

***PHLEBOTOMUS TOBBI* ADLER, THEODOR & LOURIE,
1930 (DIPTERA: PSYCHODIDAE)'NİN SICAKLIĞA
BAĞLI GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNDEKİ
DEĞİŞİMLER**

**TEMPERATURE DEPENDENT GENE EXPRESSION
DIFFERENCES ON *PHLEBOTOMUS TOBBI* ADLER,
THEODOR & LOURIE, 1930 (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

GİZEM OĞUZ

PROF. DR SALİH BÜLENT ALTEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

***PHLEBOTOMUS TOBBI* ADLER, THEODOR & LOURIE, 1930 (DIPTERA: PSYCHODIDAE)'NİN SICAKLIĞA BAĞLI GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

Gizem OĞUZ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

27 Mayıs 2022, xii +75 sayfa

Phlebotomus tobbi Adler, Theodor ve Lourie, 1930, Türkiye'de geniş yayılım gösteren vektör kum sineği türlerinden biridir. Bu tür *Leishmania infantum*, Nicolle, 1908 protozoan parazitlerinin ülkedeki kanıtlanmış vektörü olup çok sayıda *Phlebovirus* suşunun da taşınması ve bulaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu tez çalışmasında çevresel etmenlerin *P. tobbi* vektörüne ait transkriptlerin ifade seviyelerine olan etkileri incelenmiştir.

Sıcaklığın gen ifadesine olan direkt etkisini ölçmek amacıyla farklı sıcaklık koşulları (23°C ve 27 °C) altında *P. tobbi* laboratuvar kolonileri yetiştirilmiştir. Bu kolonilerden elde edilen ergin dişi bireylerin hayatta kalma, gelişim ve hastalık oluşumuna etki eden *Cacophony (PtCac)*, *Salivary Gland Protein 32 (PtSP32)* ve *Salivary Gland Protein 38 (PtSP38)* genlerinin ifade seviyelerindeki farklılıklar ortaya konmuştur.

Çevresel etmenlerin gen ifadesine olan etkisini gözlemlemek amacıyla üç farklı coğrafi bölgede yayılım gösteren (Adana, Datça ve Yozgat) *P. tobbi* populasyonlarındaki ilgili üç genin ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır. Gen ekspresyon seviyeleri ile çevresel faktörler arasındaki ilişkiler, örneklem alanlarına ait ortam sıcaklığı ve bağıl nem verileri kullanılarak istatistiksel olarak test edilmiştir.

Ayrıca MALDI-TOF MS protein profili analiz yöntemi ile *P. tobbi* doğal popülasyonlarının protein örüntüleri ortaya çıkarılarak, yöntemin coğrafi popülasyonların ayırımındaki etkinliği araştırılmıştır.

Hem laboratuvar kolonilerinin hem de doğal popülasyonların *PtCac* gen ifade seviyeleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Laboratuvar kolonilerine ait gen ifadesi analizleri, *PtCac* gen ifade seviyesi ve sıcaklık arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Ancak doğal popülasyonlarda, çevresel sıcaklık ile negatif bir korelasyon tespit edilmiştir. Bu popülasyonlarda ayrıca *PtCac* gen ifade seviyeleri ve çevresel bağıl nem arasında da negatif bir korelasyon ilişkisi olduğu gözlenmiştir.

Öte yandan *PtSP32* gen ifade seviyelerinde laboratuvar kolonilerinde 23°C ve 27 °C sıcaklık koşulları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, doğal popülasyonlar arasında çevresel bağıl nem ile negatif korelasyon gösteren farklılıklar tespit edilmiştir.

Laboratuvar kolonilerinde *PtSP38* gen ifade analizleri itibarıyla iki grup arasında sıcaklıkla pozitif ilişkili farklılıklar gözlenirse de, doğal popülasyonların *PtSP38* gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Doğal popülasyonların protein profil analizlerine göre, popülasyonlar arasında ufak farklılıklar gözlenirse de MALDI-TOF MS protein profil analiz yönteminde mevcut referans veri tabanı ile *P. tobbi*'nin coğrafi popülasyonları arasında net bir ayırım yapılamamıştır.

Bu tez çalışması ile *L. infantum* vektörünün farklı çevresel koşullardaki gen ifade değişimleri ilk kez ortaya konmuş, Türkiye'deki *P. tobbi* coğrafi popülasyonların protein profilleri ile ayırımı ilk kez test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu vektörün değişen çevresel koşullardaki dinamiklerini anlamaya yardımcı olurken, vektör-parazit-konak ilişkilerini ve hastalık oluşma riskini belirlemek için yapılacak olan gelecek çalışmalara katkıda bulunacaktır. Ayrıca MALDI-TOF MS protein profil analizi ile elde edilen sonuçlar *P. tobbi* proteomik veri tabanına katkıda bulunarak bu yöntemin geliştirilmesini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: *Phlebotomus tobbi*, Sıcaklık, *PtCac*, *PtSP32*, *PtSP38*, Gen İfadesi, RT-PZR, MALDI-TOF MS

ABSTRACT

TEMPERATURE DEPENDENT GENE EXPRESSION DIFFERENCES ON *PHLEBOTOMUS TOBBI* ADLER, THEODOR & LOURIE, 1930 (DIPTERA: PSYCHODIDAE)

Gizem OĞUZ

Doctor of Philosophy, Department of BIOLOGY

Supervisor: Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

27 May 2022, xii +75 pages

Phlebotomus tobbi Adler, Theodor and Lourie, 1930, is a vector sand fly species widely distributed in Turkey. This species is the proven vector of *Leishmania infantum*, Nicolle, 1908 protozoan parasites in the country and plays an important role in the transmission of many *Phleboviruses*. In this thesis, the effects of environmental factors on the gene expression levels of the *P. tobbi* transcripts are examined.

In order to measure the direct effect of temperature on gene expression, laboratory colonies of *P. tobbi* are reared under different temperature conditions (23°C and 27°C). Differences in the expression levels of *Cacophony* (*PtCac*), *Salivary Gland Protein 32* (*PtSP32*) and *Salivary Gland Protein 38* (*PtSP38*) genes, which affect survival, development and disease occurrence, of adult female specimens obtained from these colonies were revealed.

In order to observe the effect of environmental factors on gene expression, the expression levels of three genes in *P. tobbi* populations distributed in three different geographical regions (Adana, Datça and Yozgat) were compared. The relationships between gene expression levels and environmental factors were statistically tested by using the ambient temperature and relative humidity data of the sampling areas.

In addition, protein patterns of natural *P. tobbi* populations were revealed by MALDI-TOF MS protein profile analysis method and the efficiency of the method in discrimination of geographic populations were investigated.

Differences were observed between the *Cac* gene expression levels of both laboratory colonies and natural populations. Gene expression analyzes of laboratory colonies showed a positive correlation between *Cac* gene expression level and temperature. However, on the contrary, a negative correlation was found with environmental temperature in natural populations. A negative correlation was also observed between *Cac* gene expression levels and ambient relative humidity in these populations.

On the other hand, while no statistically significant difference was observed in *PtSP32* gene expression levels between 23°C and 27°C temperature conditions in laboratory colonies, differences were found among natural populations showing a negative correlation with environmental relative humidity.

Although *PtSP38* gene expression analyzes in laboratory colonies revealed differences between the two groups that showed a positive correlation with temperature, no statistically significant difference was found in *PtSP38* gene expressions of natural populations.

According to protein profile analysis of natural populations, although minimal differences were observed between populations, a clear discrimination could not be made between geographic populations of *P. tobbi* with current database using in the MALDI-TOF MS protein profile analyses.

With this thesis, the gene expression changes of the *L. infantum* vector under different environmental conditions were revealed and the differentiation of *P. tobbi* geographic populations in Turkey by protein profiles was tested for the first time.

The results will help to understand the dynamics of the vector in fluctuating environmental conditions and contribute the future studies conducted to determine the vector-parasite-host relationships and disease occurrence risk.

Keywords: *Phlebotomus tobbi*, Temperature, *PtCac*, *PtSP32*, *PtSP38*, Gene Expression, RT-qPCR, MALDI-TOF MS

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimim ile başlayan akademik sürecimin her döneminde yanımda olan, hem akademik bilgi ve öğretileri ile kendimi geliştirmeme yardımcı olan, fikir ve projelerimi gerçekleştirebilmem için gerek maddi gerek manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen, saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Bülent ALTEN'e,

Akademik kariyerime başlamaya karar vermemdeki en önemli etken olan ve tüm kariyerim boyunca bana bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, bu tez çalışmasının oluşturulması ve geliştirilmesinde büyük katkıları olan, değerli akıl hocam Doç. Dr. Özge ERİŞÖZ KASAP'a,

Tezin ön çalışmalarına bana yardımcı olan ve bu çalışmaları gerçekleştirebilmek için gerekli laboratuvar ortamını sağlayan, sayın hocam Prof. Dr. Koray ERGÜNAY'a,

Tez çalışmasının teknik ve yöntem kısmının geliştirilmesinde akademik tecrübeleriyle katkıda bulunan ve gen ifadesi deneylerinin yürütülmesi için laboratuvar ortamlarını kullanmamıza olanak sağlayan, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanı ve Tez İzleme Komitesi jüri üyesi sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Tez çalışmasının kapsam ve yöntem aşamalarının geliştirilmesinde bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, Tez İzleme Komitesi jüri üyesi sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL'e,

Gen ifadesi deneylerinin yapılış aşamalarında bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini üzerimden eksik etmeyen sayın Doç. Dr. Çağatay KARAASLAN ve Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e,

MALDI-TOF MS protein profil analizlerinin gerçekleştirilmesi için HUNITEK alt yapısını bize sunan, yöntem ve analizlerin geliştirilmesinde katkı sağlayan sayın Prof. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK ve Öğr. Gör. Dr. Melis ŞARDAN EKİZ'e,

