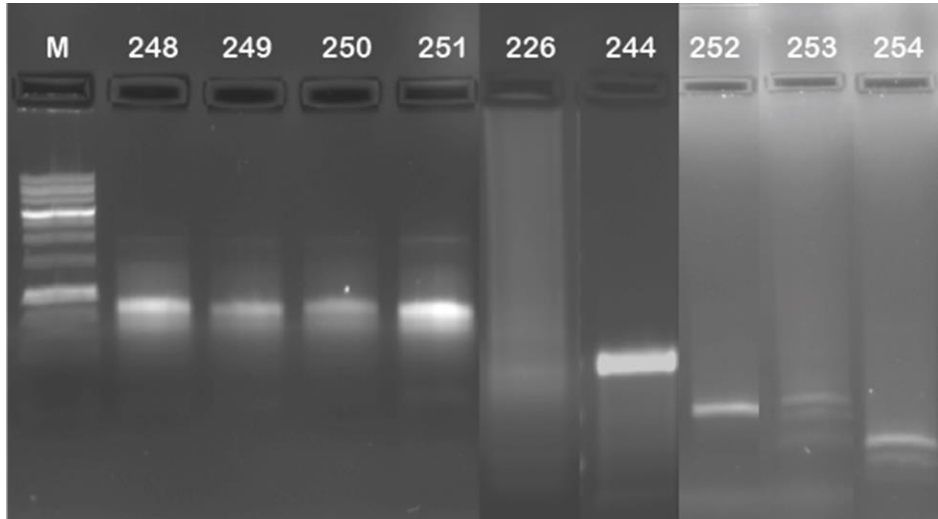
Cfl-dpp, *Cfl-gbb*, *Cfl-tld*, *Cfl-sog*, *Cfl-tsg*, *Cfl-tnv* ve *Cfl-punt* genleri ve bazı doku spesifik marker genleri için DIG veya Biotin etiketli RNA probları, bölüm 3.4.2'de belirtildiği gibi sentezlendi. 2 µL prob sentezi reaksiyonu, RNA'ların bütünlüklerini kontrol etmek için RNA probları, saflaştırılmadan önce çamaşır suyu (%0.1) içeren agaroz jelde kontrol edildi ve jel sonucu şekil 4.10'da gösterildi.



Şekil 4.10: RNA problarının agaroz jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) göstermektedir ve RNA için bir referans olarak kullanılmıştır. RNA prob sentezi için kullanılan klon numaraları (tablo 4.1) her kuyunun üzerine yazılmıştır. İlk sıradaki 244 DIG ve ikinci sıradaki 244 Biotin işaretlidir.

4.5. RNA İNTERFERANS İÇİN DSRNA SENTEZİ

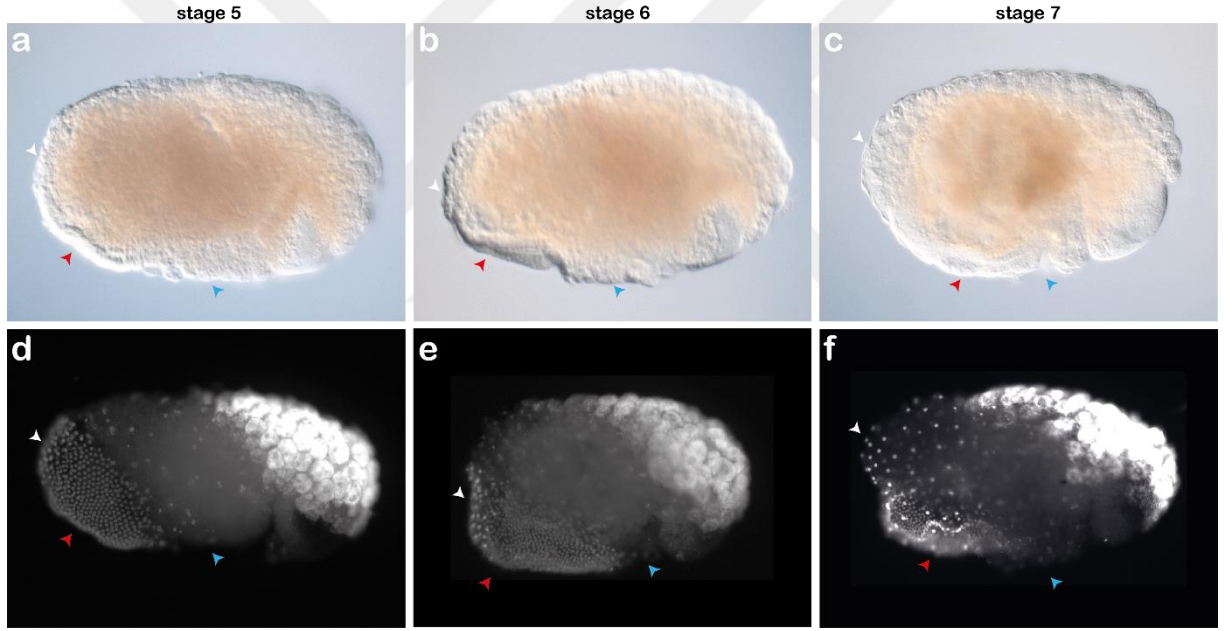
Cfl-dpp, *Cfl-gbb*, *Cfl-tld*, *Cfl-sog*, *Cfl-tsg*, *Cfl-tkv* ve *Cfl-punt* genleri için dsRNA, bölüm 3.5.1'de bahsedildiği gibi sentezlendi. 1 µL dsRNA, RNA bütünlüklerini kontrol etmek için dsRNA'lar saflaştırılmadan önce çamaşır suyu (%0.1) içeren agaroz jelde kontrol edildi ve jel sonucu şekil 4.11'de gösterildi.



Şekil 4.11: dsRNA'ların agaroz jelde kontrolü. M ladder DNA'yı (100 bç-10 kb) göstermektedir ve RNA için bir referans olarak kullanılmıştır. dsRNA sentezi için kullanılan klon numaraları (tablo 4.1) her kuyunun üzerine yazılmıştır.

4.6. EKTRAEMBRYONİK AMNİYON OLUŞUMU

C.floridanus'ta iki tip ekstraembriyonik zar oluşur. Bölüm 2.1.1'de açıklandığı gibi, *C.floridanus*'un embriyonik gelişiminin 3. aşamasında üç farklı bölge oluşur. Orta bölge, sonunda hücreleşmeden sonra ekstraembriyonik dokuları oluşturur. Daha önce serosa ve amniyonun orta bölgeden kökenlendiği düşünülürken DAPI ile elde edilen görüntülemeler amniyon hakkında net bir fikir ortaya koydu. Sonuçlarımız amniyonun düşünülen aksine germdiskinin ön ucuna yapışık yumurtanın anterior kısmında oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.12). Amniyon hücreleri ve serosa hücreleri yapısal olarak birbirinden farklıdır (Şekil 4.12 a-c). Amniyonun nükleer yapı ve boyutu da serosa ve germdiskinkinden ayrılır. Bu nedenle amniyon hücreleri DAPI ile boyandıklarında ayırt edilebilirler (Şekil 4.12 d-f).



Şekil 4.12: *C. floridanus*'un farklı embriyonik aşamalarına karşılık gelen amniyonun formasyonu. Amniyon (beyaz ok ucu), germdisk (kırmızı ok ucu) 5-6. aşamada, germband (kırmızı ok ucu) 6. ve 7. aşamada, serosa (mavi ok ucu) gösterilmektedir. Görüntüler farklı embriyolardan alınmıştır. (a-c) görüntüleri DIC mikroskobu ile ve (d-e) DAPI modunda Cytation 5 ile alınmıştır. (d-e) embriyoları DAPI ile boyanmıştır.

4.7. EMBRİYODA BMP SİNYALİZASYON BİLEŞENLERİNİN GEN EKSPRESYON PATERNLERİ

Böcekler içinde BMP sinyali, dorsal kaderlerin belirlenmesi için özellikle önemli görünmektedir. Bu amaçla, dorsal tarafta tepe seviyeleri olan bir nükleer pMAD gradyanı oluşturulur ve bu şimdiye kadar analiz edilen tüm böceklerde BMP sinyalleme seviyesi için iyi

bir işarettir [21, 116, 135, 144]. Bununla birlikte, bu gradyanın şekli ve dinamikleri türler arasında farklılık gösterir. pMAD gradyanı embriyoda BMP sinyalinin nerede aktif olduğu hakkında bilgi verirken, BMP sinyal yolağına ait genlerin uzamsal ve zamansal ekspresyonu da bu gradyanın nasıl kurulduğunun anlaşılmasını sağlar. Genel olarak, BMP sinyalleşmesinde yer alan *dpp*, *gbb*, *tld*, *sog*, *tsg*, *tkv* ve *punt* gibi temel bileşenler *C.floridanus*, *Drosophila* ve farklı hymenoptera türleri arasında korunmuştur. İlginç bir şekilde *dpp* ve *gbb* gibi BMP sinyal ligandları *C.floridanus*'ta eksprese edilirken, *Drosophila* DV ekseninde oluşumunda yer alan *dpp* ile ilgili bir ligand olan *scw* eksprese edilmez. Ayrıca *C.floridanus*'ta tip I reseptör *sax* eksikken, yakın akraba *N. vitripennis*'te bulunur.

Bu kısımda, Rafiği ve arkadaşları [19] tarafından tanımlanan embriyonik zonlara göre gen ekspresyon paternleri analiz edilmiştir. *C. floridanus*'ta, bu zonların oluştuğu yumurta boyunca üç ana bölge vardır: anterior bölge, orta bölge ve posterior bölge (bölüm 2.1.1'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır). Oosit yeni verilen bir yumurtaya geçiş yaparken, dokuz germline geninin mRNA'ları veya proteinleri, 'zon' olarak adlandırılan dört hücre altı lokasyonda lokalize olur: zon 1 (germplazmanın %100 uzunluktaki arka kutuptaki atasal konumu) zon 2 (yaklaşık %80 yumurta uzunluğunda bulunur), zon 3 (yaklaşık %60 yumurta uzunluğunda bulunur) ve zon 4 (ön kutupta %0 yumurta uzunluğunda, dorsal taraf boyunca *Blochmannia*'nın anterior sınırına doğru uzanır) [19]. Bu bölgeleri dikkate alarak gelişimin farklı aşamalarında BMP sinyal genlerinin ekspresyon modelleri gösterilmiştir. Bununla birlikte, farklı ekspresyon paternleri de tanımlanmıştır.

Böcek embriyoları tipik olarak posterior veya tüm yumurta boyunca oluşsa da [77, 145], *C. floridanus*'un embriyosu anterior tarafta oluşur. Bu nedenle, *C. floridanus*'ta, analiz edilen BMP sinyal bileşenleri, birçok böceğin aksine embriyonik gelişim sırasında anteriorda lokalize ekspresyon paterni gösterir. Yumutanın posterior kısmında zon 1 'e karşılık gelen bölgede *Blochmannia* bulunur. *dpp*, *gbb* ve *tkv*'nin gelişimin 1. aşamasında zon 1'de eksprese olurken *tld*, *sog* ve *tkv* hücrel blastoderm aşamasında zone 1'de ekprese olur. Bakteriyositlerin bitişğinde, germ hücre öncülleri ve küçük bir *Blochmannia* popülasyonu, germline kapsülü adı verilen yeni bir hücre tipi ile sarılır. Germline kapsülü daha sonra arkaya doğru göç eder ve germ hücrelerinin ve küçük *Blochmannia* popülasyonunun bir sonraki nesle aktarıldığı embriyoya bağlanır [19]. BMP sinyalleşmesinin analiz edilen tüm bileşenleri, hücrel blastoderm aşamasında zon 2 olarak adlandırılan germline kapsülü bölgesinde eksprese

edilirken, yeni verilen yumurtada zon 2'de *punt* hariç diğer genler eksprese edilir. Hücresel blastoderm aşamasında, *dpp* ve *sog* amniyonda eksprese edilirken, sadece *sog* serosada eksprese edilir. Bu sonuçlar, endosimbiyont *Blochmannia* varlığında *C. floridanus* embriyogenezinin değişmesinin, BMP sinyalleme genlerinin gen ekspresyon paternini değiştirdiğini, dolayısıyla *C.floridanus*'un DV eksenini oluşumunun oryantasyonunun embriyogenezin değişmesine bağlı olarak kaydığını göstermektedir.

4.7.1. *C. floridanus* BMP ligandları: *dpp* ve *gbb* genlerinin ekspresyonları

Ligand *dpp* *C.floridanus*'un embriyonik gelişimi sırasında eksprese edilir (Şekil 4.13). *D. melanogaster*'de *dpp* genini kodlayan BMP ligandının ekspresyonu, blastoderm aşaması sırasında dorsal bölge ile sınırlıdır [146], aksine, *dpp*'nin ekspresyon modeli, *C.floridanus*'ta gelecekteki embriyoyu oluşturacak olan yumurtanın en ön bölgesinde gösterilir. Aşama 1'de (Şekil 4.13 a-c) zon 4'te yumurtanın anterior kutbunda ekspresyon ince bir tabaka olarak kısıtlanırken, germdiskindeki nükleer bölünmelere karşılık gelen aşama 2 ve 3'te bu ekspresyon genişler (Şekil 4.13 d-i). 4. aşamada, *dpp* bir at nalı alanı olarak eksprese edilir ve c şeklinde komşu ekstraembriyonik bölgeye doğru bir şerit oluşturur (Şekil 4.13 j-l). Bu şerit 5. aşamada kaybolur (Şekil 4.13 a-y). *dpp* ekspresyonu germdisk hücrelerinin apikal tarafına kıyasla bazal tarafta daha güçlüdür. Hücreleşmeden sonra, *dpp* ekspresyonu aşama 6 (Şekil 4.13 p-r) ve 7'de (Şekil 4.13 s-y) daha bazal hale gelir. Şerit tekrar 6. aşamada (Şekil 4.13 r) ekstraembriyonik serosa bölgesinin hemen altında oluşur, ancak bu aşama 4'tekine göre biraz daha uzundur. Aşama 8'de (Şekil 4.13 x-z), *dpp* germbandda eşit olarak eksprese edilir. Ekstraembriyonik membran serosada ekspresyonu yoktur, ancak hücresel blastoderm aşamasında amniyonda eksprese edilir (Şekil 4.13 a-y). Aşama 1-3'te dairesel bir şerit halinde zon 2'de eksprese edilen *dpp*, germline kapsülü oluşurken daha dairesel bir şekilde eksprese edilir. *dpp*, erken embriyoda zon 1'de bir ekspresyon gösterir, ancak daha sonra bakteriyositlerde eksprese edilmez.