Laboratuvar kolonisi oluşturulması için gerekli canlı örnek tedarikini ve MALDI-TOF MS protein profil analizlerinde kullanılması için referans veri tabanının oluşturulmasını sağlayan sayın Dr. Petr HALADA ve Dr. Vit DVORAK'a,

Tezimin arazi çalışmalarındaki yardım ve desteklerinden dolayı, bilgi, tecrübe ve dostluğu ile her zaman yanımda olan sevgili Dr. Öğr. Üyesi Filiz GÜNAY'a,

Yozgat arazi çalışmalarında bize evlerini açan, sevgili arkadaşım Gökhan ERGAN ve ailesine,

Adana arazisindeki özverili çalışmaları ile bana yardımcı olan sevgili ekip arkadaşım Kıvanç SEVİM'e,

Laboratuvar kolonilerinin oluşturulması ve bakımı görevini üstlenen, tezimin her aşamasında yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen, sevgili dostum ve ekip arkadaşım Ayda YILMAZ'a

Bir parçası olmaktan her zaman gurur duyduğum, HU-VERG'e ve doktora tez sürecimde yardım ve desteklerini esirgemeyen ekip üyelerine,

Tüm zor anlarımda desteklerini hep üzerimde hissettiğim sevgili arkadaşlarım Yasemen SARIKAYA, Cansu AKSOY, Anıl BAHAR, Duygu Deniz KAZANCI, Cihan Ünal DEĞİRMENCİ ve Elif Deniz ÜLKER'e,

Akademik hayatımın manevi destekçisi sevgili Emir KASKAN'a,

Hayatım boyunca gayret, özveri ve fedakarlıklarıyla yanımda olan, tüm kararlarımda arkamda duran ve bana destek olan sevgili ailem Nezihe OĞUZ ve Yüksel OĞUZ'a,

Laboratuvar hayatıma varlığıyla renk katan, ekibimizin maskotu, sevgili kedimiz VEYSEL'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Global Emerging Infection Surveillance (GEIS) tarafından, X81XWH18C0190 proje numaralı, USA-WRAIR-GEIS - "Identification & incrimination of mosquito and sand fly vectors of viral diseases and pathogens present in Syrian refugee zones and migration routes through Turkey and Greece into Europe, and through Jordan and Lebanon into the Middle East" adlı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kum Sineklerinin Genel Özellikleri, Yayılım Alanları ve Vektörel Önemleri	1
1.2. Kum Sineklerinin ve Leishmaniasis'in Türkiye'deki Durumu.....	2
1.3. <i>Phlebotomus tobbi</i> Adler, Theodor & Lourie, 1930 ve Vektörel Önemi	3
1.4. Çevresel Etmenlerinin Gen İfade Değişimine Etkileri ve Gen İfadesi Çalışmalarının Önemi	4
1.6. MALDI-TOF MS Protein Profil Analiz Yönteminin Kum Sineği Çalışmalarında Kullanım Alanı.....	6
1.7. Tez Çalışmasının Amacı.....	7
2. YÖNTEM	9
3.1. <i>Phlebotomus tobbi</i> Laboratuvar Kolonisinin Farklı Sıcaklık Koşulları Altında Yetiştirilmesi.....	9
3.2. Örneklem Alanları ve Arazi Çalışması	10
3.3. Gen İfadesi Analizleri	13
3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	13
3.3.2. Hedef Genlere Ait Özgün Primer Çiftlerinin Tasarlanması	15
<u>PtCac:</u> 17	
<u>PtSP32:</u> 21	
<u>PtSP38:</u> 22	
3.3.2. RT-PZR analizi	25
3.3.3. Veri analizi.....	26
3.2. MALDI-TOF MS Protein Profili Oluşturulması	27
3. BULGULAR.....	29

3.1. Gen İfadesi Çalışmasına Ait Bulgular.....	29
3.1.1. <i>P. tobbi</i> Koloni Örnekleri ile İlgili Bulgular	29
3.1.2. <i>P. tobbi</i> Doğal Populasyonları ile İlgili Bulgular.....	32
3.2. MALDI-TOF MS Protein Profil Analizlerine Ait Bulgular.....	37
4. TARTIŞMA	41
4.1. <i>Phlebotomus tobbi Cacophony</i> Proteini İçin Elde Edilen Bulguların Yorumlanması	41
4.2. <i>Phlebotomus tobbi SP32</i> Tükürük Bezi Proteini İçin Elde Edilen Bulguların Yorumlanması	45
4.3. <i>Phlebotomus tobbi SP38</i> Tükürük Bezi Proteini İçin Elde Edilen Bulguların Yorumlanması	47
4.4. <i>Phlebotomus tobbi</i> Doğal Populasyonlarının MALDI-TOF MS Protein Profiline Ait Bulguların Değerlendirilmesi	49
4.5. Genel Yorum ve Öneriler	52
6. KAYNAKLAR.....	55
EKLER	74
EK 1: <i>Phlebotomus tobbi</i> Koloni Örneklerine Ait RT-PZR Analizinde Örneklerin Kuyucuklara Yerleşimi ve RT-PZR Sonuç Grafikleri	74
EK 1 – Devam	75
EK 2 – <i>Phlebotomus tobbi</i> Doğal Populasyonlarına Ait <i>PtCac</i> ve <i>PtSP32</i> Hedef Genleri İçin Yapılan RT-PZR Analizinde Örneklerin Kuyucuklara Yerleşimi ve RT-PZR Sonuç Grafikleri	76
EK 2 – Devam	77
EK 3 – <i>Phlebotomus tobbi</i> Doğal Populasyonlarına Ait <i>PtSP38</i> Hedef Geni İçin Yapılan RT-PZR Analizinde Örneklerin Kuyucuklara Yerleşimi ve RT-PZR Sonuç Grafikleri	78
EK 3 – Devam	79
EK 4: <i>Phlebotomus tobbi</i> Doğal Populasyonlarına Ait İyon Kütle Spektrumları.....	80
EK 4 – Devam	81
EK 4 – Devam	82
EK 5 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	83
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1: Kum sineği arazi çalışması yapılan bölgelerin harita üzerinde gösterimi. 10
- Şekil 2: *Phlebotomus tobbi* dişi abdomeninin son iki segmenti içerisinde yer alan genitalya ve morfolojik tür teşhisinde kullanılan karakterler. (Fotoğraf: Gizem Oğuz, 2019) 13
- Şekil 3: RNA izolasyon aşamalarının şematik gösterimi. 14
- Şekil 4: cDNA sentez aşamalarının şematik gösterimi. 15
- Şekil 5: Gen ifadesi analizleri için tasarlanması planlanan örnek cDNA spesifik primer çiftlerinin genomik DNA ve cDNA dizileri üzerinde şematik gösterimi. 16
- Şekil 6: *P.tobbi* ve *L. longipalpis*'e ait *Cacophony* genine ait dizilerin Clustal Omega programında üst üste çakıştırılması. KDL2_tobbi_yozgat_PtCac: *PtCac* gen bölgesi (Karaoğlu 2020), LLOJ006699-RA: *LlCac* geni 19. ve 20 ekzon bölgeleri arasında ait genomik dizi. Gri boyalı kısımlar *LlCac* geninin ekzon bölgelerini betimlemektedir. “*” işareti iki dizide birbiriyle eşleşen nükleotidleri göstermektedir. 18
- Şekil 7: *LlCac* (LLOJ006699-RA) 18. ve 21. intronlar arası genomik dizisi ve *PtCac* genin ilgili bölgesini tespit etmek için tasarlanan primer çiftlerinin dizi üzerindeki yerleri. Küçük harfli kısımlar intron, büyük harfli kısımlar ekzon ve gri boyalı kısımlar İleri (5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3'), Geri (5'-CATCGAGTGGCATGTTTCATT-3') primerlerin dizi üzerindeki konumlarını belirtmektedir. 19
- Şekil 8: *Phlebotomus tobbi* DNA ve cDNA örneklerine ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki ve bu örneklerin Sanger sekans sonuçlarının üst üste çakıştırılmış görüntüleri. Gri boyalı kısımlar *PtCac* geninin olası ekzon bölgelerini betimlemektedir. “*” işareti iki dizide birbiriyle eşleşen nükleotidleri göstermektedir. 20
- Şekil 9: *Phlebotomus tobbi PtSP32* mRNA dizisi (HM164144.1). Gri boyalı bölgeler genomik dizi için tasarlanmış İleri (5'- CAAGGATAAGAACCCAGCA -3') ve Geri (5'- ATCATAGGTCTTCATAGCGTC -3') primer çiftinin dizi üzerindeki konumlarını betimlemektedir. 21
- Şekil 10: *Phlebotomus tobbi* DNA ve cDNA örneklerine ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri ve örnekler arasındaki 63bp uzunluğundaki farkın MEGAX versiyon 10.2.4 programında gösterimi. 22