Ligand *gbb* *C.floridanus*'un erken gelişimi sırasında eksprese edilir (Şekil 4.14). *D. melanogaster*'da *gbb* DV modellenmesinde hiçbir rol oynamaz, ancak kanat oluşumu gibi sonraki gelişim süreçlerinde gereklidir [127]. *C.floridanus*'ta ise embriyonik gelişim sırasında eksprese edilir. *gbb*, 1. Aşamada (Şekil 4.14 a-c) anterior bölgede ve 4. zonda hafifçe eksprese edilir, ancak daha sonra 2. aşamada (Şekil 4.14 d-f) yumurtanın dorsal ve ventral tarafında küçük üçgen şekiller oluşturan bir ekspresyon paterni ortaya koyar. Daha sonra bu ekspresyon

3. aşamada (Şekil 4.14 g-i) hafif bir şerit haline gelir. 4. Aşamada (Şekil 4.14 j-l), germdisk hücrelerinin apikal tarafına kıyasla bazal tarafında *gbb* ekspresyonu daha yoğundur. Bu aşamada muhtemelen embriyonun gelecekteki doku katmanlarından birini temsil eden dairesel bir ekspresyon paterni ortaya çıkar (Şekil 4.14 k). Hücreleşmeden sonra, *gbb* ekspresyonu aşama 6 (Şekil 4.14 p-r) ve 7'de (Şekil 4.14 s-y) daha bazal hale gelir. Aşama 8'de (Şekil 4.14 x-z), *gbb*, *dpp*'ye benzer şekilde germbandda eşit olarak eksprese edilir. Genel olarak, *gbb*'nin ekspresyonu embriyonik gelişim boyunca *dpp*'ye kıyasla daha düşüktür. İlginç bir şekilde, *dpp* 2. ve 3. aşamada zon 3'te eksprese edilmezken, *gbb* güçlü ve geniş bir şekilde eksprese edilir. Dorsal ve ventral tarafından bakıldığında ekspresyonun bandana şekli oluşturduğu (Şekil 4.14 g,h), lateral taraftan bakıldığında üçgen şeklinde sonlandığı (Şekil 4.14 i) görülmektedir. Ekstraembriyonik amniyon ve serosada saptanabilir bir ekspresyon yoktur. Her aşamada zon 2'de eksprese edilir. Ayrıca *gbb*, aşama 1'de zon 1'de eksprese edilirken, aşama 5'te hücreyel blastoderm embriyosunda zon 1'de eksprese edilmez. Hiçbir aşamada bakteriyosit bölgesinde ekspresyon yoktur. 2. zonda ve daha sonra germline kapsülünde *gbb*'nin ifadesi, *dpp*'ye benzer şekildedir.

4.7.2. *C. floridanus* BMP metalloproteazı: *tld* genin ekspresyonu

Metalloproteaz *tld*, embriyonik gelişimin farklı aşamalarında eksprese edilir (Şekil 4.15). Embriyoda daha az ekspresyon gösterirken bakteriyositlerde güçlü ekspresyon sergiler. *tld* ifadesi, *D. melanogaster*'da blastoderm embriyolarında dorsal bölge ile sınırlıdır [24, 129]. *C.floridanus*'ta *tld*, *gbb*'ye benzer şekilde 1. aşamada anterior bölgedeki zon 4'te hafifçe eksprese edilir. Ekspresyon, yumurtanın lateral bölgelerinde çizgiler olarak ortaya çıkar (Şekil 4.15 a). Aşama 2'de, gelecekteki germdiskteki ekspresyon paterni posteriora doğru genişler (Şekil 4.15 d-f). 4. aşamada, *tld* ekspresyonu oldukça düşüktür (Şekil 4.15 g-i). 5. aşamada, *tld*, germdisk hücrelerinin apikal tarafına kıyasla bazal tarafta daha güçlüdür (Şekil 4.15 j-l). Hücreleşmeden sonra, *tld*, aşama 6 (Şekil 4.15 a-y) ve 7'de (Şekil 4.15 p-r) germbandda daha bazal hale gelir. Ekstraembriyonik serosa bölgesinin yanında bir şerit oluşur ve aşama 5-7'de görülür (Şekil 4.15 j,k,m,n,p,q). 7. aşamada diğer aşamadakilere göre germbandda ekspresyon daha güçlüdür. Amniyon ve serosada ekspresyon yoktur. İlginçtir ki, bakteriyosit bölgesinde aşama 7 dışında güçlü bir ekspresyon vardır. *tld*'nin 2. bölgede ve daha sonra germ hattı kapsülündeki ekspresyonu diğer genlere benzerdir.

4.7.3. *C. floridanus* BMP antagonistleri: *tsg* ve *sog* genlerinin ekspresyonları

tsg ve *sog* bazı istisnalar dışında embriyonik gelişim sırasında benzer bir model gösterir (Şekil 4.16-18). *tsg* ve *sog*, 1. aşamada zon 4'te eksprese edilir, ancak *tsg* (Şekil 4.16 a-c) ekspresyonu *sog*'un ekspresyonuna kıyasla (Şekil 31 d-f) daha azdır. Ek olarak, *tsg* ifadesi 3. zonda lateral bölgeden bakıldığında bir L şekli oluşturur. Dorsal ve ventral taraftan bakıldığında, L şekillerinin iki ucu birleşmez ve noktalı bir şerit yapısı oluşturur (Şekil 4.16 a-c). 3. aşamada, *tsg* ve *sog* ekspresyonu anterior bölgede posteriora doğru genişler (Şekil 4.16 g-l). 4. aşamada, hem *tsg* hem *sog* bir at nalı alanı oluşturarak eksprese edilir (Şekil 4.17 a-f). Bu at nalı alanında *dpp*'ye benzer şekilde hem *tsg* hem de *sog* için dairesel bir ekspresyon (Şekil 4.17 b,e) saptanır. Aşama 4 (Şekil 4.17 c,f) ve 5'te (Şekil 4.17 i,l), *tsg* ve *sog* hücrelerinin apikal tarafına kıyasla bazal tarafta daha güçlüdür. Hücreleşmeden sonra, *tsg* ve *sog* ekspresyonu, 6. aşamada germbandın daha temeli olur (Şekil 4.18 b,e). *dpp* ve *tld* durumunda da oluşan şerit, *tsg* için 5. aşamada fakat daha uzun olarak oluşturularak bakteriyosit bölgesine ulaşır (Şekil 4.18 h). Şerit kısalsa da 6. aşamada (Şekil 4.18 b) ve 7. aşamada (Şekil 4.18 e) hala görülebilir durumdadır. Ekstraembriyonik membran amniyon veya serosada *sog* eksprese edilirken *tsg* eksprese edilmez. Zon 2'deki ve daha sonra germline kapsülündeki *tsg* ve *sog*'un ekspresyonu, diğer genlere benzer şekildedir. Yeni bırakılan yumurtada hem *tsg* hem de *sog* için zon 1'de ekspresyon yoktur, ancak *sog* daha sonra hücrel blastodermdaki bakteriyositlerde eksprese edilir (Şekil 4.19 i). Bu, *tld* ekspresyonuna kıyasla daha düşük seviyelerdedir.

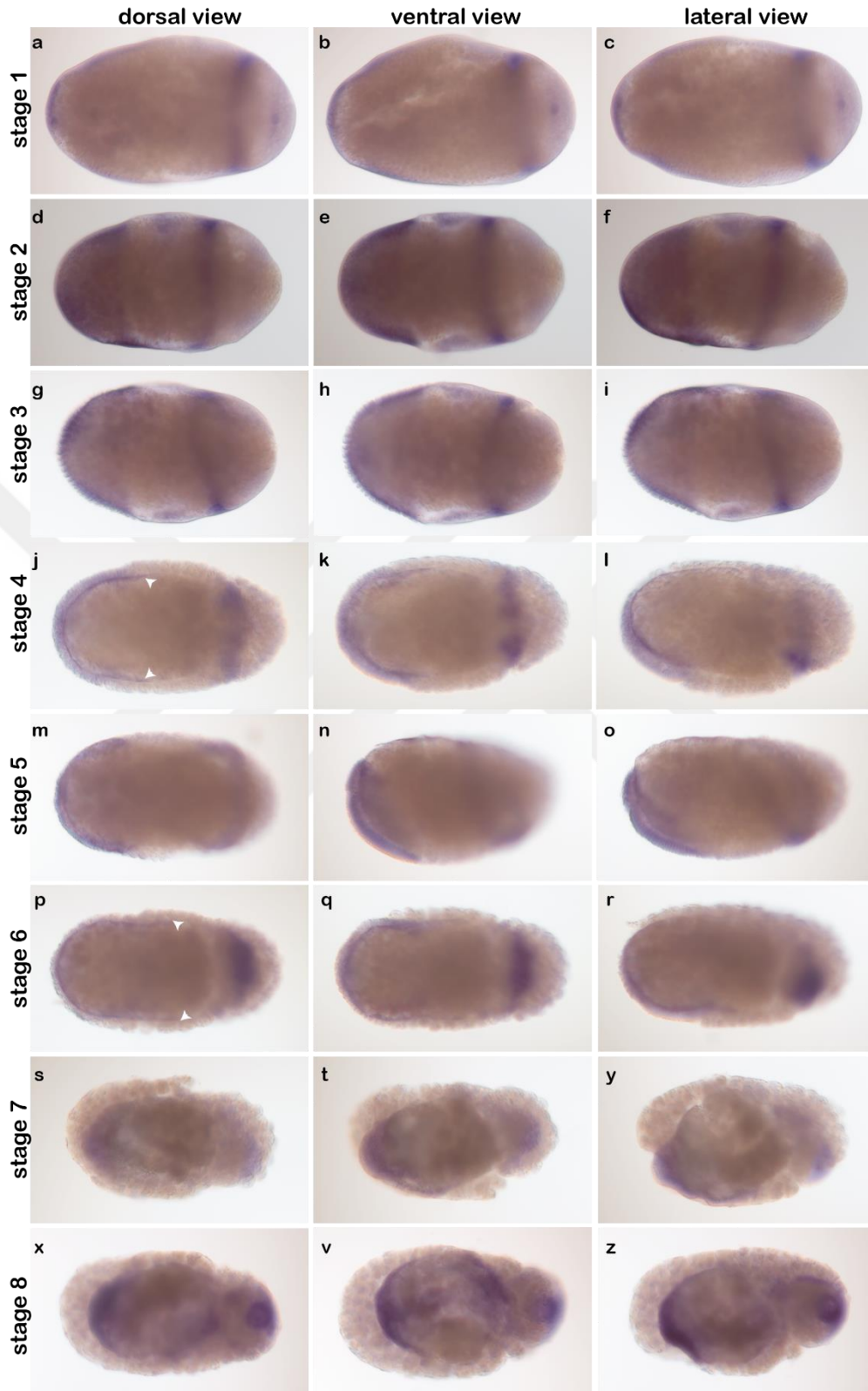
4.7.4. *C. floridanus* BMP reseptörleri: *tkv* ve *punt* genlerinin ekspresyonları

tkv ve *punt* bazı istisnalar dışında embriyonik gelişim sırasında benzer bir modelled ekspresyon gösterir (Şekil 4.19,20). Aşama 1'de, zon 4'te *tkv* eksprese edilmezken (Şekil 4.19 a-c), *punt* düşük seviyelerde eksprese edilir (Şekil 4.20 a-c). 3. aşamada, *tkv* ve *punt* anterior bölgede eksprese edilir (Şekil 4.19,20 g-i). 4. ve 5. aşamada, diğer genlerin ifadelerine benzer şekilde, germdisk hücrelerinin apikal tarafına kıyasla ekspresyon daha bazal taraftadır. Hücreleşmeden sonra, *tkv* ve *punt* 6. aşamada germbandda daha bazal haline gelir. Hem *tkv* hem *punt*, zon 3'te lateralden bakıldığında, küçük dikdörtgenler oluşturarak eksprese edilir (Şekil 4.19,20 d-i). Bu dikdörtgenler dorsal ve ventral olarak uzanırlar. *tkv* ve *punt* amniyon ve de serosada eksprese olmazlar. Hücrel blastodermda zon 2'de diğer genlere benzer şekilde eksprese edilir, ancak *punt*, *tkv*'den farklı olarak yeni bırakılan yumurtada zon 2'de eksprese

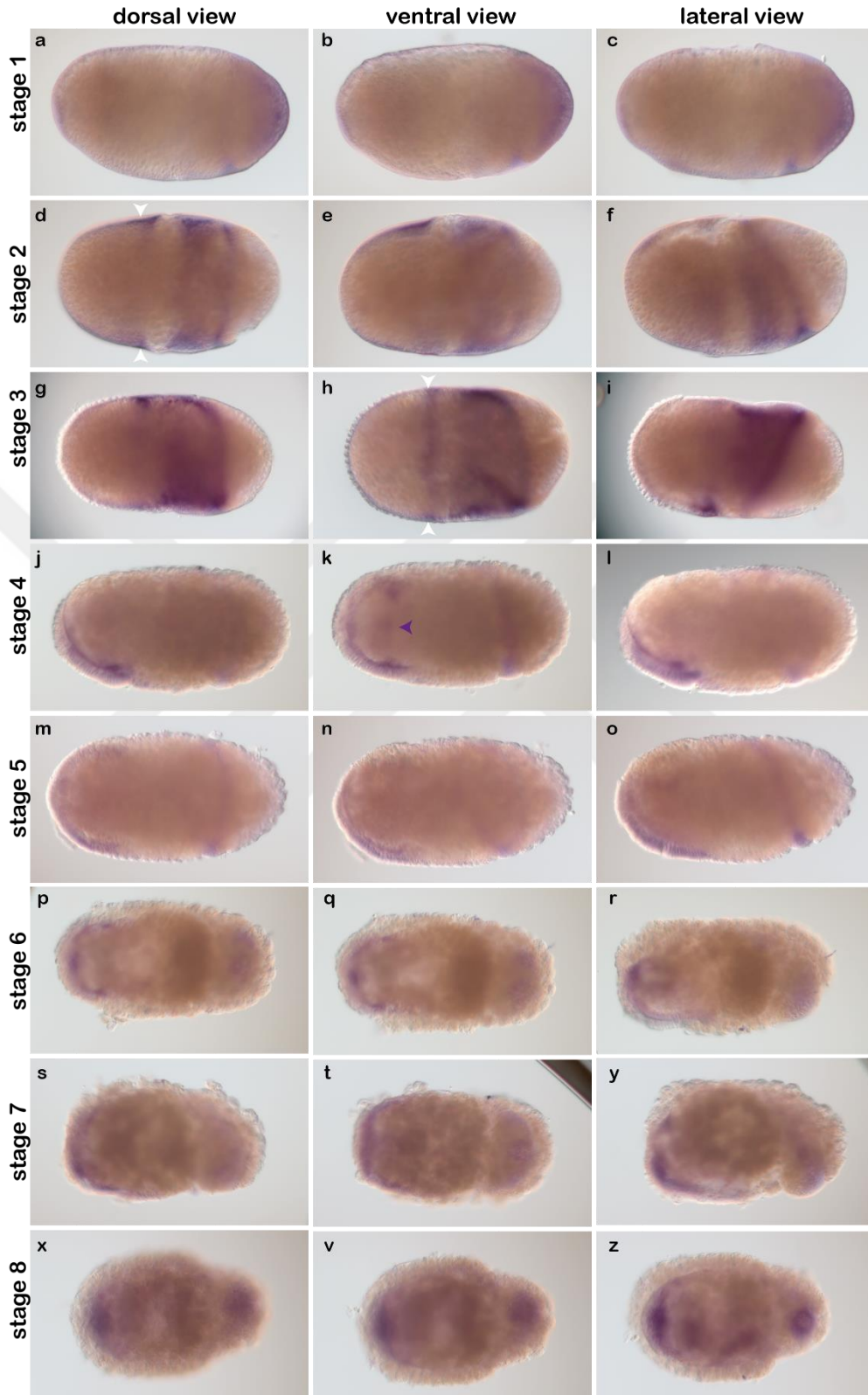
edilmez (Şekil 4.20 a-c) Zon 1'de, *tkv* eksprese edilir (Şekil 4.19 a-c) ancak *punt*, yeni bırakılan yumurtalarda ve daha sonraki hücresel blastoderm aşamasında zon 1'de eksprese edilmez.

Özet olarak, *C. floridanus* BMP sinyal genlerinin aşama 1 yumurtalar ve aşama 5 embriyolardaki zonlar arasında dinamik ifadesi tablo 4.1'de gösterilmiştir. *C.floridanus* BMP sinyal genlerinin lokalizasyonunun gösterimi de şekil 4.21'de gösterilmiştir.



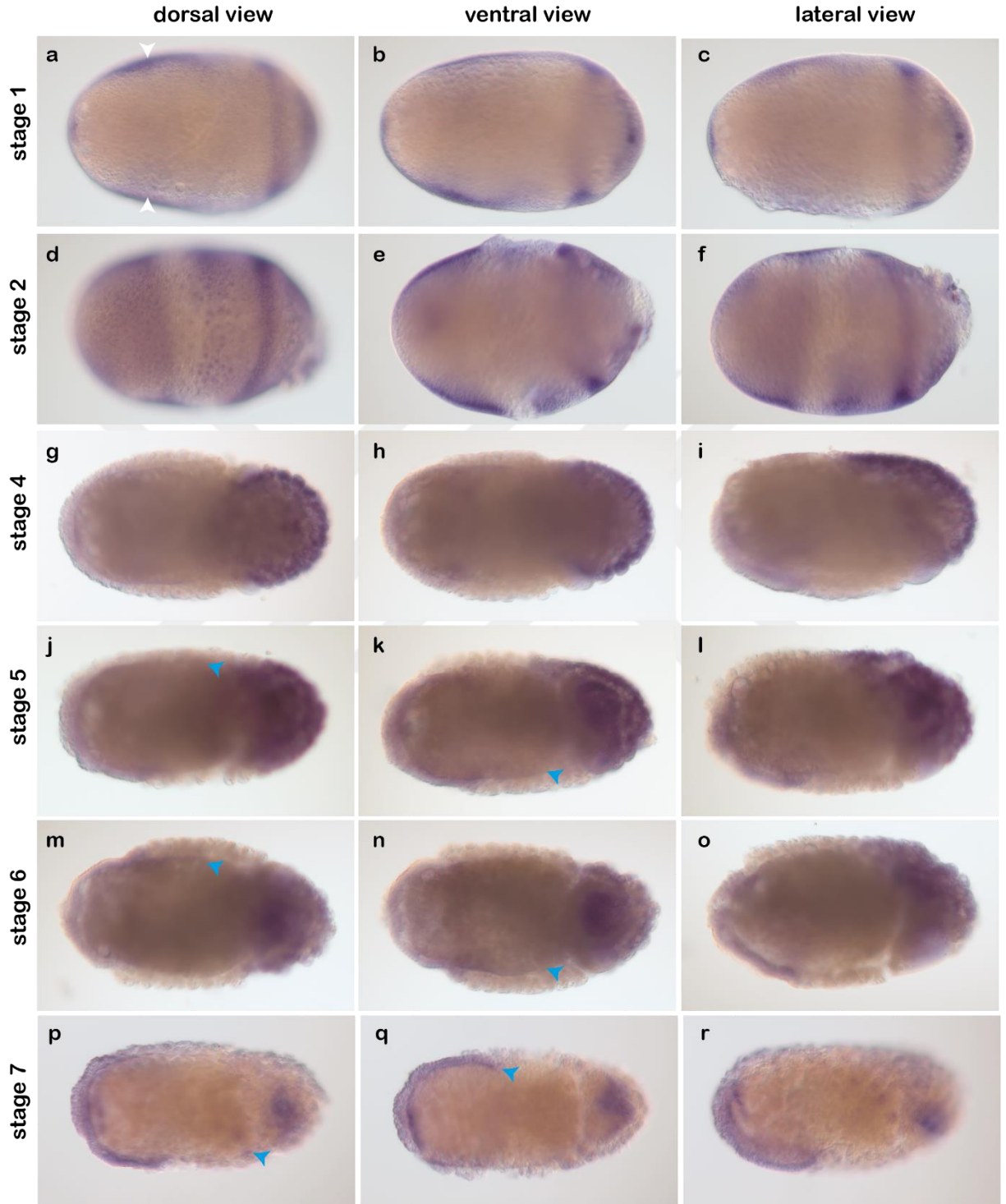


Şekil 4.13: *C. floridanus*'un farklı embriyonik aşamalarında *dpp* ekspresyonu. Beyaz ok uçları, 4. ve 6. aşamalarda ekstraembriyonik serosa bölgesini çevreleyen şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.

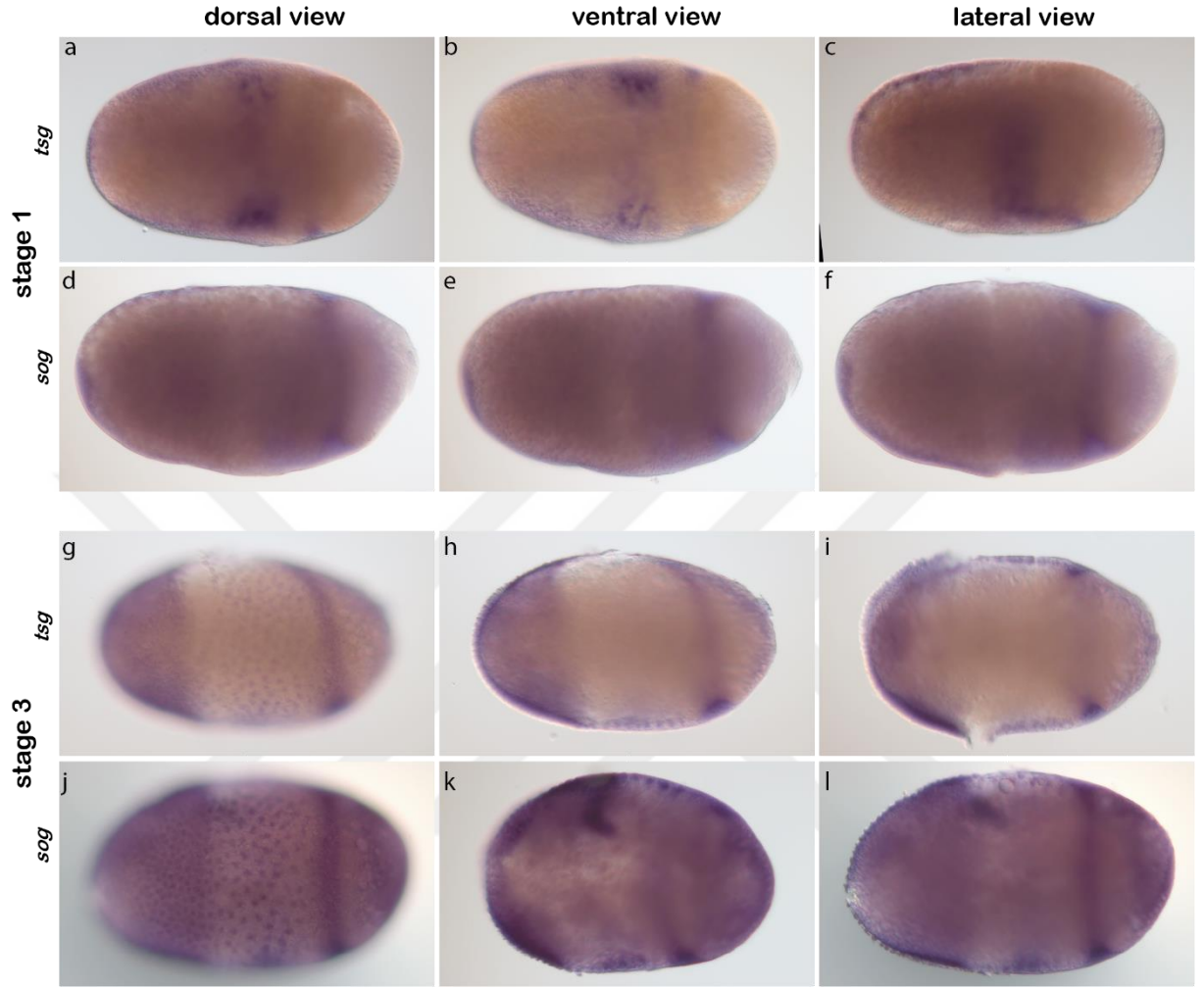


Şekil 4.14: *C. floridanus*'un farklı embriyonik aşamalarında *gbb* ekspresyonu. Beyaz ok uçları, 2 ve 3. Aşamalardaki germdiskteki ifadenin üçgen ve daha

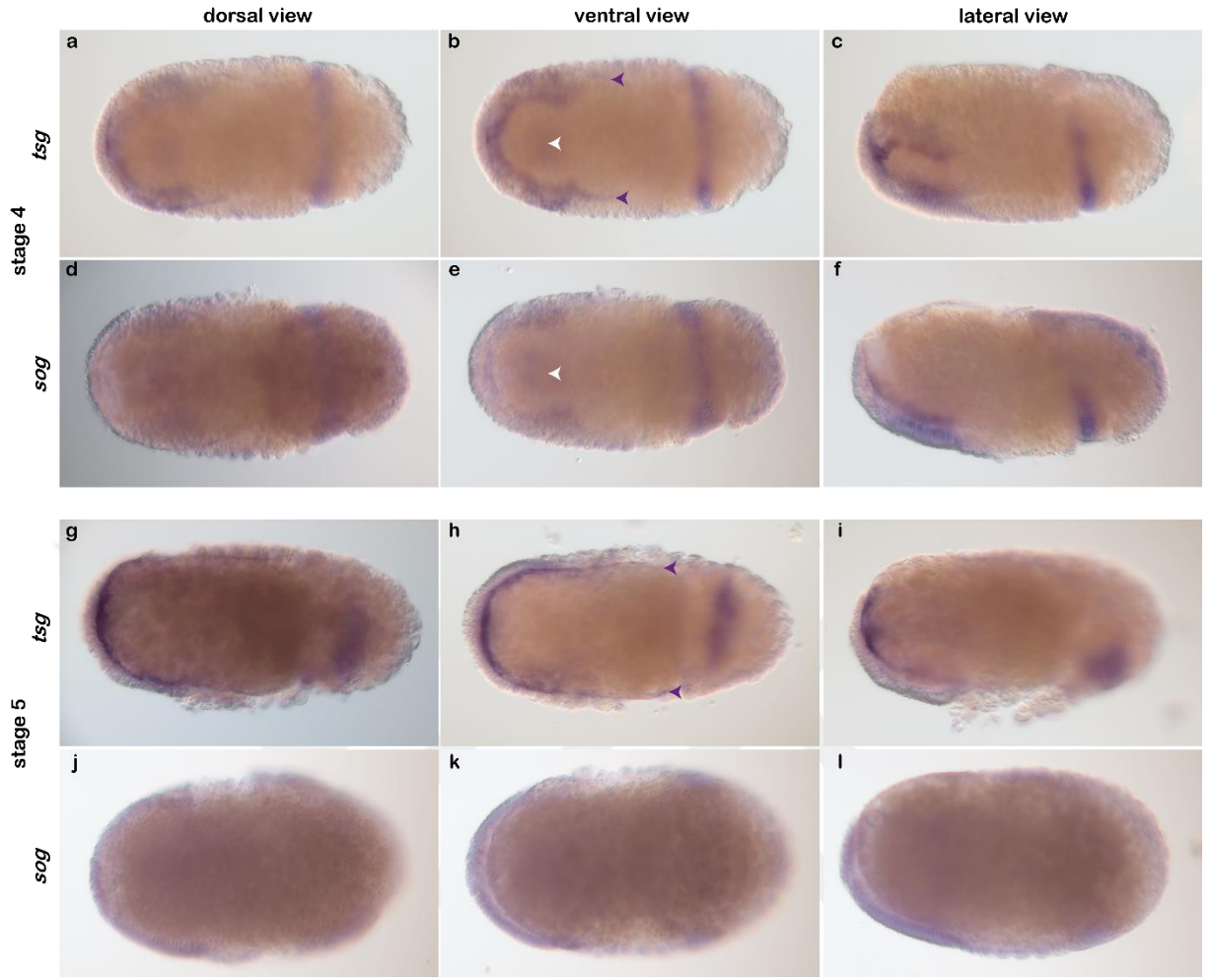
sonraki çizgi modelini ve ayrıca 4. aşamadaki dairesel alanı temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.



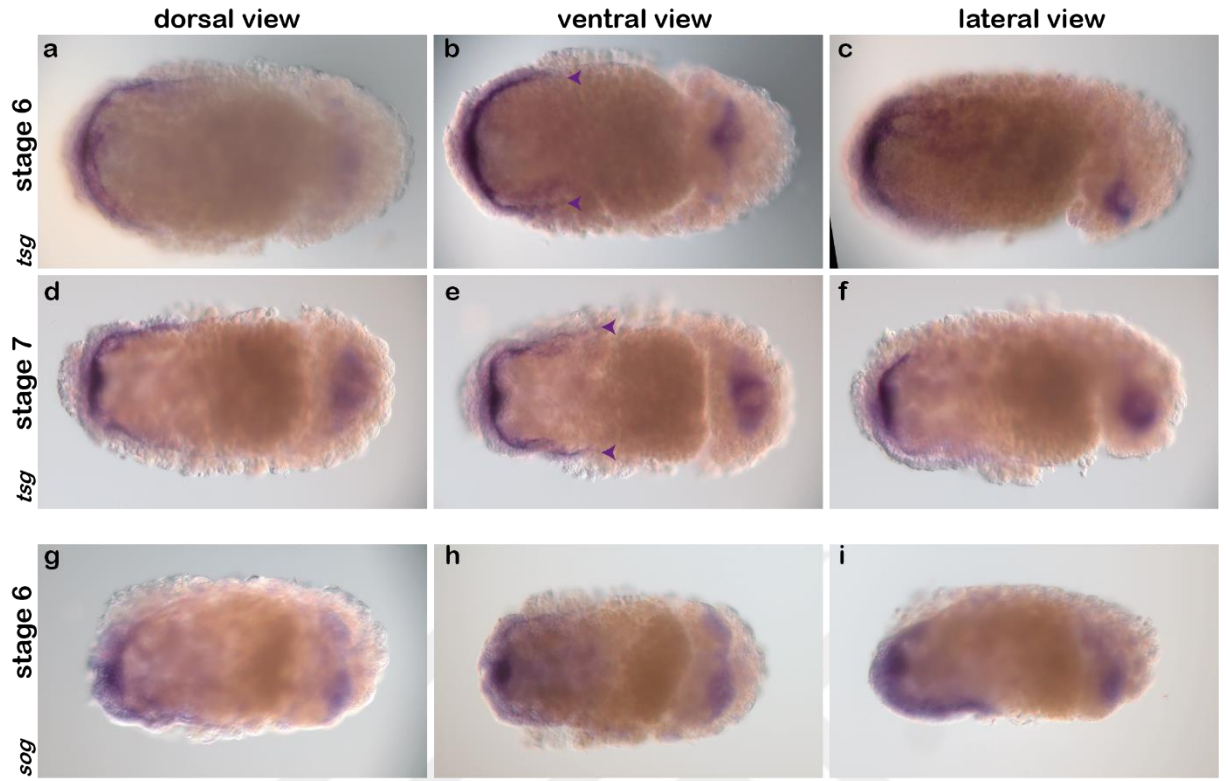
Şekil 4.15: *C. floridanus*'ta farklı embriyonik aşamalarda *tld* ekspresyonu. Beyaz ok uçları, anterior bölgedeki ifadeyi temsil eder ve mavi ok uçları, farklı aşamalarda ekstraembriyonik serosa bölgesine komşu olan şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.