Şekil 11: <i>Phlebotomus tobbi</i> <i>PtSP38</i> mRNA dizisi (HM164144.1), genomik dizi üzerindeki olası intron bölgelerini taramak için tasarlanmış, 696 bp uzunluktaki bölgeyi çoğaltan İleri (5'-TATCATCCCAACTGGTTTCG-3') ve Geri (5'-TCAAATTTGGCACCCCTTCTG-3') primer çiftinin dizi üzerindeki konumları (gri boyalı kısımlar) ve bu primer seti ile yapılan PZR analiz sonuçlarının elektroforez jel görüntüsü.....	23
Şekil 12: Bir hedef gene ait amplifikasyon eğrisinin şematik görüntüsü.....	26
Şekil 13: A) MALDI-TOF MS target plate ve B) Bruker Daltonics flexAnalysis 3.4 programı	28
Şekil 14: Farklı sıcaklık koşulları için laboratuvar kolonilerine ait <i>PtCac</i> gen ifade seviyeleri ve regresyon eğrisi.....	29
Şekil 15: Farklı sıcaklık koşulları için laboratuvar kolonilerine ait <i>PtSP38</i> gen ifade seviyeleri ve regresyon eğrisi.....	30
Şekil 16: Farklı sıcaklık koşulları için laboratuvar kolonilerine ait <i>PtSP38</i> gen ifade seviyeleri ve regresyon eğrisi.....	31
Şekil 17: Üç farklı <i>P. tobbi</i> doğal populasyonlarına ait <i>PtCac</i> gen ifade seviyeleri. A) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel sıcaklık arasındaki regresyon eğrisi, B) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel bağıl nem arasındaki regresyon eğrisi.	32
Şekil 18: Üç farklı <i>P. tobbi</i> doğal populasyonlarına ait <i>PtSP32</i> gen ifade seviyeleri. A) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel sıcaklık arasındaki regresyon eğrisi, B) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel bağıl nem arasındaki regresyon eğrisi.	33
Şekil 19: Üç farklı <i>P. tobbi</i> doğal populasyonlarına ait <i>PtSP38</i> gen ifade seviyeleri.....	34
Şekil 20: Örneklem alanlarına ait 30 günlük iklimsel verinin şematik görünümü.....	36
Şekil 21: Üç farklı <i>P. tobbi</i> doğal populasyona ait protein profillerinin en yüksek eşleşme gösteren referans gruplarına göre dendogram kümelenme grafiği. “(++)” yüksek skorla tanımlanan örnekler, “(+)” düşük skorla tanımlanan örnekler ve “(-)” tanımlanamayan örnekleri göstermektedir.	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: Kum sineği arazi çalışmasında örneklem alınan lokasyonlara ait konum bilgileri.....	12
Çizelge 2: Gen ifadesi deneylerinde analiz edilmesi planlanan aday hedef genler ve fonksiyonları.	17
Çizelge 3: <i>Phlebotomus tobbi</i> hedef genleri için tasarlanan RT-PZR primer dizileri ve genel özellikleri. Kırmızı harfle yazılı kısımlar primerlerin genomik DNA üzerindeki konumlarını göstermektedir.	24
Çizelge 4: Hedef genlerin her sıcaklık koşulu için ortalama gen miktarları ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), ortalama standart hataları ve istatistiksel test sonuçları. “*” işareti anlamlı bulunan p değerlerini belirtmektedir.	31
Çizelge 5: Hedef genlerin örneklem alanları için ortalama gen miktarı ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), ortalama standart hataları ve istatistiksel test sonuçları. “*” işareti anlamlı bulunan p değerlerini belirtmektedir.	35
Çizelge 6: Örneklem alanlarında ölçülen 30 günlük iklimsel verilere ait değerler ve istatistiksel analizler.....	36
Çizelge 7: <i>Phlebotomus tobbi</i> arazi örneklerinin referans veri tabanı ile yapılan eşleştirme sonuçları.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C _T	Eşik Döngüsü
µl	mikro litre
ng	nano gram
°C	Derece santrigat

Kısaltmalar

DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
cDNA	komplementer Deoksiribonükleik Asit (complementary Deoxyribonucleic Acid)
CL	Cutaneous Leishmaniasis
HU-EBAL	Hacettepe Üniversitesi Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarları
mRNA	haberci Ribonükleik Asit (messenger Ribonucleic Acid)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
<i>PtCac</i>	<i>Phlebotomus tobbi Cachophony</i>
<i>PtSP32</i>	<i>Phlebotomus tobbi Salyvary Protein 32</i>
<i>PtSP38</i>	<i>Phlebotomus tobbi Salyvary Protein 38</i>
RNA	Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid)
RT-PZR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Quantitative Polimerase Chain Reaction)
VL	Visceral Leishmaniasis

1. GİRİŞ

1.1. Kum Sineklerinin Genel Özellikleri, Yayılım Alanları ve Vektörel Önemleri

Arthropoda şubesi, Diptera takımı, Psychodidae (Phlebotomidae) familyasından *Phlebotomine* alt familyası içerisinde yer alan kum sinekleri, boyutları en fazla 3mm'ye ulaşan, kanatları vücutlarına "V" şeklinde konumlanmış, genellikle sarı renkli ve kısa mesafeli karakteristik zıplama hareketi ile uçuş özelliğine sahip sineklerdir. Zayıf uçuş kabiliyetleri nedeniyle kum sinekleri genellikle larval habitatlarının bulunduğu alandan çok uzaklaşmayı tercih etmemektedirler (Munstermann 2005). Bu özellikleri dispersal yeteneklerini oldukça kısıtlamakla beraber, yakalama – işaretleme – tekrar yakalama çalışmalarında kum sineklerinin uçuş mesafelerinin 1000 m'nin üzerine çıkabildiği gözlenmiştir (Killick-Kendrick ve ark. 1984; Orshan ve ark. 2016).

Phlebotomine kum sinekleri Kuzey'de 50° ve Güney'de 40° enlemleri arasında, Asya, Afrika, Güney Avrupa, Avustralya, Orta ve Güney Amerika'da yer alan tropik ve subtropik habitatlarda yayılım göstermektedir (Maroli ve ark. 2013). Ancak küresel iklim değişikliğinin etkisi ile bu enlemler dışında da kum sinekleri için uygun pek çok yeni yaşam alanları oluştuğu bilinmektedir (Chalghaf ve ark. 2018). Yakın zamanlı bulgular, bazı kum sineği türlerinin Avrupa'daki yayılım alanlarını kuzey enlemlere doğru genişletmekte olduğunu göstermektedir (Dvorak ve ark. 2016; Kniha ve ark. 2021; Oerther ve ark. 2020).

Dünya genelinde tanımlanmış 800'ün üzerinde kum sineği türü bulunmaktadır (Maroli ve ark. 2013). *Phlebotomine* alt familyası içinde yer alan kum sineği cinsleri Eski Dünya (Avrupa, Asya ve Afrika) ve Yeni Dünya (Kuzey, Orta ve Güney Amerika) olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Eski Dünya kum sineklerini *Chinius*, *Phlebotomus* ve *Sergentomyia* cinsleri oluştururken, *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya* cinsleri Yeni Dünya kum sinekleri içinde tanımlanmaktadır (Lane 1993).

Phlebotomine kum sinekleri, *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dimorfik protozoan parazitlerin etken olduğu leishmaniasis hastalığının vektörlüğünü yapmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından en önemli ihmal edilmiş tropikal hastalıklar arasında yer alan leishmaniasis yılda bir milyondan fazla insanı etkilemektedir. Yirmiden fazla *Leishmania* türünün etkeni olduğu bu hastalık, klinik belirtilerine göre, cutaneous (CL), visceral (VL) ve mucocutaneous (MCL) leishmaniasis olmak üzere üç ana formda gruplandırılmaktadır. Leishmaniasisin CL formu genellikle deri üzerinde

lezyon olarak görülürken, Kala-azar olarak da bilinen VL formu karaciğer, dalak, dolaşım ve lenfotik sistemleri etkileyen, öldürücü bir hastalıktır. Amerika kıtasında endemik olarak görülen MCL formu ise daha çok nazofaringeal mukozada ıslak lezyonlar oluşturmaktadır (Mann ve ark. 2021).

Phlebotomus ve *Lutzomyia* cinsleri içerisinde 98 tür leishmaniasisin kanıtlanmış ya da olası vektörü olarak tanımlanmıştır (Maroli ve ark. 2013). Ancak, insan eliyle yapılan doğal alanların tahribatı ve yerleşim alanlarının kırsal bölgelere doğru genişlemesi nedeni ile pek çok kum sineği türünün yayılım alanı ve populasyon büyüklükleri değişmektedir. Bu durum, hem daha önce vektör olarak anılmayan türlerin de hastalık bulaştırma riskini hem de doğal alanlarda sirküle olan çeşitli *Leishmania* türlerinin insan sağlığını tehdit etme riskini artırmaktadır (Nieves ve ark. 2014; Ramos ve ark. 2014).

Dünya genelinde 98 ülkede leishmaniasis endemik olarak görülmektedir. Bunlardan 71'inde ise hem CL hem de VL endemiktir. Geçtiğimiz yıl Dünya Sağlık Örgütü'ne endemik ülkeler de dahil olmak üzere toplamda 200 ülkeden leishmaniasis vakası raporlanmıştır. Yapılan kontrol çalışmalarıyla birlikte VL vakalarında yıl içinde düşüş görülse de CL vakaları hala artış göstermektedir (Ruiz-Postigo ve ark. 2021).

Leishmaniasis haricinde kum sineklerinin, bartonellosis ve kum sineği ateşi hastalıklarının da taşınması ve bulaştırılmasında rol oynadığı bilinmektedir. Daha çok Amerika ülkelerinde yayılım gösteren bartonellosis, *Bartonella* spp. bakterilerinin neden olduğu ateşli hemolitik hastalık ve deri lezyonları gibi klinik belirtiler göstermektedir (Ordya ve Maguiña 2020). Öte yandan kum sineği ateşi, *Phlebovirus*, *Vesiculovirus* ve *Orbivirus* cinsleri içinde yer alan arbovirus suşlarının etken olduğu, genellikle 4-8 gün süren, grip benzeri klinik belirtiler gösteren bir hastalıktır. *Phlebovirus* cinsi içerisinde yer alan Toscana, Sicilian ve Naples serotipleri özellikle Akdeniz ülkelerinde endemik olarak görülmektedir (Dehghani ve ark. 2021; Depaquit ve ark. 2010).