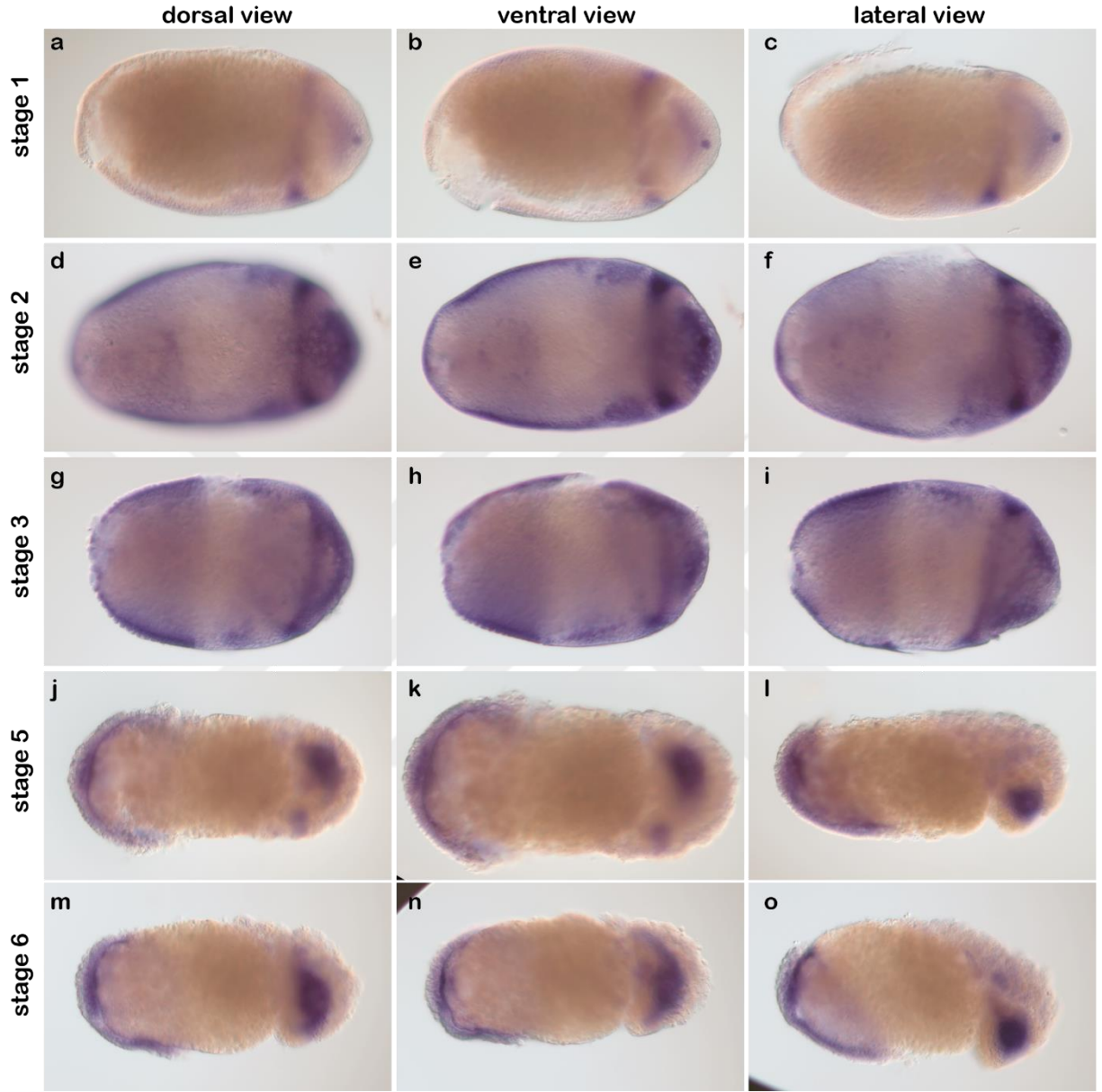
Şekil 4.16: *C. floridanus*'ta erken embriyoda *tsg* ve *sog* ekspresyonları. Anterior sol posterior sağdır.



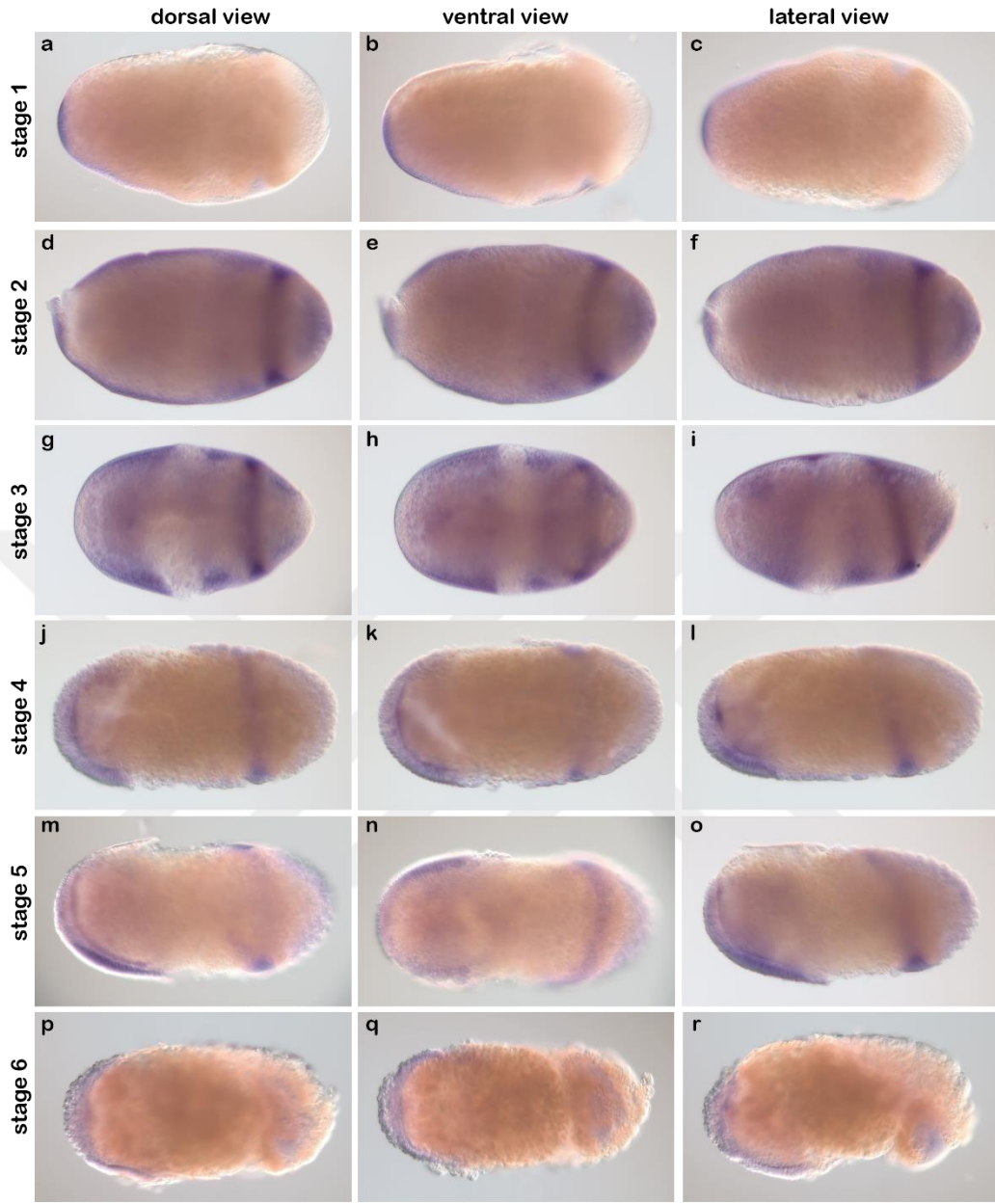
Şekil 4.17: *C. floridanus*'ta hücreleşme öncesi ve sırasındaki embriyolarda *tsg* ve *sog* ekspresyonları. Beyaz ok uçları 4. aşamadaki dairesel ekspresyon modelini ve mor ok uçları 4. ve 5. aşamalarda ekstraembriyonik bölgeyi çevreleyen şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.



Şekil 4.18: *C. floridanus*'ta hücreleşmeden sonra *tsg* ve *sog* ekspresyonları. Mor ok uçları, 6. ve 7. aşamada ekstraembriyonik bölgeyi çevreleyen şeridi temsil eder. Anterior sol posterior sağdır.



Şekil 4.19: *C. floridanus*'ta embriyonik gelişim aşamalarında *tkv* ekspresyonu. Anterior sağ posterior soldur.

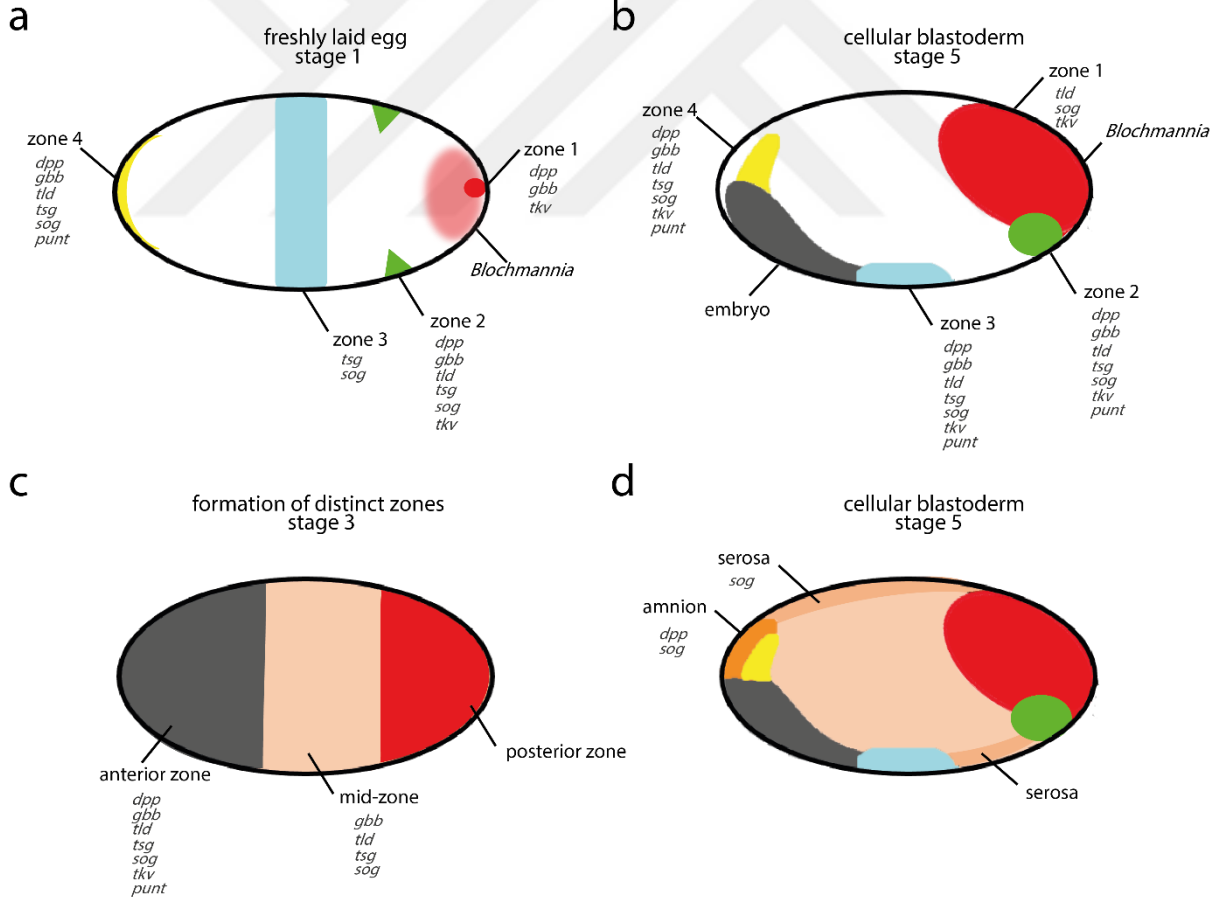


Şekil 4.20: *C. floridanus*'ta embriyonik gelişim aşamalarında *punt* ekspresyonu. Anterior sağ posterior soldur.

Tablo 4.2: *C.floridanus*'un aşama 1 yumurtalarında ve aşama 5 embriyolarında zonlar arasında BMP genlerinin ifadesi.

Genes	stage 1				Genes	stage 5			
	zone 1	zone 2	zone 3	zone 4		zone 1	zone 2	zone 3	zone 4
<i>dpp</i>	+	+	-	+	<i>dpp</i>	-	+	+	+
<i>gbb</i>	-	+	-	+	<i>gbb</i>	-	+	+	+
<i>tld</i>	+	+	-	+	<i>tld</i>	+	+	+	+
<i>tsg</i>	-	+	+	+	<i>tsg</i>	-	+	+	+
<i>sog</i>	-	+	+	+	<i>sog</i>	+	+	+	+
<i>tkv</i>	+	+	-	-	<i>tkv</i>	+	+	+	+
<i>punt</i>	-	-	-	+	<i>punt</i>	-	+	+	+

* '+' varlığı ve '-' yokluğu ifade eder.



Şekil 4.21: *C. floridanus* BMP genlerinin zonlar arasındaki ekspresyonlarının şematize gösterimi. Yeni bırakılan yumurtada (a), hüresel blastoderm aşamasında (b); aşama 3 (c)'te üç ayrı zon oluşumu ve bu zonlarda *C.floridanus* BMP genlerinin ekspresyonu, ekstraembriyonik amniyon, serosa oluşumu ve ekstraembriyonik dokularda *C.floridanus* BMP genlerinin

ekspresyonu (d) şematize edilmiştir. Yumurta ve embriyodaki farklı bölgeler ve dokular renklerle temsil edilmiştir: zon 1 (kırmızı), zon 2 (yeşil), zon 3 (mavi), zon 4 (sarı), amniyon (turuncu), serosa (açık turuncu). Anterior sağ posterior soldur ve embriyolar lateral konumlandırılmıştır.

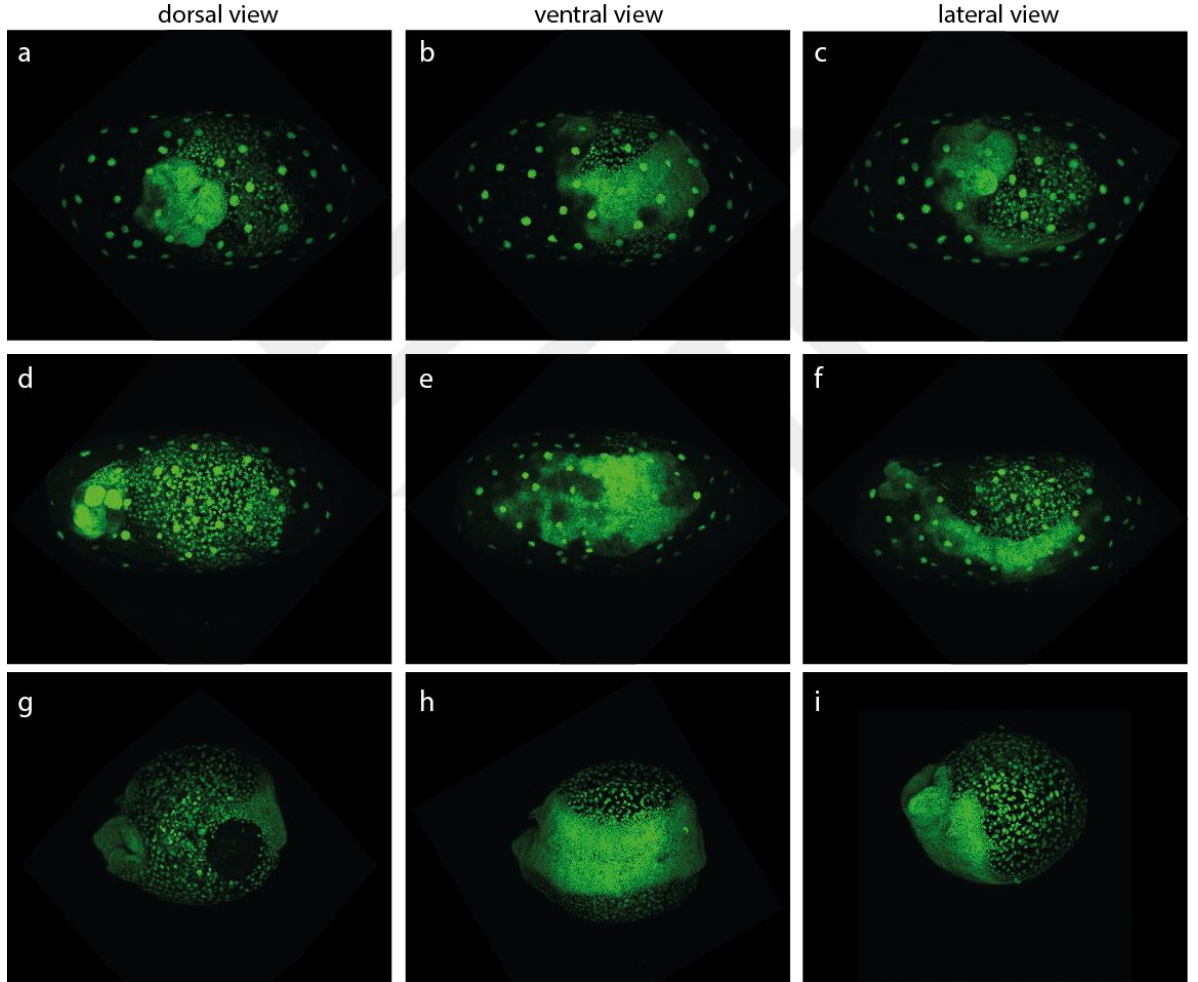
4.8. *C. floridanus*'ta BMP SİNYALİZASYONUNUN İŞLEVİ

Çift zincirli RNA'ların enjeksiyonu yoluyla gen ekspresyonunun hedeflenen susturulması, böceklerdeki genlerin fonksiyonel analizinde önemli bir araç haline gelmiştir [147, 148]. *C. floridanus*'ta, dsRNA'ların enjeksiyonuyla BMP sinyalizasyonunda kilit genler olan *dpp* ve *sog* için mikroenjeksiyon yoluyla gen susturma deneyleri yapıldı. Bu, BMP sinyal yolunun *C. floridanus*'taki rolü ve işlevini araştırmamıza olanak sağladı.

dpp'nin susturulması, DV eksenini boyunca embriyonun temel doku tabakaları olan, dorsal ektoderm, nörojenik ektoderm, mezoderm gibi dokuların oluşumunun *C. floridanus*'ta BMP sinyalinin kontrolü altında olabileceğini ortaya çıkardı (Şekil 4.22). Genin susturulması ile elde edilen fenotiplerde, embriyonun farklı doku tabakalarına sahip olması gerekirken tek bir doku tabakasıyla geliştiği ortaya kondu. *Drosophila* ve diğer böceklerde *dpp* ekspresyonunun kaybı, embriyoda ventralizasyonla sonuçlandığından *C. floridanus*'ta da dorsal bölgede sinyal akışı kesildiğinden ventral bölgedeki dokuların oluşuma izin verildiği ve tek bir doku oluşumu söz konusu olabileceği düşünüldü. DV eksenini boyunca dokuların kendi kimliklerini kaybedebileceği ve/veya farklı bir doku kimliği kazanabileceğini muhtemeldir. Bununla birlikte, embriyonun segmentlerinin ve baş uzantılarının düzgün şekilde oluşmadığı da görüldü. Ayrıca *dpp*'nin susturulması dolayısıyla BMP sinyalinin azalması durumunda serosa ve amniyonun bu durumdan etkilenmediği de gösterilmiştir.

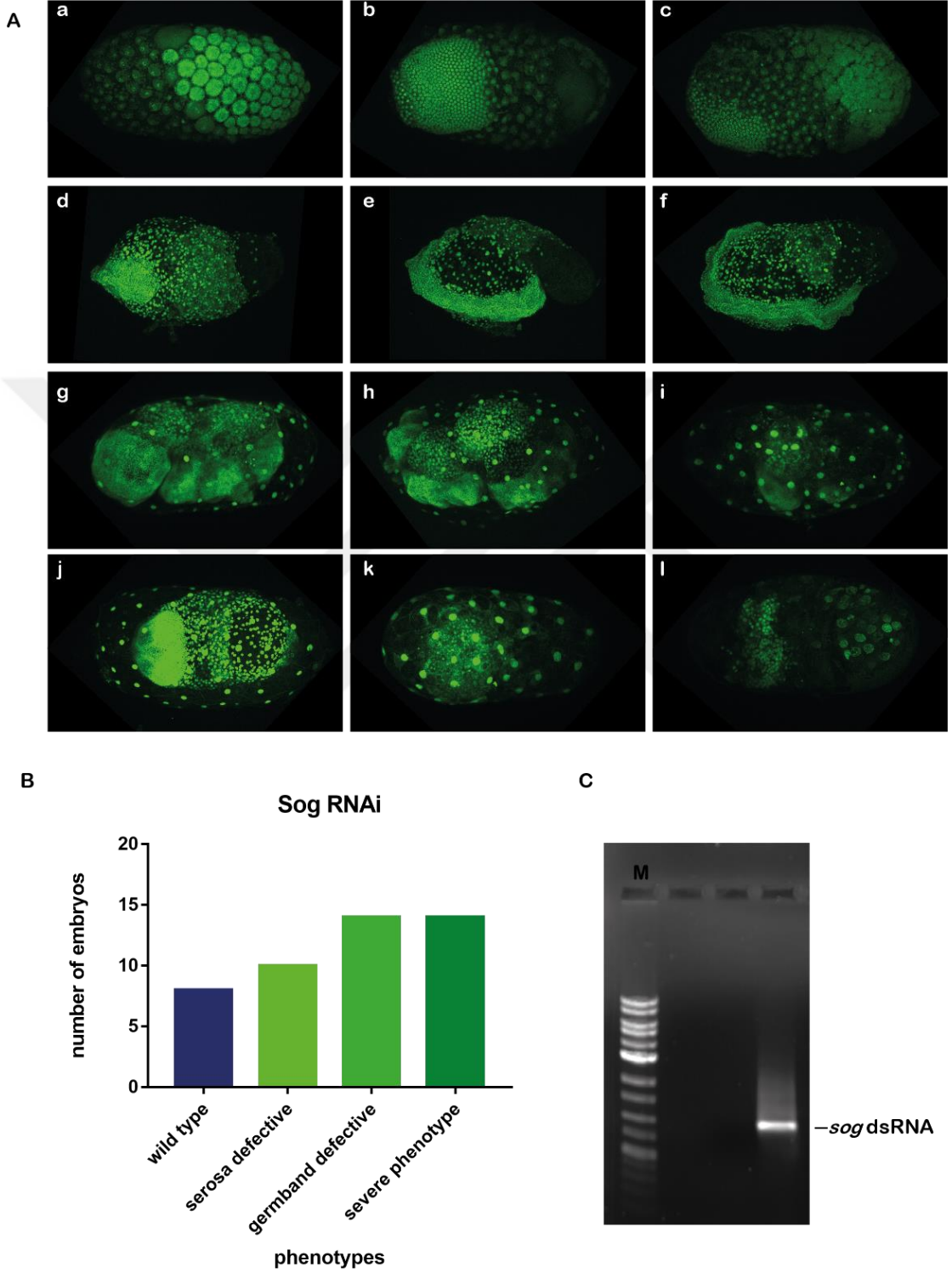
sog'un susturulması, *sog*'un hem ekstraembriyonik membran oluşumu hem de embriyonun formasyonunda rol oynadığını ortaya koydu (Şekil 4.23). Temel olarak, gözlemlenen fenotipler üç gruba ayrıldı: "fenotip 1" serosa kusurlu mutantlar; "fenotip 2", germband kusurlu mutantlar; "fenotip 3" ise şiddetli fenotipler olarak gruplandı. Serosa kusurlu mutantlar, ekstraembriyonik serosa oluşturamadı. Yolk üzerinde saptanan farkı büyüklükteki nükleuslar nedeniyle serosanın kendi kimliğini kaybedip amniyon benzeri bir kimlik kazanmış olabileceği düşünüldü. Bununla birlikte germband, bakteriyositler ve germline kapsülü düzgün bir şekilde oluşturulmuştur (Şekil 4.23 d-f). Germband kusurlu mutantlar durumunda, embriyonun germbandı iki veya üç ana parça olarak oluşturulmuştur. Segmentler ve baş çıkıntıları oluşamamıştır (Şekil 4.23 g-i). Serosa kusurlu mutantların aksine, bu mutantlar amniyonun yanı sıra ekstraembriyonik serosa

da oluşturabildiler. Şiddetli bir fenotipe yol açan üçüncü fenotip, embriyonun herhangi bir uygun özelliğini oluşturamadı. Bazılarında germbandda kısalma (Şekil 4.23 j), bazılarının germdiski oluştuğu (Şekil 4.23 k), bazılarının yumurtanın bir yarısında germdisk, diğer yarısında ise bakteriyositlerin oluştuğu gösterilmiştir (Şekil 4.23 l). Şiddetli fenotip olarak adlandırılrsa da, *sog* yıkımı ile BMP sinyalinin azalmasının embriyo üzerinde farklı etkileri olduğundan, ekstraembriyonik membranda veya embriyoda kusurla sonuçlanan bir eşik veya spesifik bir aşama olabilir.



Şekil 4.22: *C. floridanus*'a *dpp* injeksiyonu sonucunda elde edilen fenotipler. Aşama 12 (a-c) ve aşama 14 (d-f)'de sabitlenen embriyolar, embriyonik dokuların, kafa uzantılarının ve segmentlerin oluşumunda kusurlu fenotipler göstermiştir. (g-i) embriyolarında serosa

uzaklaştırılmıştır. Görüntüler DAPI ile boyanan embriyolardan konfokal mikroskop ile elde edilmiş ve yeşil filtre kullanılmıştır. Anterior solda posterior ise sağdır.



Şekil 4.23: *C. floridanus*'ta *sog* injeksiyonu sonucunda elde edilen farklı fenotipler. (A) Aşama 6 (a-c)'de sabitlenen embriyolar vahşi tip olarak gelişmiştir, aşama 8'de (d-f) serosa kusurları gösterilir ve aşama 12 (g-i) germband kusurları olarak gösterilir. Şiddetli

fenotipler de gözlenmektedir (j-l). Görüntüler DAPI ile boyanan embriyolardan konfokal mikroskop ile elde edilmiş ve yeşil filtre kullanılmıştır. (B) Grafik, farklı fenotipleri ve enjekte edilen embriyoların sayısını temsil eder. (C) Enjeksiyondan sonra dsRNA'nın bütünlüğünü kontrol etmek için *Cfl-sog* dsRNA'nın jel görüntüsüdür. M Marker DNA'yi simgeler. Anterior solda ve posterior ise sağdadır. Embriyolar dorsal (a,d), ventral (b), lateral (c), ventrolateral (e-i) olarak görüntülenmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

BMP sinyalinin, omurgalılarda ventral ve omurgasızlarda dorsal olan embriyonun nöral olmayan tarafında en aktif olduğu bilinmektedir [116, 134]. BMP sinyali, *Drosophila* embriyosunu DV eksen boyunca düzenler ve tüm DV polaritesi için gereklidir [82]. Diğer birçok hayvan türünde BMP sinyalinin DV polaritesi oluşturmak için en yaygın olarak kullanılan sistem olduğu bilinmektedir [35]. Hücrel endosimbiontlara ev sahipliği yapan böcekler söz konusu olduğunda, ev sahibi gelişimsel gen düzenleyici ağı endosimbiont ve konağın hücreleri arası sinyalleri arasındaki etkileşimler nedeniyle DV eksen oluşumunu anlamada zorluklarla karşılaşılır. Burada, BMP sinyalizasyonunu araştırarak endosimbiont varlığında DV patern oluşumu karakterize ettik. BMP sinyal genleri çoğu böcek türünde çoğunlukla korunduğundan, BMP sinyalizasyonun temel bileşenleri, DV paternini işlevsel temeli ile incelememize izin verir. *dpp* ve *gbb* ligandları; metalloproteaz *tld*; antagonistler *tsg* ve *sog*; reseptörler *tkv* ve *punt* için yapılan gen ekspresyon çalışmaları, *C.floridanus* DV ekseninin oluşumu hakkında genel bir bilgi sağladı. Bununla beraber, *C. floridanus dpp*'yi ve *sog*'u hedefleyen RNAi, *C.floridanus*'ta BMP sinyalizasyonunda kilit role sahip iki önemli genin işlevlerinin test edilmesini sağladı. Erken embriyolar, gen ekspresyon paternlerini analiz ederek DV'nin spesifikasyonunu tanımlamamıza izin verdi. Analiz edilen tüm genler erken aşamalarda eksprese edilir ancak DV eksenini boyunca embriyonik dokuların spesifikasyonu için 4. aşama kritik görünmektedir. Tüm genler, bu aşamada at nalı şeklinde bir desen gösterir ve ekspresyon, apikal tarafa kıyasla bazal tarafta daha güçlüdür. Ek olarak, hücrel blastoderm aşamasından sonra tüm genler benzer bir model gösterir. Bu durum zaten blastoderm aşamasından sonra bir DV modeli verecek şekilde konumlandıkları anlamına gelebilir.