1.2. Kum Sineklerinin ve Leishmaniasis'in Türkiye'deki Durumu

Türkiye Asya, Afrika ve Avrupa'yı birbirine bağlayan, ılıman ve subtropik kuşak arasındaki geçiş bölgesinde yer almaktadır. Bu nedenle hem leishmaniasis başta olmak üzere pek çok vektör kaynaklı hastalık etkeni için hem de vektör organizmalar için uygun çok sayıda farklı habitat içermektedir. Türkiye'de bu zamana kadar *Phlebotomus* ve *Sergentomyia* cinlerine ait 28 adet kum sineği türü tanımlanmıştır (Kasap ve ark. 2019). Bunlardan *Phlebotomus tobbi* Adler, Theodor & Lourie, 1930 ve *Phlebotomus sergenti*

Parrot, 1917 olmak üzere ikisi Türkiye’deki kanıtlanmış CL vektörleridir (Volf ve ark. 2002; Svobodová ve ark. 2009).

Ülkemizde VL ve CL formlarının her ikisi de endemik olarak görülmektedir. Özellikle Şanlıurfa ve çevresinde *P. sergenti*’nin vektörlüğünü yaptığı *Leishmania tropica* Wright, 1903’nin etkeni olduğu CL vakaları sıklıkla görülürken, *P. tobbi*’nin vektörü olduğu *Leishmania infantum* Nicolle, 1908’nin kökenli CL vakaları daha çok Çukurova’yı da içine alan doğu Akdeniz bölgesinde yaygın olarak görülmektedir (Ok ve ark. 2002; Svobodová ve ark. 2009).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2016 yılında Türkiye’de 1474 CL ve 22 VL vakası raporlamış ve hem konumu hem de komşu ülkelerdeki politik karmaşıklık nedeniyle görülen mülteci akımından dolayı hastalık riskinin arttığı belirtilmiştir (WHO 2018). Geçtiğimiz yıllarda Suriye, İran ve Irak’ta endemik olan *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor, 1914’ün etken olduğu CL vakaları, göçmen akımı sonucunda, Türkiye’nin pek çok farklı bölgesinde de görülmeye başlanmıştır (Koltas ve ark. 2014; Zeyrek ve ark. 2015; Özbilgin ve ark. 2016, 2020). Son yıllardaki CL vaka artışları ve yeni CL etmenlerinin ortaya çıkışı nedeniyle (Gurel ve ark. 2012) WHO 2016 yılında Türkiye’yi CL açısından “Hastalık Yüğü Yüksek” ülke kategorisinde değerlendirmeye almıştır.

1.3. *Phlebotomus tobbi* Adler, Theodor & Lourie, 1930 ve Vektörel Önemi

Phlebotomus tobbi, *Phlebotomus* cinsinin *Larrousius* alt cinsinde tanımlanmaktadır (Killick-Kendrick ve ark. 1991). Orta Doğu ve Batı Akdeniz ülkelerinde geniş yayılım göstermekte ve Türkiye’nin hemen hemen her bölgesinde bulunmaktadır (türün güncel yayılım haritası www.ecdc.europa.eu veri tabanında mevcuttur). Türkiye ve Kıbrıs’ta *L. infantum*’un kanıtlanmış vektörü olmakla birlikte (Léger ve ark. 2000; Svobodová ve ark. 2009), Arnavutluk, Yunanistan, İran ve İsrail gibi yayılım gösterdiği pek çok ülkede ise potansiyel vektör olarak görülmektedir (Orshan ve ark. 2010; Maroli ve ark. 2013; Rassi ve ark. 2012; Velo ve ark. 2017).

Yakın zamanlı çalışmalar *P. tobbi*’nin *L. tropica*, *L. donovani* ve *L. infantum/L. donovani* hibrit suşlarının da taşınması ve bulaştırılmasında rol alabileceğini göstermektedir (Mazeris ve ark. 2010; Seblova ve ark. 2015; Vaselek ve Volf 2019). Bu türün aynı zamanda Türkiye’de sirküle olan *Toscana virus* (TOSV), *Sandfly Fever Naples Virus* (SFNV) ve *Selahabad virus* gibi *Phlebovirus* suşlarının da taşıyıcılığını yaptığı bilinmektedir (Ergunay ve ark. 2014; Alkan ve ark. 2015, 2016).

Moleküler çalışmalar ile Türkiye’de *P. tobbi*’nin genetik olarak kesintisiz gen akışına sahip olan tek bir populasyon ile temsil edildiği tespit edilmiştir (Kasap ve ark. 2019). Ancak populasyon yapıları (Belen ve Alten 2011), mevsimsel dinamikleri (Alten ve ark. 2016) ve morfolojik özellikleri (Oguz ve ark. 2017) yerel populasyonlar arasında farklılık göstermektedir.

1.4. Çevresel Etmenlerinin Gen İfade Değişimine Etkileri ve Gen İfadesi Çalışmalarının Önemi

Kum sinekleri gibi dispersal yeteneği zayıf organizmalara ait yerel populasyonlar, buldukları ortamın mikro-klimatik koşullarına yüksek oranda adapte olmakta ve bu nedenle çevresel faktörlerdeki en küçük değişimlere ani ve farklı yönde tepkiler vermektedirler. Populasyonların ekstrem iklim şartları, kuraklık ya da kıtlık gibi çevresel sınırlayıcılara karşı tepki verme ve uyum sağlama hızlarını belirleyen fenotipik özellikler genomik ve transkriptomik modifikasyonların denetiminde oluşturulmaktadır (Hoffmann ve Harshman 1999; Hoffmann ve ark. 2002; Zhou ve ark. 2012).

Vektör böcek türlerinin de dahil olduğu tüm poikiloterm organizmaların vücut sıcaklıkları doğrudan dış ortamın sıcaklığına bağlıdır. Bu nedenle sıcaklık böceklerin gelişim, ömür uzunluğu ve hayatta kalma gibi faktörlere yön veren öncü çevresel etmenlerdendir. Çevresel sıcaklık değişimlerinden doğrudan etkilenseler de böcekler olumsuz şartlarda vücutlarının termoregülasyonlarını sağlayabilmek için daha uygun habitatlara göç ya da gece-gündüz aktivitelerini değiştirmek gibi davranışsal stratejiler uygulamalarının yanı sıra, aşırı sıcaklık iniş-çıkışlarına karşı sıcaklık değişimleri ile aktifleşen çeşitli regülatör genlerin ifade seviyelerini artırmak gibi fizyolojik mekanizmalar da geliştirmişlerdir (Denlinger ve Lee, Jr. 2010; González-Tokman ve ark. 2020). Termoregülasyonda görev alan transkriptlerin farklı sıcaklık koşullarına verdikleri tepkilerin ölçülmesi, türlerin hem ekstrem koşullara uyum süreçlerini gözlemlenmesine hem de gelecekteki olası yayılım alanlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Pimsler ve ark. 2020).

Bu tip bir termoregülatör olan *Cacophony* (*Cac*) proteini hem böcek yaşam döngüsünün her evresinde gelişim ve hayatta kalmaya etki etmekte hem de çiftleşme izolasyonu oluşturan “kur şarkısı” adı verilen kanat hareketlerinin kontrolünü sağlamaktadır (Chan ve ark. 2002; Kawasaki ve ark. 2002; Chang ve ark. 2014). Çiftleşme bariyeri oluşturmasından dolayı daha çok kompleks türlerin genetik ayrımında kullanılsa da (Lins ve ark. 2002) sıcaklık değişimlerinden doğrudan etkilenmesi ve farklı iklimsel koşullarda ayrı genetik regülasyon örüntüleri göstermesi, bu proteini türlerin farklı termal koşullar

altındaki metabolik cevaplarını incelemede kullanılabilen uygun bir belirteç haline getirmektedir (Peixoto ve Hall 1997; Yablonovitch ve ark. 2017).

Yerel popülasyonların hayatta kalma ve üreme potansiyellerini belirleyen fizyolojik modifikasyonlar aynı zamanda hastalık taşıyan böcek türlerinin vektör kapasitelerine etki etmekte ve patojenlerin ekosistemlerini değiştirmektedir (Gubler ve ark. 2001; Sternberg ve Thomas 2014). Yağış ve sıcaklık başta olmak üzere iklimsel değişimler vektörel hastalık etmenlerinin gelişim, bulaşma ve hastalığın yayılım sınırlarını değiştirmektedir (Fouque ve Reeder 2019). Genel görüş küresel iklim değişikliği ile paraziter hastalıkların prevalansında yükseliş görüleceği yönünde olsa da (Cohen ve ark. 2020) bazı türler için bu görüşün tersi tahminler de mevcuttur (Gehman ve ark. 2018).

Dişi kum sinekleri, çeşitli memeli ya da sürüngen konaklardan ömürleri boyunca en az bir kez kan emerek yumurta gelişimlerini tamamlamaktadır (Munstermann 2005). Kan emme ve sindirim süreci boyunca kum sineklerinin orta bağırsak ve tükürük bezlerinden salgılanan bazı proteinler *Leishmania* parazitlerinin gelişim, hayatta kalma ve hastalık oluşturma potansiyellerine etki etmektedir. Bu proteinlerden en fazla çalışılanları, *odor bağlayıcı proteinler* ya da *sarı proteinler* gibi immünomodülasyon yeteneğine sahip tükürük bezi proteinleridir. Bu proteinler kan emme sırasında kum sineklerinden omurgalı konağa enjekte edildiklerinde konağın bağışıklık sistemini tetikleyerek *Leishmania* parazitlerine karşı “gecikmiş tip hipersensitivite” (delayed-type hypersensitivity - DTH) adı verilen immün cevabın oluşumunu tetikleyebilmektedir (Oliveira ve ark. 2009). Ancak tükürük bezi proteinleri türlere özgü proteinler oldukları için konakta oluşturduğu immün cevap da türden türe farklılık gösterebilmektedir. Örneğin *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) ve *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 gibi türlere ait *sarı proteinler* konaktaki DTH immün cevabı artırıcı etki gösterirken (Teixeira ve ark. 2010; Vlkova ve ark. 2011), *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) türüne ait sarı proteinleri tersi etki göstererek *Leishmania* enfeksiyonunu artırıcı etki göstermektedir (Oliveira ve ark. 2008). *Phlebotomus tobbi* tükürük bezinde de *PtSP32* gibi odor bağlayıcı ve *PtSP38* gibi sarı proteinler salgılanmaktadır, ancak bu proteinlerin fonksiyonel özellikleri henüz bilinmemektedir (Rohoušová ve ark. 2012).