Filogenetik analizler, *C.floridanus*'ta *dpp*, *gbb* ligandlarının bulunduğunu, ancak *scw* ligandının bulunmadığını ortaya koydu. Bu, *scw*'in *dpp* ile etkileşiminin böcek evriminde geç ortaya çıktığını gösterir. *dpp* *C. floridanus* embriyonik gelişim süresince eksprese edilir . Bu durum *dpp*'nin böcekler arasında korunmuş bir role sahip olduğunu göstermektedir. *dpp*'nin yıkılması, embriyonik doku kimliğinin kaybıyla sonuçlanmış ve muhtemelen embriyonun ventralizasyonuna neden olmuştur. Bununla birlikte, bu sonuca kesin olarak varmak için, RNAi sonrası doku katmanlarının dokuya özgü marker genler tarafından doğrulanması gerekir. Öte yandan *gbb*, *D. melanogaster*'da DV eksenini oluşumunda hiçbir rolü yokken *C.floridanus*'ta eksprese edilmektedir. Aynı hymenoptera böcek takımındaki yakın akraba *N. vitripennis*, iki

gbb homologuna sahiptir. Her iki gen de zayıf, maternal ve erken embriyogenez sırasında her yerde eksprese edilir. Gastrulasyondan sonra Nv-*gbb1* eksprese edilirken Nv-*gbb2* ifadesi gider [135]. *C.floridanus*'ta ise *gbb* embriyoda hafifçe eksprese edilir, ancak amniyon veya serosada eksprese edilmez. Ek olarak, *gbb*'nin susturulmasına ilişkin ön veriler (veriler gösterilmemiştir), vahşi tip embriyonik fenotip ile sonuçlanırken, *gbb-dpp*'nin birlikte susturulması (veriler gösterilmemiştir) çoğunlukla şiddetli fenotiplerle sonuçlanmıştır. Bu, *gbb*'nin DV modellenmesinde tek başına bir rol üstlenmediğini ancak scw bulunmadığından ve *gbb* ile *dpp* susturulmasının birlikte bir fenotipe yol açtığından Dpp ile bir heterodimer yapabilme olasılığı vardır.

dpp ve *gbb* tarafından üretilen hücre dışı BMP sinyali, tip I ve tip II reseptörlerin oluşturduğu tetramerik reseptör kompleksleri aracılığıyla iletilir. Filogenetik analizler, *C.floridanus*'un iki *Drosophila* Serin-Treonin kinaz reseptörü ortologuna sahip olduğunu ortaya çıkardı: BMP tip I reseptörler, Tkv ve ayrıca tip II reseptör Punt, BMP tip I reseptör Sax ise yoktur. *tkv* ve *punt*'un genel ifadesi, 1. aşama hariç benzerdir. Bu aşamada *punt*, yalnızca 4. zonda eksprese edilirken *tkv*, 1. ve 2. zonlarda eksprese edilir. Bu durum *tkv* ve *punt*'ın embriyonun erken değil hücreleşme aşamasıyla birlikte daha aktif bir rol üstlendiğini ortaya koyar. *Drosophila*'da, reseptörler yoluyla yüksek ve düşük miktarlarda Dpp aktivitesi [120], en az üç korunmuş hücre dışı modülatörün, Sog, Tsg ve Tld etkisinin aracılık ettiği, Dpp aktivitesinin dereceli bir dağılımını sağlar [25]. Filogenetik analizler, bu hücre dışı modülatörlerin *C. floridanus*'ta bulunduğunu ortaya koymuştur. *sog* ve *tsg* benzer bir ekspresyon paterni gösterir ancak *tsg* 1. aşamada zon 3'te eksprese edilirken *sog* eksprese edilmez. Ekspresyon paternleri, *tsg* ve *sog* mRNA'nın çoğunlukla farklı aşamalarda yumurtanın aynı bölgesinde lokalize olduğunu gösterir. Bu, hücre dışı bölgede ligandları bağlamak ve taşımak için *D. melanogaster*'dekine benzer bir şekilde birlikte hareket edebildiklerini düşündürür. Tsg/Sog/Ligand protein kompleksini kestiği bilinen *tld*; *tsg* ve *sog* ile benzer şekilde eksprese edilir. Bu, *dpp* etkinliğini modüle etmek için beklenen durumdur. *Sog* bakteriyosit bölgesinde eksprese edilse de ilginç bir şekilde, *sog* ve *tsg*'nin germdisklerde yoğun olarak eksprese edildiği, *tld*'nin daha az eksprese edildiği aşamalar olan 4-6 aşamalarında bakteriyosit bölgesinde *tld* güçlü bir şekilde eksprese edilir. 7. aşamada, tüm modülatörlerin ifadeleri benzerdir. Bu sonuçlar, *tld* ve *sog*'un, germline genleri düzenlemesinde gösterildiği gibi *Blochmannia* tarafından düzenlenebileceğini düşündürmektedir [75]. Bununla birlikte, *dpp*, *gbb* ve *tkv*, erken embriyoda zon 1'de eksprese edilirken, *tld*, *sog* ve *tkv*, hücresel blastoderm aşamasında zon 1'de eksprese edilir. Bu, *C.*

floridanus'un DV ekseninde konakçı ve endosimbiont arasındaki dereceli etkileşimi gösterebilir. Kısaca, erken embriyoda, *dpp* ve *gbb* ligandları, DV eksenini oluşturunun başlatılması için gerekli olabilir ve ilk aşamada *Blochmannia* tarafından düzenlenir. Daha sonra ligandlar, DV eksenini boyunca sonraki aşamalarda doku spesifikasyonunu başlatmak için *tld*, *sog* ve *tkv* tarafından modüle edilebilir. Bu süreç, bakteriyosit bölgesinde *tld* ve *sog* eksprese edildiğinden *Blochmannia* tarafından da düzenlenebilir. Genel olarak, erken embriyoda *dpp* ve *gbb*, sonraki aşamalarda *sog* ve *tld*, tüm aşamalarda *tkv*, zon 1'de eksprese edilir. Bu, *Blochmannia* ve konağın DV eksenini oluşumu için bir etkileşime içerisinde olabileceğini gösterir. *tld*'nin ekspresyonu diğer genlerden daha güçlü olduğundan, bakteriyositlerin hücreleşmesini ve bunun *C. floridanus*'un DV oluşumu üzerindeki rolünü anlamak için *tld*'nin susturulduğu mikroenjeksiyon deneyleri için iyi bir aday olması mümkündür. Bakterileri uzaklaştırmak ve endosimbiontların yokluğunda DV eksenini patern oluşumu için gen ekspresyonunun nasıl etkilendiğini görmek amacıyla antibiyotik muamelelerine de ihtiyaç vardır.

Drosophila'da BMP sinyalleme ile ilgili genler, dorsal ektodermi ve amniyoserosayı modellemek ve ayırt etmek için kullanılan embriyonun dorsal kısmında eksprese edilir [120]. *C. floridanus* durumunda, endosimbiontun varlığının, morfolojik olarak ekstraembriyonik zarların yumurtanın ortasına kayması ile ilişkili gibi görüldüğünü göstermiştir [19]. Bu, ekstraembriyonik dokuların yumurtanın anterior-dorsal veya dorsal tarafında oluştuğu diğer böceklerin çoğunun aksine bir durumdur [149]. Camponotini karıncalarında konak fenotipi ile endosimbiont arasındaki korelasyon, endosimbiontun bu karıncalardaki hücreler arası sinyal mekanizmalarıyla etkileşime girme olasılığını yükselttiğinden ekstraembriyonik doku oluşumu üzerinde de *Blochmannia*'nın etkisi olacağı düşünülür. Ekspresyon çalışmaları, amniyonda *dpp* ve *sog*'un eksprese edildiğini, serosada ise sadece *sog*'un eksprese edildiğini ortaya koyduğundan, bu bizi her iki gen için de gen susturulması çalışmalarını uygulamaya götürdü. RNAi fenotipi *sog* ekspresyonu ile uyumludur ve serosa ya kusurlu olarak oluşmuş ya da oluşmamıştır. *sog* susturulduğunda, germband tamamen oluşurken serosa düzgün şekilde oluşmaz. Bunun aksine diğer bir fenotipte, germband kusurludur ve serosa tamamen oluşur. Bu durum düşük veya yüksek BMP sinyali ile sonuçlanan *sog* susturulması için bir eşik seviyesi olabileceğini düşündürmektedir. *sog*'un susturulması durumunda *dpp*'leri bağlayacak bir antagonist eksik olduğundan BMP sinyali daha aktif olabilir ve bu durum doku oluşumunda bozukluklara neden olabilir. Farklı fenotiplerin ortaya çıkması bir diğer antagonist olan *tsg*

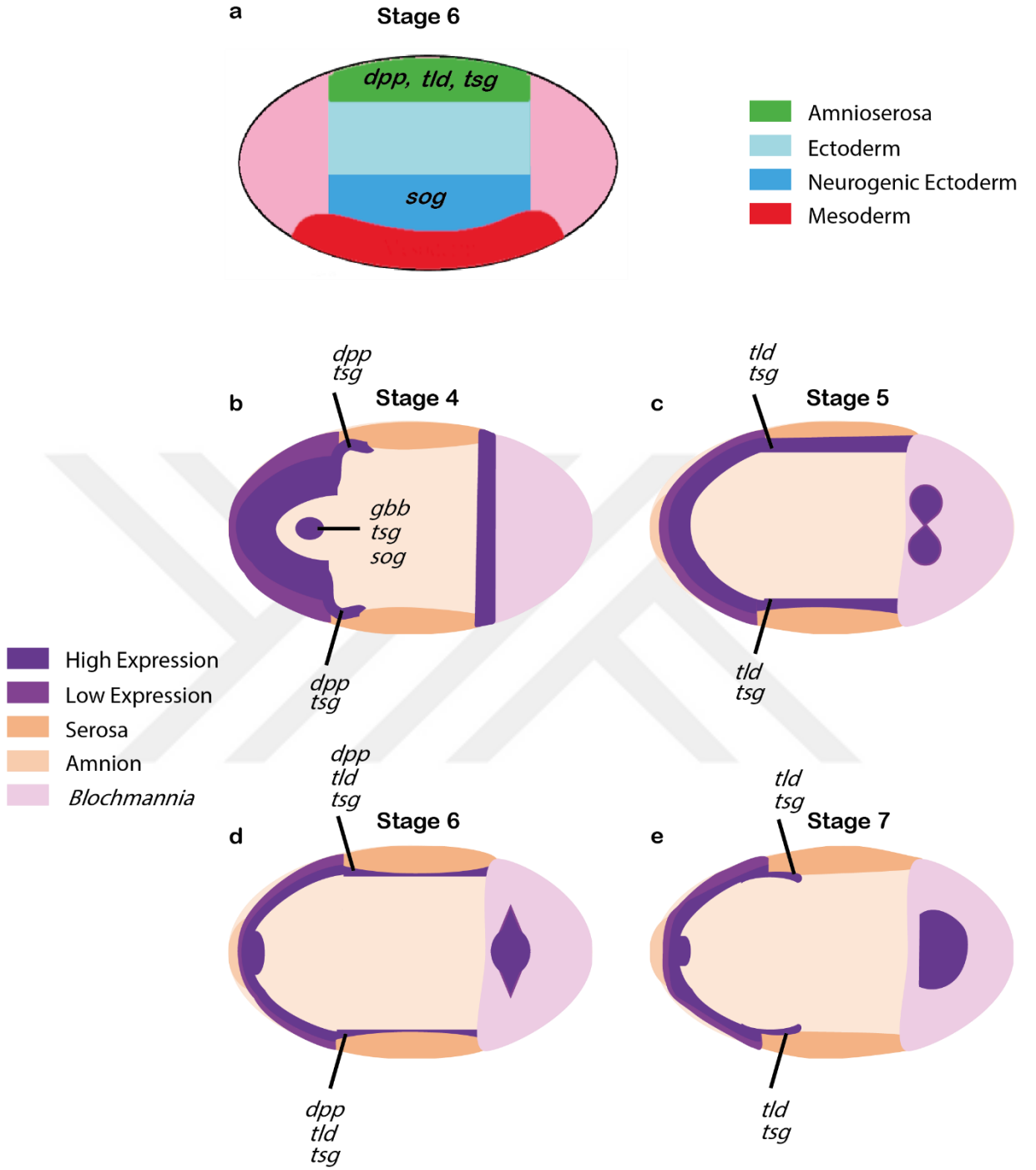
hakkında ip uçları verebilir. *sog*'un susturulması *tsg* tarafından telafi edilip farklı BMP eşik değerlerine yol açıyor olabilir. Bu, *tsg* susturulması ve *sog* ile *tsg*'nin birlikte susturulduğu deneyler ile netlik kazanabilir. Öte yandan, *dpp*'nin susturulması germband kusuruna neden olmuş ancak serosa oluşumunu etkilememiştir. Bu durum bize ekstraembriyonik membranların DV eksenini oluşumundan kısmi olarak etkilenebileceğini ve bu durumun ancak ekstraembriyonik dokular için kilit bazı genlerin yokluğunda meydana gelebileceğini düşündürür. Bunlara ek olarak, amniyon hücreli blastoderm evresinde ve sonrasında ayırt edilebilir ancak amniyonun kökeni halen tam olarak bilinmemektedir. *dpp* ve *sog* amniyonda eksprese olsa da bu genlerin susturulması, amniyon açısından belirgin bir fenotip ortaya koymamıştır. Erken aşamalardan sonraki aşamalara kadar spesifikasyonlarını takip etmek için ekstraembriyonik dokulara özgü belirteçler araştırılmalıdır.

Yukarıda bahsedildiği gibi, 4. aşama, doku spesifikasyonu için kritik görünmektedir ve tüm genler, at nalı benzeri bir model olarak eksprese olmaktadır, ancak sadece *gbb*, *tsg* ve *sog*, bu at nalı benzeri modelin ortasında dairesel bir ekspresyon göstermektedir. Bu, mezoderm ve birkaç çevreleyen hücre sırası olabilecek embriyonun ventralini gösteriyor olabilir. Buna ek olarak, *gbb* ve *tsg* erken aşamalarda 3. zonda benzer ve güçlü bir ifadeye sahiptir ve bu diğer genler için yumurtanın lateral taraflarındadır. Bu patern, erken aşamalarda doku spesifikasyonunun ilk işareti olabilir. Son olarak, embriyonik gelişimde *dpp* ve *tsg* ekspresyonu diğer genlere benzer ancak ekstraembriyonik bölgeye komşu bir şerit oluştururlar ve bu diğer genlerde oluşmaz. Bu şerit, ekstraembriyonik serosa ile gelecekteki yumurta kesesi arasında bir tür sınırdır. Bu ekspresyon, *dpp* ve *tsg*'nin, belirli dokularda BMP sinyalini kontrol ederek farklı dokular arasındaki sınırları belirlemek için DV eksenini oluşumu üzerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

C. floridanus'ta embriyonik gelişim *Blochmannia* varlığında radikal olarak değiştiğinden, DV ekseninin formasyonu ve dolayısıyla BMP sinyalizasyonu da değişmiştir (Şekil 5.1). *C. floridanus*'ta yumurtanın anterior ucunda ventral kısımda embriyo gelişir ve DV eksen de bu alanda kurulur. Elde edilen veriler BMP sinyalizasyonu için embriyonik gelişimin 4-6 aşamalarının kritik olduğu göstermiştir. Bu aşamalarda BMP sinyalizasyonunun ana genlerinin hepsi embriyoda eksprese olurken *dpp*, *gbb*, *tld*, *tsg*, *sog* diğer genlerden farklı ekspresyon paternleri gösterirler (Şekil 5.1 b-e). *Drosophila* düşünüldüğünde BMP sinyal yolunun ana elemanları olan hücre dışı modülatörler *sog*, *tsg* ve *tld*'in bu farklı ekspresyonlarda yer alması

DV eksen boyunca gelişen dokulara işaret ediyor olabilir. Aynı şekilde *dpp* de BMP sinyalizasyonun ana elamanlarından biridir ve *dpp* ekspresyonu da DV eksen boyunca sinyalizasyonun nasıl ilerlediği hakkında bilgi verir. İlginç bir şekilde *gbb* *C.floridanus*'ta bu farklı ekspresyon paternlerine katılır ve *scw*'in yokluğunda *dpp* ile sinerjistik bir etki gösteriyor olma olasılığı muhtemeldir. Yine de tüm bu varsayımların doğrulanabilmesi için doku spesifik marker genlere ihtiyaç vardır. Ayrıca *Blochmannia*'nın antibiyotikle uzaklaştırılması sonucunda gen ekspresyon paternlerinin incelenmesi, endosimbiyont varlığının DV eksen oluşumundaki sinyalizasyona nasıl katkı sağladığını ortaya çıkaracaktır.

Genel olarak bakıldığında, bu tez kapsamında ilk defa *C. floridanus*' ta DV eksen oluşumunu ele alınmış ve bu süreçlere endosimbiyontun katkısı gözden geçirilmiştir. BMP sinyal yoluna ait en önemli genlerin ekspresyonları incelenmiş ve sinyalizasyonda kilit etkiye sahip genler olan *dpp* ve *sog* için RNAi deneyleri yapılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak, doku spesifik marker genlerin tespiti ve kilit role sahip ligand ve reseptörler için RNAi deneyleri yapılması hem DV eksen boyunca oluşan dokuların tanımlanması hem BMP sinyal yolağının aydınlatılması hem de BMP sinyal yolağı ilişkili diğer yolakların ortaya çıkarılması için gereklidir. Bununla birlikte kolonilerden toplanan embriyoların sayıca fazla olması ileriki süreçlerde aynı anda birden fazla geni hem ekspresyon hem de fonksiyon açısından taramayı mümkün kılacaktır. Uzun vadede bakıldığında bu tez dahilinde, endosimbiyontun konağa entegrasyonunda gelişimin rolünü ve endosimbiyontun konak gelişimsel ağlarını nasıl etkilediğinin anlaşılmasına dair bir adım atılmıştır.



Şekil 5.1: *C. floridanus*'ta DV eksenini oluşumunda BMP sinyalizasyonunun şematize gösterimi. *Drosophila* DV eksenini oluşumunda BMP sinyalizasyonu (a). *scw*, *tkv* ve *sax* blastoderm aşamasında tüm embriyoda eksprese olurken, *dpp*, *tld* ve *tsg* amnioserosada; *sog* nörojenik ektoderimde eksprese olur. Yalnızca spesifik dokulardaki eksprese olan genler embriyo üzerinde gösterilmiştir. (b-c) *C. floridanus*'ta ise tüm BMP genleri embriyoda eksprese olur. Koyu mor yüksek ekspresyonu ve açık mor düşük ekspresyonu göstermektedir. Ayrıca spesifik bölgelerde eksprese olan genler embriyolar üzerinde belirtilmiştir. Renkler farklı embriyonik dokuları temsil etmektedir ve şekillerin yanlarında belirtilmiştir. *Drosophila* embriyosu lateral, *C. floridanus* embriyoları ise ventral konumlandırılmıştır. Anterior solda, posterior ise sağdadır.

KAYNAKLAR

1. Stoll, S., H. Feldhaar, and R. Gross. 2009, Transcriptional profiling of the endosymbiont *Blochmannia floridanus* during different developmental stages of its holometabolous ant host, *Environmental Microbiology*, 11(4), 877-88.
2. Koga, R. and N.A. Moran. 2014, Swapping symbionts in spittlebugs: evolutionary replacement of a reduced genome symbiont, *Isme Journal*, 8(6), 1237-1246.
3. Mergaert, P., et al., 2017, Metabolic Integration of Bacterial Endosymbionts through Antimicrobial Peptides, *Trends in Microbiology*, 10.1016/j.tim.2017.04.007.
4. Moran, N.A., 2002, Genome evolution in symbiotic bacteria - Genomic analysis opens path to analyzing obligate symbionts, among the most intriguing and varied of noncultivable bacteria, *American Society for Microbiology News*, 68(10), 499-505.
5. Moran, N.A. and A. Mira. 2001, The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*, *Genome Biology*, 2(12).
6. Sabree, Z.L., et al., 2012, Genome Shrinkage and Loss of Nutrient-Providing Potential in the Obligate Symbiont of the Primitive Termite *Mastotermes darwiniensis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 204-210.
7. Sloan, D.B. and N.A. Moran. 2012, Genome Reduction and Co-evolution between the Primary and Secondary Bacterial Symbionts of Psyllids, *Molecular Biology and Evolution*, 29(12), 3781-3792.
8. Wernegreen, J.J., A.O. Richardson, and N.A. Moran. 2001, Parallel acceleration of evolutionary rates in symbiont genes underlying host nutrition, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3), 479-485.
9. Zheng, H., et al., 2016, Metabolism of Toxic Sugars by Strains of the Bee Gut Symbiont *Gilliamella apicola*, *American Society for Microbiology Mbio*, 7(6).
10. Buchner, P., Endosymbiosis of animals with plant microorganisms, 1965, New York: Interscience Publishers.
11. Sameshima, S., et al., 1999, Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence, *Zoological Science*, 16(6), 993-1000.
12. Sauer, C., et al., 2000, Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1877-1886.
13. Wernegreen, J.J., et al., 2003, Genome evolution in an insect cell: Distinct features of an ant-bacterial partnership, *The Biological Bulletin*, 204(2), 221-231.

14. Blochmann, F., 1882, Über das Vorkommen bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten, *Zbl Bakteriol.*, 234-240.
15. De Souza, E.M., C.E. Granada, and R.A. Sperotto. 2016, Plant pathogens affecting the establishment of plant-symbiont interaction, *Frontiers in Plant Science*, 15.
16. Gil, R., et al., 2003, The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), 9388-9393.
17. Kupper, M., et al., 2016, Distribution of the obligate endosymbiont *Blochmannia floridanus* and expression analysis of putative immune genes in ovaries of the carpenter ant *Camponotus floridanus*, *Arthropod Structure & Development*, 45(5), 475-487.
18. Wernegreen, J.J., et al., 2009, One nutritional symbiosis begat another: phylogenetic evidence that the ant tribe Camponotini acquired *Blochmannia* by tending sap-feeding insects, *BMC Evolutionary Biology*, 292.
19. Rafiqi, A.M., A. Rajakumar, and E. Abouheif. 2020, Origin and elaboration of a major evolutionary transition in individuality, *Nature*, 585(7824), 239-244.
20. St Johnston, D. and C. Nüsslein-Volhard. 1992, The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo, *Cell*, 68(2), 201-219.
21. Ferguson, E.L. and K.V. Anderson. 1992, Localized Enhancement and Repression of the Activity of the Tgf-Beta Family Member, Decapentaplegic, Is Necessary for Dorsal-Ventral Pattern-Formation in the *Drosophila* Embryo, *Development*, 114(3), 583-597.
22. Francois, V., et al., 1994, Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene, *Genes & Development*, 8(21), 2602-16.
23. Marques, G., et al., 1997, Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins, *Cell*, 91(3), 417-426.
24. Mason, E.D., et al., 1994, Dorsal midline fate in *Drosophila* embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor, *Genes & Development*, 8(13), 1489-1501.
25. Ross, J.J., et al., 2001, Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist, *Nature*, 410(6827), 479-483.
26. Decotto, E. and E.L. Ferguson. 2001, A positive role for short gastrulation in modulating BMP signaling during dorsoventral patterning in the *Drosophila* embryo, *Development*, 128(19), 3831-3841.

27. Holley, S.A., et al., 1996, The *Xenopus* dorsalizing factor noggin ventralizes *Drosophila* embryos by preventing DPP from activating its receptor, *Cell*, 86(4): p. 607-617.
28. Eldar, A., et al., 2002, Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning, *Nature*, 419(6904), 304-308.
29. Haerry, T.E., et al., 1998, Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in *Drosophila*, *Development*, 125(20), 3977-3987.
30. Neul, J.L. and E.L. Ferguson. 1998, Spatially restricted activation of the SAX receptor by SCW modulates DPP/TKV signaling in *Drosophila* dorsal-ventral patterning, *Cell*, 95(4), 483-494.
31. Nguyen, M., et al., 1998, Interpretation of a BMP activity gradient in *Drosophila* embryos depends on synergistic signaling by two type I receptors, SAX and TKV, *Cell*, 95(4), 495-506.
32. Letsou, A., et al., 1995, *Drosophila* Dpp Signaling Is Mediated by the Punt Gene-Product - a Dual Ligand-Binding Type-II Receptor of the Tgf-Beta Receptor Family, *Cell*, 80(6), 899-908.
33. Rafiqi, A.M., et al., 2012, BMP-dependent serosa and amnion specification in the scuttle fly *Megaselia abdita*, *Development*, 139(18), 3373-82.
34. Graham, S.J., et al., 2014, BMP signalling regulates the pre-implantation development of extra-embryonic cell lineages in the mouse embryo, *Nature communications*, 5(1), 1-11.
35. Lynch, J.A., E. El-Sherif, and S.J. Brown. 2012, Comparisons of the embryonic development of *Drosophila*, *Nasonia*, and *Tribolium*, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(1), 16-39.
36. Counce, S., 1961, The analysis of insect embryogenesis, *Annual Review of Entomology*, 6(1), 295-312.
37. Schmidt-Ott, U., A.M. Rafiqi, and S. Lemke. 2010, Hox3/zen and the evolution of extraembryonic epithelia in insects, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 689, 133-44.
38. Eleftherianos, I., et al., 2013, Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system?, *Frontiers in Physiology*, 4.
39. Ruggiero, M.A., et al., 2015, A higher level classification of all living organisms, *PloS one*, 10(4).

40. Gullan, P.J., et al., 2018, Taxonomy of coccids (Hemiptera: Coccidae: Coccus L.) associated with Crematogaster ants (Hymenoptera: Formicidae) in the stems of Macaranga plants (Euphorbiaceae) in Southeast Asia, *Zootaxa*, 4521(1), 1–51.
41. Ronquist, F., et al., 2012, A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera, *Systematic biology*, 61(6), 973-999.
42. Borowiec, M.L., C.S. Moreau, and C. Rabeling. 2020, *Ants: Phylogeny and Classification*, in *Encyclopedia of Social Insects*, 1-18.
43. Blaimer, B.B., et al., 2015, Phylogenomic methods outperform traditional multi-locus approaches in resolving deep evolutionary history: a case study of formicine ants, *BMC Evolutionary Biology*, 271.
44. Ramalho, M.O., et al., 2018, Transovarian Transmission of *Blochmannia* and Wolbachia Endosymbionts in the Neotropical Weaver Ant *Camponotus textor* (Hymenoptera, Formicidae), *Current Microbiology*, 75(7), 866-873.
45. Sauer, C., et al., 2002, Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus Blochmannia floridanus*" in adults and larvae of the carpenter ant *Camponotus floridanus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4187-4193.
46. Zientz, E., et al., 2005, Insights into the microbial world associated with ants, *Archives Microbiology*, 184(4), 199-206.
47. Zientz, E., et al., 2006, Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host, *Applied and Environmental Microbiology* 72(9), 6027-33.
48. AntWeb, 2022, <https://www.antweb.org/>, [Ziyaret tarihi: 2 Temmuz 2022].
49. AntWiki, 2022, https://www.antwiki.org/wiki/Camponotus_floridanus, [Ziyaret tarihi: 2 Temmuz 2022].
50. Alvarado, S., et al., 2015, Epigenetic variation in the Egfr gene generates quantitative variation in a complex trait in ants, *Nature Communucations*, 6513.
51. Bonasio, R., et al., 2012, Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*, *Current Biology*, 22(19), 1755-64.
52. Bonasio, R., et al., 2010, Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*, *Science*, 329(5995), 1068-71.
53. Gadau, J., et al., 1996, Population and colony structure of the carpenter ant *Camponotus floridanus*, *Molecular Ecology*, 5(6), 785-92.
54. LeBoeuf, A.C., et al., 2016, Oral transfer of chemical cues, growth proteins and hormones in social insects, *Elife*, 5.