Tükürük bezi transkriptlerinin ifade seviyelerinin bölgesel ve mevsimsel olarak değişim gösterdiği *P. papatasi* ile yapılan Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction – RT-PZR) analizleri ile tespit edilmiştir (Ramalho-Ortigão ve ark. 2015; Hosseini-Vasoukolaei ve ark. 2016). Çevresel

faktörlerin bu tip proteinlerin salgılanma miktarlarına olan etkilerinin ortaya çıkarılması, vektör-parazit-konak dinamiklerini daha iyi anlaşılabilmesi ve küresel iklim değişikliği altında hastalığın potansiyel yayılım alanlarını belirlenebilmesi açısından epidemiyolojik bir öneme sahiptir (Coutinho-Abreu ve ark. 2011).

1.6. MALDI-TOF MS Protein Profil Analiz Yönteminin Kum Sineği Çalışmalarında Kullanım Alanı

Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer), kısa adıyla MALDI-TOF MS, bir bileşiğin yüksek enerjili bir alana bırakıldığında üretilen iyonize formların kütle/yük oranlarının hesaplanması ile bileşiklerin tanımlanmasını temel alan bir yöntemdir. Genel hatlarıyla bu yöntemde organizmaya ait tüm peptit-protein özütleri MALDI matriksinin içinde kristalize edilmekte ve bu kristaller lazer ışınları ile irrite edilerek uçucu iyonların oluşması sağlanmakta ve farklı moleküler ağırlıktaki her iyonun uçuş süreleri hesaplanmaktadır (Brown 2010). Her organizmanın özgün protein profilinin bulunması türlerin proteomik düzeyde tanımlanmasını sağlamaktadır.

Standart tekniklerle ölçülemeyecek kadar küçük moleküler ağırlıktaki proteinlerin ayrımını yapabilen, ucuz, kolay ve hızlı bir yöntem olmasından dolayı, MALDI-TOF MS protein profil analizleri epidemiyolojik öneme sahip pek çok türün tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Murugaiyan ve Roesler 2017). Bu yöntem ayrıca morfolojik ya da moleküler yöntemlerle teşhis edilemeyen yakın akraba ve tür komplekslerinin taksonomik ayrımını da olanaklı hale getirmektedir (Reeve ve Haye 2021). Yakın zamanlı çalışmalar ergin öncesi formları ile oluşturulan protein profilleri ile kompleks sivrisinek türlerinin doğru şekilde teşhisinin yapılabildiğini (Dieme ve ark. 2014), aynı zamanda vektör türlerin hastalık yükünün de ölçülebildiğini göstermiştir (Laroche ve ark. 2017).

Kum sineği türlerine ait protein profillerinden elde edilen taksonomik veri geçtiğimiz yıllarda oluşturulmaya başlanmıştır (Mathis ve ark. 2015). Aynı zamanda MALDI-TOF MS yöntemi ile farklı coğrafi bölgelerin kum sineği faunaları ortaya çıkarılmış ve yeni türler tespit edilmiştir (Lafri ve ark. 2016; Cazan ve ark. 2019; Dvorak ve ark. 2020; Pareyn ve ark. 2020). Bunun yanı sıra kum sineklerinin kan içeriklerinin bu yöntemle pratik ve hızlı analizi, bu vektörlerin konak tercihlerini belirlemede kolaylık sağlamaktadır (Hlavackova ve ark. 2019).

MALDI-TOF MS protein profil analiz yöntemi görece yeni bir yöntem olmasından dolayı, şimdilik sınırlı kullanım alanına sahiptir. Literatürde bazı vektör türlerin coğrafi alt populasyonlarının bu yöntemle ayrılması ile ilgili çalışmalar bulunsa da (Halada ve ark. 2018-B; Kniha ve ark. 2020), sıcaklık gibi çevresel etmenlerin bu tip farklı coğrafik bölgelerde yetişen populasyonların profil örüntülerine olan etkilerini ölçmede MALDI-TOF MS protein profil analiz yönteminin etkinliği henüz net olarak bilinmemektedir. Ancak daha basit yapıları organizmalar üzerinde yapılan laboratuvar deneyleri, farklı ortam koşullarında yetiştirilmiş maya kültürlerinin profil motiflerinin farklı örüntüler sergilediğini tespit ederek umut vaat edici sonuçlar göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2021).

1.7. Tez Çalışmasının Amacı

Bu tez çalışmasında yaşam öyküsü karakterlerine ve hastalık oluşumuna etki eden *Phlebotomus tobbi* transkriptlerine ait gen ifade seviyelerinin farklı çevresel koşullar altındaki değişimleri incelenmiştir. Tezin ilk basamağında, laboratuvar ortamında farklı sabit sıcaklıklar altında yetiştirilen *P. tobbi* kolonileri arasındaki gen ifade seviyeleri karşılaştırılarak, sıcaklığın doğrudan etkisinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Tezin daha sonraki adımı için, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinde yayılım gösteren *P. tobbi* alt populasyonlarının gen ifade seviyelerindeki farklılıklar ortaya konarak, farklı çevresel koşulların etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda yapılan ön çalışmalarda *P. tobbi*'ye ait üç önemli hedef gen belirlenmiştir: Sinir sistemi modülatör proteini *Cacophony (PtCac)*, odor bağlayıcı tükürük bezi proteini *Salivary Gland Protein 32 (PtSP32)* ve tükürük bezi sarı proteini *Salivary Gland Protein 38 (PtSP38)*.

Çalışmanın son aşaması olarak ise farklı coğrafi bölgelerdeki populasyonların protein örüntülerindeki farklılıkların MALDI-TOF MS protein profili analizi ile tespit edilmesi planlanmıştır. Bu çalışma ile hem farklı çevresel koşulların *P. tobbi* populasyonlarına olan etkisinin proteomik düzeyde belirlenmesi hem de MALDI-TOF MS yönteminin tek bir türün alt populasyonlarının ayırımındaki başarısının ölçülmesi amaçlanmıştır.

Türkiye'nin vektör türü olan *P. tobbi*'nin biyolojisi, epidemiyolojik önemi ve populasyon dinamikleri üzerine çok sayıda ekolojik ve genomik çalışma bulunmasına rağmen (Svobodová ve ark. 2009; Alkan ve ark. 2015; Alten ve ark. 2016; Oguz ve ark. 2017; Erisoz Kasap ve ark. 2019; Karaoglu 2020; Yilmaz 2020), literatür bilgileri değişen çevresel şartlar altında bu vektörün hayatta kalma mekanizmalarını ve vektör-parazit dinamiklerini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu tez çalışması çevresel değişkenlerin *P. tobbi* üzerindeki fizyolojik etkilerini transkriptomik ve proteomik yöntemlerle ilk kez

ortaya koyarak literatüre katkı sağlayacak ayrıca bu vektör tür için yapılacak olan daha kapsamlı transkriptomik ve proteomik çalışmalara da ön ayak olacaktır.

2. YÖNTEM

3.1. *Phlebotomus tobbi* Laboratuvar Kolonisinin Farklı Sıcaklık Koşulları Altında Yetiştirilmesi

Tez çalışması kapsamında, farklı sabit sıcaklık koşulları altında yetiştirilen *P. tobbi* bireylerinin gen ifade düzeylerindeki değişimlerinin incelenmesinde 2005 yılında Adana ilinden toplanmış doğal populasyondan elde edilen *P. tobbi* bireyleri ile kurulmuş olan Prag, Charles Üniversitesi, Parazitoloji Bölümü'nde bulunan koloniden faydalanılmıştır. Bu koloniye ait larva evresindeki *P. tobbi* bireyleri 2016 yılında Hacettepe Üniversitesi, Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarları'na (HU-EBAL) getirilerek standart iklim odası koşullarında (27°C sıcaklık, %50-60 nisbi nem, 14s aydınlık/10s karanlık fotoperiyot) en az beş jenerasyon boyunca yetiştirilmiştir (Lawyer ve ark. 2017).

Sıcaklık deneyi için, 18°C, 23°C ve 27°C olmak üzere her üç sıcaklık koşulu için iklim odası koşulundaki ana koloniden 30 erkek ve 30 dişi bireyden oluşturulan takımlar alınarak deney grupları kurulmuştur. Dişi ve erkek bireyler çiftler halinde gruplandırılarak 9x12 cm boyutlu, tabanı 1 cm ve çeperi yaklaşık 0,2 – 0,3 cm çabuk soğuyan alçı ile kaplı, ağız kısmı tüllü, yetiştirme kaplarına (pod) alınmıştır. Yetiştirme kapları ilgili sıcaklık koşullarına ayarlanmış iklim dolaplarına yerleştirilerek, burada dişilerin çiftleşmesi ve yumurtlaması sağlanmıştır. İklim dolaplarının nisbi nem ve fotoperiyot değerleri standart iklim odası koşulu ile benzer tutulmuştur. Dişiler yumurtlatıldıktan sonra yeni kuşağın ilgili sıcaklık koşulları altında yumurtadan ergin döneme kadar olan her evrenin hayatta kalma oranları ve gelişim süreleri günlük olarak kaydedilerek takip edilmiştir. Koloni oluşturulması ve kontrolü ile ilgili detaylı bilgi Yılmaz 2020 yüksek lisans tez çalışmasında açıklanmıştır.

Gelişim süreci sonucunda tüm sıcaklık koşulundan çıkan ergin dişi bireyler ileriki aşamalarda kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuda kuru halde muhafaza edilmiştir. 18°C sıcaklık koşulundan ergin çıkışı gözlenmediği için bu sıcaklık koşulu deneyden çıkarılmıştır.

3.2. Örneklem Alanları ve Arazi Çalışması

Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden toplanmış doğal *P. tobbi* populasyonlarının gen ifade düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması için 2021 yılının Ağustos ve Eylül ayları içerisinde Adana iline bağlı İmamoğlu ilçesinde, Muğla iline bağlı Datça Yarımadası ve Yozgat-Tokat sınırı arasında kalan bölgede arazi çalışmaları düzenlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Kum sineği arazi çalışması yapılan bölgelerin harita üzerindeki gösterimi.

Adana, Çukurova Havzası içinde yer alan, Akdeniz Bölgesi'nin doğusunda konumlanmış bir bölgedir. Batısı Orta Toroslar, doğusu ise Amanos Dağları ile çevrelenmiştir. Adana, Çukurova Havzası'nı da oluşturan, Seyhan ve Ceyhan nehirleri ile Tarsus Çayı'nın taşıdığı alüvyonlarla zenginleşmiş bir toprak yapısına sahiptir (<https://www.cu.edu.tr>). Akdeniz iklim özelliklerini gösteren Adana'da yıllık sıcaklık 5 - 35°C arasında değişim gösterirken, yaz aylarında 38°C'nin üzerine çıkan sıcaklık değerleri de ölçülmüştür. Özellikle kış aylarında daha çok yağış alan Adana'nın yıllık toplam yağış miktarı 661mm ve yıllık yağışlı gün sayısı ortalama 80 gündür. Çukurova Havzası'nın içinde bulunmasından dolayı bölgede görülen ortalama nisbi nem oranı %90 değerlerine kadar çıkabilmektedir (<https://www.mgm.gov.tr>). Sahip olduğu zengin topraklar ve tarıma elverişli iklimsel özellikleri nedeniyle Adana yüksek oranda iç göç alan bölgelerden biri haline gelmiştir. Ilıman iklimi aynı zamanda pek çok vektör ve vektör kaynaklı hastalık etmeni için uygun koşullar sağlamaktadır. Bu bölgede yapılan araştırmalar, bölgedeki kum sineği zenginliğinin ve populasyon yoğunluğunun yüksek olduğunu göstermiştir. Bölgenin dominant türü, *L. infantum*'un Türkiye'deki kanıtlanmış vektörü *P. tobbi* olmakla beraber, bölgede yayılım gösteren diğer türlerin çoğunun Türkiye ve çevre

ülkelerde CL ve VL'nin kanıtlanmış ya da olası vektörleri olduğu bilinmektedir (Alten ve ark. 2016). Türkiye'de raporlanan *L. infantum* kaynaklı CL vakalarının yüksek bir bölümü Adana ilinde kaydedilmektedir (Ozbel 2013). Aynı zamanda Adana ve çevresinde sirküle olan çok sayıda arbovirüs suşları da bulunmaktadır (Alkan ve ark. 2015).

Datça, Muğla ilinin güney-batısında yer alan, Ege Denizi'ne kıyı şeridi olan, dağlık ve engebeli araziye sahip bir yarımadadır. Yarımadadaki en yüksek rakımlı bölge Bozdağ (1162 m) olmakla birlikte kıyı şeridi boyunca irili ufaklı ovalık bölgeler de içermektedir. Datça Yarımadası Türkiye'nin turizm açısından önemli bölgelerinden birisidir (<http://www.datca.gov.tr/cografi-konum#>). Coğrafi olarak, Türkiye'nin Ege bölgesinde yer alan bu bölgede de tipik Akdeniz iklimi görülmektedir, ancak yıl boyunca rüzgârlı olmasından kaynaklı olarak Adana iline göre daha serin ve kurak bir iklime sahiptir. Bölgede yıl içerisinde sıcaklık 10-32°C arasında değişim gösterirken, yaz aylarında 35°C'ye kadar çıktığı görülmektedir. Datça Yarımadası'nın bir yılda yağışlı geçen gün sayısı ortalama 99, yılda bölgeye düşen toplam yağış miktarı ise 1165,2 mm'dir (<https://www.mgm.gov.tr>). Muğla ilinin dominant türü *Phlebotomus major* s.l., ikinci baskın türü ise *P. tobbi*'dir ve özellikle Datça Yarımadası'nda yoğun olarak görülmektedir (Pekağırbaş ve ark. 2021). Muğla ve çevresinde CanL vakaları çoğunlukta olmakla birlikte *L. infantum* kaynaklı CL vaka kayıtlarına da rastlanmaktadır (Utuk ve ark. 2018; Özbilgin ve ark. 2019).

Son örneklem alanı Yozgat ve Tokat illerinin sınır bölgesinde bulunan köylerdedir. Bu örneklem alanı Türkiye'nin İç Anadolu ve Karadeniz Bölgeleri arasındaki geçiş bölgesinde yer alan, Güney'de Deveci Dağları Kuzey'de ise Buzluk Dağları arasında kalan ovalık bir bölgeyi kapsamaktadır (www.site.zile.bel.tr/index.php/genel-bilgiler/). Karasal iklimin hâkim olduğu bu bölgede gece-gündüz sıcaklık farklılıkları çok yüksektir. Yozgat ve Tokat illerinin yıllık ortalama sıcaklıkları 9-12°C arasında değişim göstermektedir. Bu bölgede yaz aylarında sıcaklık 35°C'ye çıkmakta, kış aylarında ise sıcaklık -10°C'ye kadar inmektedir. Bölgedeki yıllık toplam yağışlı gün sayısı 520mm ve yağışlı gün sayısı yılda 121 gündür (<https://www.mgm.gov.tr>). Örneklem yapıldığı alan ise ovalık bir alan olduğundan dolayı sıcaklık ve nemli bir bölge içerisinde bulunmaktadır. Bu nedenle örneklem alanı Yozgat ve Tokat'ın geneline göre daha ılıman bir iklime sahiptir. Bu bölgenin dominant türü *Phlebotomus perfiliewi* s.l. olmasına rağmen örneklem alanı faunası içerisinde *P. tobbi* de bulunmaktadır (bölgeye ait faunistik bilgiler

için Kasap O. E.'ye ait basılmamış kayıtlarından yararlanılmıştır). Bu bölgeden henüz hiçbir leishmaniasis vakası kaydedilmemiş olmasına rağmen geçtiğimiz yıllarda Yozgat ilinde yaşayan iki Iraklı göçmende CL vakası görülmüştür (Özkan ve ark. 2016). Tüm örneklem alanları ile ilgili detaylı konum bilgisi Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1: Kum sineği arazi çalışmasında örneklem alınan lokasyonlara ait konum bilgileri.

Örneklem Alanı, Arazi Tarihi	İlçe	Lokasyon	Enlem	Boylam	Rakım (m)
Yozgat 20.08.2021	Zile	Büyükaköz 1	40.191553	35.514825	796
	Zile	Büyükaköz 2	40.191553	35.514825	810
	Zile	Küçükaköz 1	40.192750	35.542410	790
	Zile	Küçükaköz 2	40.191792	35.543980	792
	Çekerek	Kırkdilim 1	40.184433	35.477801	863
	Çekerek	Kırkdilim 2	40.183910	35.476013	860
Adana 05.09.2021	İmamoğlu	Otluk 1	37.301300	35.516600	215
	İmamoğlu	Otluk 2	37.300719	35.516603	212
	İmamoğlu	Otluk 3	37.301071	35.516970	210
	İmamoğlu	Otluk 4	37.300610	35.516030	210
	İmamoğlu	Otluk 5	37.301476	35.517097	225
	İmamoğlu	Otluk 6	37.299409	35.515482	226
Datça 27.09.2021	Sındı	Öğrencik 1	36.713233	27.523683	363
	Sındı	Öğrencik 2	36.713613	27.523970	363
	Sındı	Sındı 1	36.711397	27.514755	287
	Sındı	Sındı 2	36.711121	27.514083	292
	Yaka	Kumyeri 1	36.684883	27.494264	210
	Yaka	Kumyeri 2	36.684883	27.494264	210

Her örneklem alanı içinden altı lokasyon seçilmiş ve bu alanlardaki ahır ve kümes gibi çeşitli hayvan barınaklarına birer CDC ışık tuzağı (John W. Hock, USA) bırakılarak gece boyunca örneklem yapılmıştır. Tuzaklardan toplanan canlı örnekler pod içerisine alınarak laboratuvara canlı olarak getirilmiştir. Canlı örneklerin taşınması sırasında örneklerin hayatta kalması için podlar buz aküleri ile serinletilen buzlukta taşınmış ve beslenebilmeleri için her bir podun üzerine %50 oranında şekerli su çözeltisi emdirilmiş pamuk konmuştur. Arazi örnekleri laboratuvar ortamına getirildikten sonra, daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere, -80°C derin dondurucuda kuru halde muhafaza edilmiştir.

Arazi örneklerin morfolojik tür teşhisi için, RNA kaybını en aza indirmek amacıyla, dişi bireylerin abdomen kısmının son iki segmenti RiboEx Total RNA izolasyon solüsyonu (GeneAll Biotechnology Co., KR) içinde disekte edilmiştir. Bu bölge içerisinde yer alan genital bölgedeki morfolojik karakterler yardımıyla (Şekil 2), Eski Dünya ergin kum sineği teşhis anahtarları baz alınarak tür teşhisi yapılmıştır (Theodor 1958; Artemiev 1980; Lewis 1982; Killick-Kendrick ve ark. 1991). *Phlebotomus tobbi* olarak teşhis edilen dişi bireylerin kalan vücut parçaları RNA izolasyonu için ayrılmıştır.