55. Simola, D.F., et al., 2016, Epigenetic (re)programming of caste-specific behavior in the ant *Camponotus floridanus*, *Science*, 351(6268).
56. Simola, D.F., et al., 2013, A chromatin link to caste identity in the carpenter ant *Camponotus floridanus*, *Genome Research*, 23(3), 486-96.
57. Zube, C., et al., 2008, Organization of the olfactory pathway and odor processing in the antennal lobe of the ant *Camponotus floridanus*, *Journal of Comparative Neurology* 506(3), 425-41.
58. Rajakumar, R., et al., 2018, Social regulation of a rudimentary organ generates complex worker-caste systems in ants, *Nature*, 562(7728), 574-577.
59. Bownes, M., 1975, A photographic study of development in the living embryo of *Drosophila melanogaster*, *Development*, 33(3), 789-801.
60. Moran, N.A. and P. Baumann. 2000, Bacterial endosymbionts in animals, *Current Opinion in Microbiology*, 3(3), 270-275.
61. Gupta, A. and S. Nair. 2020, Dynamics of insect–microbiome interaction influence host and microbial symbiont, *Frontiers in Microbiology*, 1357.
62. Baumann, P., 2005, Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects, *Annual Review of Microbiology*, 155-89.
63. Feldhaar, H., et al., 2007, Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*, *BMC Biology*, 48.
64. de Souza, D.J., et al., 2009, Blochmannia endosymbionts improve colony growth and immune defence in the ant *Camponotus fellah*, *BMC Microbiology*, 29.
65. Ward, P.S., B.B. Blaimer, and B.L. Fisher. 2016, A revised phylogenetic classification of the ant subfamily Formicinae (Hymenoptera: Formicidae), with resurrection of the genera *Colobopsis* and *Dinomyrmex*, *Zootaxa*, 4072(3), 343-57.
66. Aranda-Rickert, A., et al., 2017, Insights into a novel three-partner interaction between ants, coreids (Hemiptera: Coreidae) and extrafloral nectaries: implications for the study of protective mutualisms, *Arthropod-Plant Interactions*, 11(4), 525-536.
67. Clark, R.E., et al., 2016, Multiple interaction types determine the impact of ant predation of caterpillars in a forest community, *Ecology*, 97(12), 3379-3388.
68. Ronque, M.U.V., V. Fourcassie, and P.S. Oliveira. 2018, Ecology and field biology of two dominant *Camponotus* ants (Hymenoptera: Formicidae) in the Brazilian savannah, *Journal of Natural History*, 52(3-4), 237-252.
69. Degnan, P.H., et al., 2010, Dynamics of genome evolution in facultative symbionts of aphids, *Environmental Microbiology*, 12(8), 2060-2069.

70. Garibaldi, L.A., et al., 2013, Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance, *Science*, 339(6127), 1608-11.
71. Stoll, S., et al., 2010, Bacteriocyte dynamics during development of a holometabolous insect, the carpenter ant *Camponotus floridanus*, *BMC Microbiology*, 308.
72. Moran, N.A., J.P. McCutcheon, and A. Nakabachi. 2008, Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts, *Annual Review of Genetics*, 165-90.
73. Flórez, L.V., et al., 2015, Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms, *Natural Product Reports*, 32(7), 904-936.
74. Masson, F., A. Zaidman-Rémy, and A. Heddi. 2016, Antimicrobial peptides and cell processes tracking endosymbiont dynamics, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695).
75. Rafiqi, A.M., et al., 2022, Developmental Integration of Endosymbionts in Insects, *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10.
76. Khila, A. and E. Abouheif. 2008, Reproductive constraint is a developmental mechanism that maintains social harmony in advanced ant societies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17884-9.
77. Lynch, J.A., et al., 2011, The phylogenetic origin of oskar coincided with the origin of maternally provisioned germ plasm and pole cells at the base of the Holometabola, *PLoS Genetics*, 7(4).
78. Matsuura, Y., et al., 2015, Ultrabithorax is essential for bacteriocyte development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), 9376-81.
79. McFadden, G.I., 2001, Primary and Secondary Endosymbiosis and The Origin of Plastids, *Journal of Phycology*, 37(6), 951-959.
80. Roth, S., et al., 1991, Cactus, a Maternal Gene Required for Proper Formation of the Dorsoventral Morphogen Gradient in *Drosophila* Embryos, *Development*, 112(2), 371-388.
81. Roth, S. and J. Lynch. 2012, Axis Formation: Microtubules Push in the Right Direction, *Current Biology*, 22(13), R537-R539.
82. Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nussleinvolhard. 1985, Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the *Drosophila* Embryo - the Induction of Polarity by the Toll Gene-Product, *Cell*, 42(3), 791-798.
83. Benoit, B., et al., 2009, An essential role for the RNA-binding protein Smaug during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition, *Development*, 136(6), 923-932.

84. Gouw, J.W., et al., 2009, *In Vivo* Stable Isotope Labeling of Fruit Flies Reveals Post-transcriptional Regulation in the Maternal-to-zygotic Transition, *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(7), 1566-1578.
85. Tsurumi, A., et al., 2011, STAT Is an Essential Activator of the Zygotic Genome in the Early *Drosophila* Embryo, *Plos Genetics*, 7(5).
86. Roth, S. and T. Schupbach. 1994, The Relationship between Ovarian and Embryonic Dorsoventral Patterning in *Drosophila*, *Development*, 120(8), 2245-2257.
87. Morisato, D. and K.V. Anderson. 1994, The Spatzle Gene Encodes a Component of the Extracellular Signaling Pathway Establishing the Dorsal-Ventral Pattern of the *Drosophila* Embryo, *Cell*, 76(4), 677-688.
88. Nüsslein-Volhard, C., 1991, Determination of the embryonic axes of *Drosophila*.
89. Driever, W. and C. Nussleinvolhard. 1988, A Gradient of Bicoid Protein in *Drosophila* Embryos, *Cell*, 54(1), 83-93.
90. Huang, A.M., J. Rusch, and M. Levine. 1997, An anteroposterior dorsal gradient in the *Drosophila* embryo, *Genes & Development*, 11(15), 1963-1973.
91. Stathopoulos, A., et al., 2002, Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo, *Cell*, 111(5), 687-701.
92. Hulskamp, M., C. Pfeifle, and D. Tautz. 1990, A Morphogenetic Gradient of Hunchback Protein Organizes the Expression of the Gap Genes Kruppel and Knirps in the Early *Drosophila* Embryo, *Nature*, 346(6284), 577-580.
93. Levine, M. and E.H. Davidson. 2005, Gene regulatory networks for development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 4936-4942.
94. González-Reyes, A., H. Elliott, and D. St Johnston. 1995, Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling, *Nature*, 375(6533), 654-658.
95. González-Reyes, A. and D. St Johnston. 1994, Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*, *Science*, 266(5185), 639-642.
96. Zhao, T.T., et al., 2012, Growing Microtubules Push the Oocyte Nucleus to Polarize the *Drosophila* Dorsal-Ventral Axis, *Science*, 336(6084), 999-1003.
97. Neuman-Silberberg, F.S. and T. Schüpbach. 1993, The *Drosophila* dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein, *Cell*, 75(1), 165-174.
98. Montell, D.J., W.H. Yoon, and M. Starz-Gaiano. 2012, Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells, *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 631-645.

99. Gilbert, S.F., 2017, Developmental biology, the stem cell of biological disciplines, *Plos Biology*, 15(12).
100. Andreu, M.J., et al., 2012, Mirror represses pipe expression in follicle cells to initiate dorsoventral axis formation in *Drosophila*, *Development*, 139(6), 1110-1114.
101. Sen, J., et al., 1998, Spatially restricted expression of pipe in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorsal–ventral polarity, *Cell*, 95(4), 471-481.
102. Ramanujam, B., et al., 2012, Induction of defense related enzymes and phenols in chilli plants by *Bacillus subtilis* against anthracnose pathogen, *Colletotrichum capsici*, *Indian Phytopathology*, 65(4), 382-385.
103. Chasan, R., Y. Jin, and K. Anderson. 1992, Activation of the easter zymogen is regulated by five other genes to define dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo, *Development*, 115(2), 607-616.
104. Ligoxygakis, P., et al., 2002, Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease, *Science*, 297(5578), 114-116.
105. Hashimoto, C., S. Gerttula, and K.V. Anderson. 1991, Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation, *Development*, 111(4), 1021-1028.
106. Moussian, B. and S. Roth. 2005, Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo—shaping and transducing a morphogen gradient, *Current biology*, 15(21), R887-R899.
107. Edwards, D.N., P. Towb, and S.A. Wasserman. 1997, An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators, *Development*, 124(19), 3855-3864.
108. Reach, M., et al., 1996, A Gradient of Cactus Protein Degradation Establishes Dorsoventral Polarity in the *Drosophila* Embryo, *Developmental biology*, 180(1), 353-364.
109. Uv, A.E., et al., 2000, members only encodes a *Drosophila* nucleoporin required for rel protein import and immune response activation, *Genes & Development*, 14(15), 1945-1957.
110. Linne, V., B.J. Eriksson, and A. Stollewerk. 2012, Single-minded and the evolution of the ventral midline in arthropods, *Developmental Biology*, 364(1), 66-76.
111. Ip, Y.T., et al., 1992, dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo, *Genes & Development*, 6(8), 1518-30.

112. Thisse, C. and B. Thisse. 1992, Dorsoventral Development of the *Drosophila* Embryo Is Controlled by a Cascade of Transcriptional Regulators, *Development*, 173.
113. Holley, S.A. and E.L. Ferguson. 1997, Fish are like flies are like frogs: conservation of dorsal-ventral patterning mechanisms, *BioEssays*, 19(4), 281-284.
114. Endler, A., et al., 2004, Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2945-50.
115. Raftery, L.A. and D.J. Sutherland. 1999, TGF- β family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads, *Developmental biology*, 210(2), 251-268.
116. Dorfman, R. and B.-Z. Shilo. 2001, Biphasic activation of the BMP pathway patterns the *Drosophila* embryonic dorsal region, *Development*, 128(6), 965-972.
117. Shimmi, O. and M.B. O'Connor. 2003, Physical properties of Tld, Sog, Tsg and Dpp protein interactions are predicted to help create a sharp boundary in Bmp signals during dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo, 10.1242/dev.00684.
118. Mason, E.D., et al., 1994, Dorsal midline fate in *Drosophila* embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor, *Genes & Development*, 8(13), 1489-501.
119. Arora, K., M.S. Levine, and M.B. O'Connor. 1994, The screw gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo, *Genes & Development*, 8(21), 2588-2601.
120. Ashe, H.L., M. Mannervik, and M. Levine. 2000, Dpp signaling thresholds in the dorsal ectoderm of the *Drosophila* embryo, *Development*, 127(15), 3305-12.
121. Irish, V.F. and W.M. Gelbart. 1987, The decapentaplegic gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo, *Genes & Development*, 1(8), 868-879.
122. Arora, K. and C. Nusslein-Volhard. 1992, Altered mitotic domains reveal fate map changes in *Drosophila* embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes, *Development*, 114(4), 1003-1024.
123. Wang, Y.-C. and E.L. Ferguson. 2005, Spatial bistability of Dpp-receptor interactions during *Drosophila* dorsal-ventral patterning, *Nature*, 434(7030), 229-234.
124. Shimmi, O., et al., 2005, The crossveinless gene encodes a new member of the Twisted gastrulation family of BMP-binding proteins which, with Short gastrulation, promotes BMP signaling in the crossveins of the *Drosophila* wing, *Developmental biology*, 282(1), 70-83.
125. Little, S.C. and M.C. Mullins. 2006, Extracellular modulation of BMP activity in patterning the dorsoventral axis, *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 78(3), 224-242.

126. Hassel, S., et al., 2003, Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 44-51.
127. O'Connor, M.B., et al., 2006, Shaping BMP morphogen gradients in the *Drosophila* embryo and pupal wing, *Development*, 133(2), 183-193.
128. Srinivasan, S., K.E. Rashka, and E. Bier. 2002, Creation of a Sog morphogen gradient in the *Drosophila* embryo, *Developmental Cell*, 2(1), 91-101.
129. Shimell, M.J., et al., 1991, The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1, *Cell*, 67(3), 469-481.
130. Schloop, A.E., P.U. Bandodkar, and G.T. Reeves. 2020, Formation, interpretation, and regulation of the *Drosophila* Dorsal/NF- κ B gradient, *Current Topics in Developmental Biology*, 143-191.
131. Wharton, K.A. and M. Serpe. 2013, Fine-tuned shuttles for bone morphogenetic proteins, *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(4), 374-384.
132. Bressan, D. and H.M. Araujo. 2022, Evolution of the dorsoventral axis in insects: the changing role of Bone Morphogenetic Proteins, *Current Opinion in Insect Science*, 1-7.
133. Stappert, D., et al., 2016, Genome-wide identification of *Tribolium* dorsoventral patterning genes, *Development*, 143(13), 2443-2454.
134. Van der Zee, M., R.N. Da Fonseca, and S. Roth. 2008, TGF β signaling in *Tribolium*: vertebrate-like components in a beetle, *Development genes and evolution*, 218(3), 203-213.
135. Ozuak, O., et al., 2014, Dorsoventral polarity of the *Nasonia* embryo primarily relies on a BMP gradient formed without input from Toll, *Curr Biol*, 24(20), 2393-8.
136. Sachs, L., et al., 2015, Dynamic BMP signaling polarized by Toll patterns the dorsoventral axis in a hemimetabolous insect, *Elife*, 4.
137. Berni, M., et al., 2014, Toll signals regulate dorsal–ventral patterning and anterior–posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*, *Evolutionary Developmental Biology*, 5(1), 1-18.
138. Pechmann, M., et al., 2021, Striking parallels between dorsoventral patterning in *Drosophila* and *Gryllus* reveal a complex evolutionary history behind a model gene regulatory network, *Elife*.
139. Misof, B., et al., 2014, Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution, *Science*, 346(6210), 763-767.
140. Hölldobler, B. and E.O. Wilson, *Journey to the ants: a story of scientific exploration*. 1994: Harvard University Press.

141. Bhatkar, A. and W. Whitcomb. 1970, Artificial diet for rearing various species of ants, *Florida Entomologist*, 229-232.
142. Kearse, M., et al., 2012, Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data, *Bioinformatics*, 28(12),
143. Roth, S., 2004, Gastrulation in other insects, *Gastrulation: from Cells to Embryos*, 121.
144. Rafiqi, A.M., et al., 2008, Evolutionary origin of the amnioserosa in cyclorrhaphan flies correlates with spatial and temporal expression changes of zen, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 234-9.
145. Khila, A. and E. Abouheif. 2010, Evaluating the role of reproductive constraints in ant social evolution, *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences*, 365(1540), 617-30.
146. Jackson, P.D. and F.M. Hoffmann. 1994, Embryonic expression patterns of the *Drosophila* decapentaplegic gene: separate regulatory elements control blastoderm expression and lateral ectodermal expression, *Developmental Dynamics*, 199(1), 28-44.
147. Carroll, S.B., J.K. Grenier, and S.D. Weatherbee, 2013, From DNA to diversity: molecular genetics and the evolution of animal design, John Wiley & Sons, ISBN 1405119500.
148. Brown, H.L. and A. Bruce, 1999, Assessment of the biological potential of a *Trichoderma viridae* isolate. Part I: Establishment of field and fungal cellar trials, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 219-223.
149. Rafiqi, A.M., S. Lemke, and U. Schmidt-Ott. 2010, Postgastrular zen expression is required to develop distinct amniotic and serosal epithelia in the scuttle fly *Megaselia*, *Developmental Biology*, 341(1), 282-90.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nihan Sultan MİLAT
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	29.05.2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler	
Milat NS and Rafiqi AM. Analysis of Dorsoventral Patterning in <i>Camponatus floridonus</i> . 8th Meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology, 31 May- 3 June, 2022	