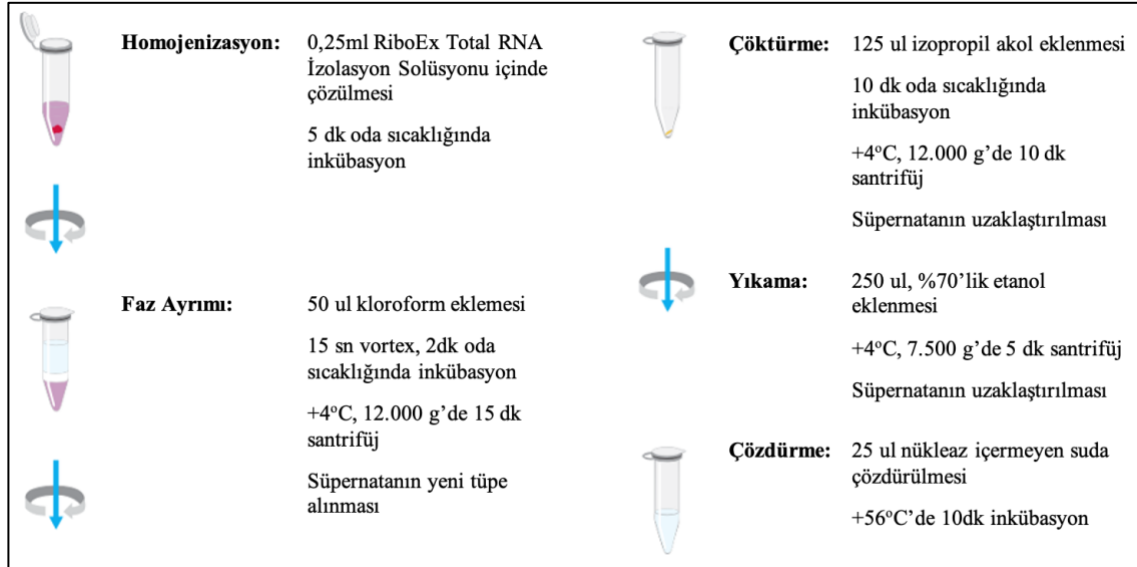
Şekil 2: *Phlebotomus tobbi* dişi abdomeninin son iki segmenti içerisinde yer alan genitalya ve morfolojik tür teşhisinde kullanılan karakterler. (Fotoğraf: Gizem Oğuz, 2019)

3.3. Gen İfadesi Analizleri

3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Gen ifadesi çalışmaları için ayrılmış tüm dişi örnekler tekli halde 0,25 ml RiboEx Total RNA izolasyon solüsyonu (GeneAll Biotechnology Co., KR) içerisine alınarak tüm dokuları parçalanana kadar homojenize edilmiştir. Üretici firmaya ait protokol takip edilerek her bireyin RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kısaca, her bir homojenat 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 50 µl kloroform eklenip 15 saniye boyunca vortekslenmiştir. İki dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra +4°C’de, 12.000 g hızında 15 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir tüpün üst kısmında kalan şeffaf sıvı yeni tüplere aktarıldıktan sonra 125 µl izopropil alkol eklenmiş ve yavaşça iki sıvının karışması sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilen karışım +4°C’de, 12.000 g hızında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerin pelet kısmına zarar verilmeden

süpernatant uzaklaştırılmış ve her tüpe 250 µl %70'lik etanol eklenmiştir. +4°C'de, 7.500 g hızında 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak pelet kısım oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Her bir bireyden elde edilen RNA miktarı çok az olacağı için, tüplerdeki RNA konsantrasyonunu artırmak amacıyla tüm örnekler 25 µl nükleaz (Promega Co., USA) içermeyen su içerisinde çözülmüştür. RNA örnekleri 56°C'de 10 dakika inkübasyondan sonra, ileri analizler için hazır hale gelmiştir (Şekil 3).

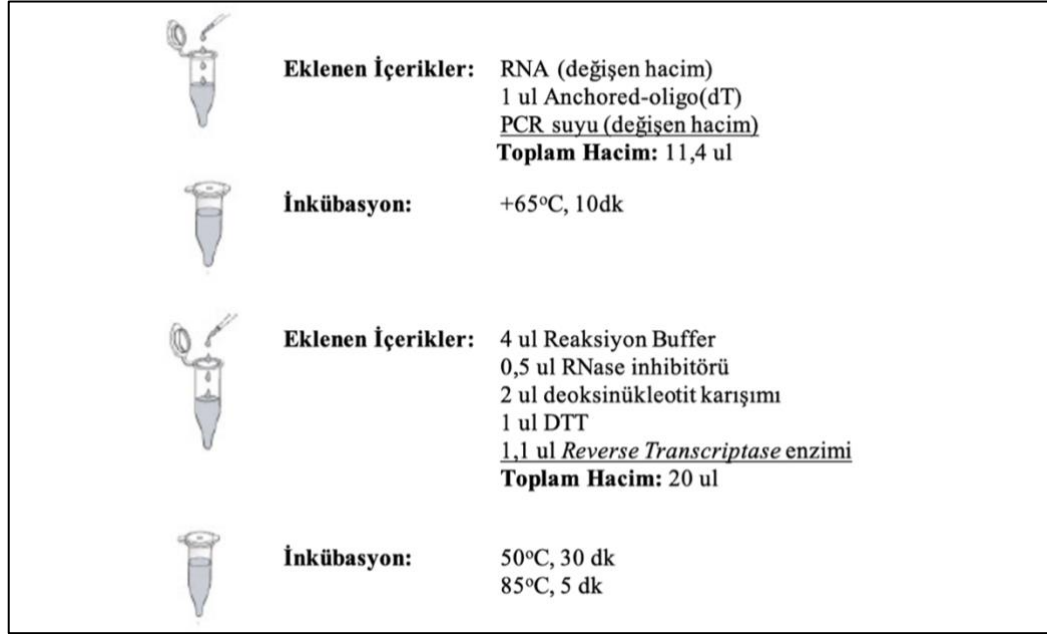


Şekil 3: RNA izolasyon aşamalarının şematik gösterimi.

Gen ifadesi analizleri sırasında genomik DNA kontaminasyonunu en aza indirmek için tüm RNA örnekleri DNase I recombinant, RNase-free kit (Roche Diagnostics, DE) kullanılarak *DNase-I* enzimi ile muamele edilmiştir. *DNase-I* enzim uygulaması için her bir örnekten 8,9 µl RNA ayrılarak üzerine 2 µl inkübasyon buffer, 0,2 µl DNase-I rekombinant enzimi ve 8,9 µl nükleaz içermeyen su eklenmiştir. Karışım +37°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra, tüplerdeki reaksiyon 2µl, 0,2 M EDTA (pH=8) eklenip 75°C'de 10 dakika inkübe edilerek durdurulmuştur. Her bireye ait RNA konsantrasyonları RNA kaybını gözlemleyebilmek için, uygulamadan önce ve sonra Quawell – Q5000 UV-VIS Spectrophotometer cihazı ile ölçülmüştür.

Tüm işlemler sonucunda elde edilen RNA örneklerinin cDNA sentezi için tüm tüplerdeki başlangıç RNA konsantrasyonları 500 ng olacak şekilde eşitlenmiştir. Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche Diagnostics, DE) kullanılarak ve bu kite ait protokol adımları izlenerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın protokolüne göre; her örnekten başlangıç konsantrasyonu 500 ng'a denk gelen µl miktarı alınarak üzerine 1 µl Anchored-oligo(dT) ve toplam hacim 11,4 µl olacak miktarda PZR suyu eklenerek +65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra her tüpe 4 µl reaksiyon buffer, 0,5 µl

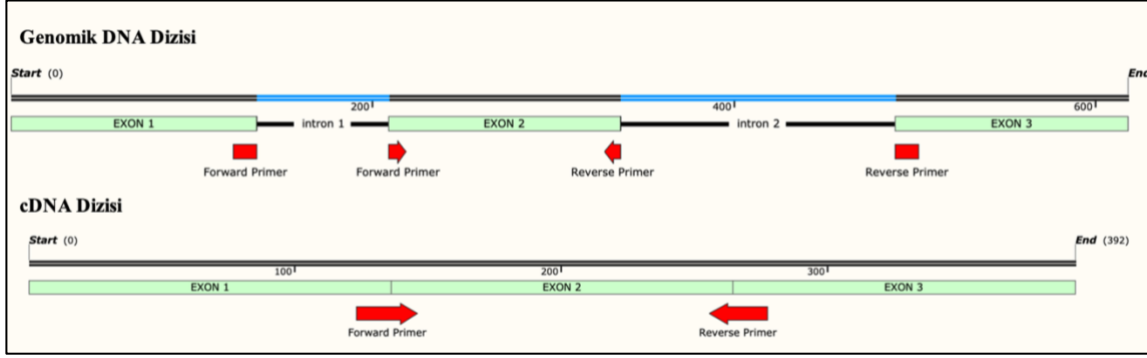
RNase inhibitörü, 2 µl deoksinükleotit karışımı, 1 µl DTT ve 1,1 µl *Reverse Transcriptase* enzimi eklenerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüm örnekler 50°C'de 30 dakika ve reaksiyonu durdurmak için 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir (Şekil 4). Elde edilen cDNA ürünleri sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80°C soğutucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 4: cDNA sentez aşamalarının şematik gösterimi.

3.3.2. Hedef Genlere Ait Özgün Primer Çiftlerinin Tasarlanması

Gen ifadesi analizlerindeki çözünürlüğü artırmak ve olası genomik DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla, hedeflenen genlere ait mRNA'dan sentezlenen cDNA dizilerine özgün bağlanma gösteren primer çiftlerinin tasarlanması amaçlanmıştır. mRNA dizilerinin genomik DNA üzerindeki ekzon bölgelerinden oluşturulduğu için intron bölgesi içermemektedir. Bu nedenle hedef genlere ait primerler dizilerinin DNA'ya özgün bağlanmasını engellemek amacıyla, RT-PZR analizlerinde kullanılan primerlerin ardışık iki ekzon üzerine denk gelecek şekilde tasarlanması amaçlanmıştır (Şekil 5). Ancak literatürde *P. tobbi*'ye ait tüm genom dizisinin bulunmaması nedeniyle gen ifadesi çalışılması planlanan genlerin genomik dizilerine ulaşamamıştır. Bu nedenle literatür ile GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), VectorBase (www.vectorbase.org) ve FlyBase (<https://flybase.org>) gibi veri tabanlarında *P. tobbi* için kalıp olabilecek yakın akrabalarına ait genomik diziler taranmıştır.



Şekil 5: Gen ifadesi analizleri için tasarlanması planlanan örnek cDNA spesifik primer çiftlerinin genomik DNA ve cDNA dizileri üzerinde şematik gösterimi.

Literatür taramaları sonucunda, tezin amacına uygun toplam 52 aday hedef gen belirlenmiştir. Bu aday genler dört ana başlık altında gruplandırılmıştır (Çizelge 2). Her bir hedef gen için *P. tobbi*'ye ait genomik diziyi elde edebilmek amacıyla çalışmalar yapılmış ancak yalnızca *Cac*, *SP32* ve *SP38* transkriptlerinde başarılı sonuç elde edilmiştir.

Aşağıda her bir hedef gen için tasarlanan primerler için yapılan çalışmalar alt başlıklar halinde anlatılmaktadır.

Çizelge 2: Gen ifadesi deneylerinde analiz edilmesi planlanan aday hedef genler ve fonksiyonları.

Grup	Aday Hedef Gen	Referans Organizma	Fonksiyonu	Kaynakça
Sıcaklık hassasiyeti olan proteinler	<i>Heat Shock Protein 70 (HSP 70)</i>	<i>Culex pipiens</i>	Sıcak/soğuk stresine tepki veren protein katlanmasında yardımcı moleküler şaperonlar	Lee ve ark. 2012
	<i>Heat Shock Protein 90 (HSP 90)</i>	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex pipiens</i>	Sıcaklık ve kuraklık stresine tepki veren polipeptid katlanmalarında yardımcı şaperonlar	Benoit ve ark. 2010; King ve MacRae 2015
	<i>Heat Shock Protein 22 (HSP 22)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mitokondriyal HSP	Morrow ve ark. 2004
	<i>Cacophony (Cac)</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Voltaj kaplı kalsiyum kanallarını kodlama ve kur şarkısını kontrolü	Lins ve ark. 2002
Tükürük bezi proteinleri	<i>Salivary Gland Protein (SP) 37, SP38</i>	<i>Phlebotomus tobbi</i>	Yellow-related protein; konağa enjekte edildiğinde <i>Leishmania</i> 'ya karşı immün cevap oluşumunu sağlayan kum sineği antijeni	Rohousova ve ark. 2012
	<i>SP04, SP10</i>	<i>Phlebotomus tobbi</i>	Apyrase; hematofajik organizmalarda bulunan kan pıhtılaşmasını önleyici enzimler	Rohousova ve ark. 2012
	<i>SP73</i>	<i>Phlebotomus tobbi</i>	<i>Phlebotomus ariasi</i> SP25 benzeri protein, memeli konaklarda immün cevap oluşumunu indükleyen, antijenik özellikte olan kum sineğine özgü protein	Rohousova ve ark. 2012
	<i>SP77, SP79</i>	<i>Phlebotomus tobbi</i>	Antigen-5 protein, immün sistem proteini	Rohousova ve ark. 2012
	<i>SP28</i>	<i>Phlebotomus tobbi</i>	<i>P. papatasi</i> SP32 benzeri protein, kum sineklerine özgü kollajen bağlama özelliği olan protein	Rohousova ve ark. 2012
	<i>SP42, SP44, SP54, SP56, SP5, SP58, SP60</i>	<i>Phlebotomus tobbi</i>	D7-related protein; arthropod feromonları	Rohousova ve ark. 2012
	<i>SP09, SP17, SP18, SP23, SP31, SP32</i>	<i>Phlebotomus tobbi</i>	<i>P. papatasi</i> SP 15 benzeri proteinler; konağı <i>Leishmania</i> 'ya karşı koruyuculuğu olan odorant bağlanma proteinleri	Rohousova ve ark. 2012
Orta Bağırsak Proteinleri	<i>Galectin (galec)</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>Leishmania</i> 'nın kum sineği orta bağırsağına bağlanmasını sağlayan reseptör protein	Kamhawi ve ark. 2004; Jochim ve ark. 2008
	<i>Trypsin 1 (tryp1), tryp2, tryp3, tryp4</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus perniciosus</i>	Proteolitik enzim	Ramalho ve ark. 2003; Dostálová ve ark. 2011
	<i>Chymotrypsin (chym) 1, chym 2, chym 3, chym 4</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus perniciosus</i>	Proteolitik enzim	Ramalho ve ark. 2004; Dostálová ve ark. 2011
	<i>Peritrophin (per) 1, per2, per3, Chitinase</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Peritrofik matrix proteinleri	Dostálová ve ark. 2011
	<i>Mikrovillar proteinler (MVP1, MVP2, MVP3, MVP4, MVP5)</i>	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Böcek-alerjen proteinleri	Dostálová ve ark. 2011
Morfolojiyi etkileyen Proteinler	<i>FAT (ft)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Transmembran proteini	Matamoro-Vidal ve ark. 2015
	<i>Drosophila cold acclimation (Dca)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Soğuk aklimasyon geni	Arboleda-Bustos ve Segarra 2011
	<i>Senescence marker protein-30 (smp-30)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Yaşlanma marker proteini	Arboleda-Bustos ve Segarra 2011
	<i>Four-jointed (fj)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Kanat damarlanmasının gelişimi ile görevli protein	Matamoro-Vidal ve ark. 2015
	<i>Insulin receptor (InR) 1, InR2</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Kanat boyutunun belirlenmesinde görev alan insülin reseptörleri	Xu ve ark. 2015
	<i>Thickveins (tkv)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Embriyonun dorsoventral polaritesinin kontrolü	Zimmerman ve ark. 2000
	<i>Disco-related (disco-r)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Nöral gelişim, vücut yapısının düzenlenmesi	Zimmerman ve ark. 2000
<i>twenty-four (tyf)</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Circadian clock geni	Zimmerman ve ark. 2000	

PtCac:

Daha önceki çalışmalarda *P. tobbi Cacophony* genine ait yaklaşık 200 bç'lik bölgenin izolasyonu yapılmıştır (Karaoğlu 2020). Bu dizi BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) programları aracılığıyla veri tabanlarındaki genomik dizilerle karşılaştırıldığında VectorBase veri tabanından elde edilen *Lutzomyia longipalpis Cacophony (LlCac - LLOJ006699-RA)* geninin 19. ekzonu ile yüksek oranda eşleştiği gözlenmiştir (Şekil 6).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		
LLOJ006699-RA:	ATGTGCCACAGCGAGGCGTGGCCGAACATAATGTTAGCCTGCTTAAGGGAAGACCATG	60
KDL2_tobbi_yozgat_PtCac	-----GTGGCCGAACATAATGTTAGCCTGCTTAAGGGAAGACCATG	42

LLOJ006699-RA:	TGATGAGCGAGCTGGTAAAGAACCCACGAAACATGTGGGTTCATCTCTGGCTTATGCATA	120
KDL2_tobbi_yozgat_PtCac	TGATGAGCGAGCTGGCAAAGAACCCACGAAACATGTGGGTTCATCTCTGGCTTATGCATA	102

LLOJ006699-RA:	CTTCGTGTCCTTCATCTTTTCTGTTTCGTTCTTGGTACGTTTCTCTCGCCACTCTCGCG	180
KDL2_tobbi_yozgat_PtCac	CTTCGTGTCCTTCATCTTTTCTGTTTCGTTCTTGGTACGTTTCTCTCGCCACTCTCGCG	162
***** * * * *		
LLOJ006699-RA:	CATCTTTCATTCCCGAAAATTCACACGATTCAACATAAAAATTCATGCTTTTCCCTAT	240
KDL2_tobbi_yozgat_PtCac	CTTCTTAGGAAATTCCAAAC-----TACTG-----ATCTTGTT	197
* *		
LLOJ006699-RA:	TTTTTATTTAGATGTTGAAC TTGTTTCGTTGGCCGTTATCATGGACAAC TTGACTACCTA	300
KDL2_tobbi_yozgat_PtCac	TTCTTCCATTAGATGTTGAAC TTGTTTCGTTGG-----	228
** *		

Şekil 6: *P.tobbi* ve *L. longipalpis*'e ait *Cacophony* genine ait dizilerin Clustal Omega programında üst üste karşılaştırılması. KDL2_tobbi_yozgat_PtCac: *PtCac* gen bölgesi (Karaoğlu 2020), LLOJ006699-RA: *LlCac* geni 19. ve 20 ekzon bölgeleri arasına ait genomik dizi. Gri boyalı kısımlar *LlCac* geninin ekzon bölgelerini betimlemektedir. "*" işareti iki dizide birbiriyle eşleşen nükleotidleri göstermektedir.

Bu iki dizideki, özellikle ekzon bölgelerindeki eşleşmeden yola çıkarak, *PtCac* genine ait ekzon-intron örüntüsünü belirlemek için, Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) programı aracılığıyla *LlCac* geninin 18. ve 21. intron bölgeleri içerisinde 671 bp'lik bir bölgeyi çoğaltan uygun primer çifti tasarlanmıştır. *L. longipalpis* ait bu bölge sırasıyla 154, 128 ve 139 bp'lik üç ekzon ile 94 ve 181 bp'lik iki intron bölgesini kapsamaktadır. Bu primerler kullanılarak *P. tobbi* DNA ve cDNA örnekleri ile Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler cihazında 1 döngü, 95°C'de dakika; 35 döngü, 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika; 1 döngü, 72°C'de 5 dakika koşullarında, GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase kiti (Promega Co., USA) kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gerçekleştirilmiştir (Şekil 7).

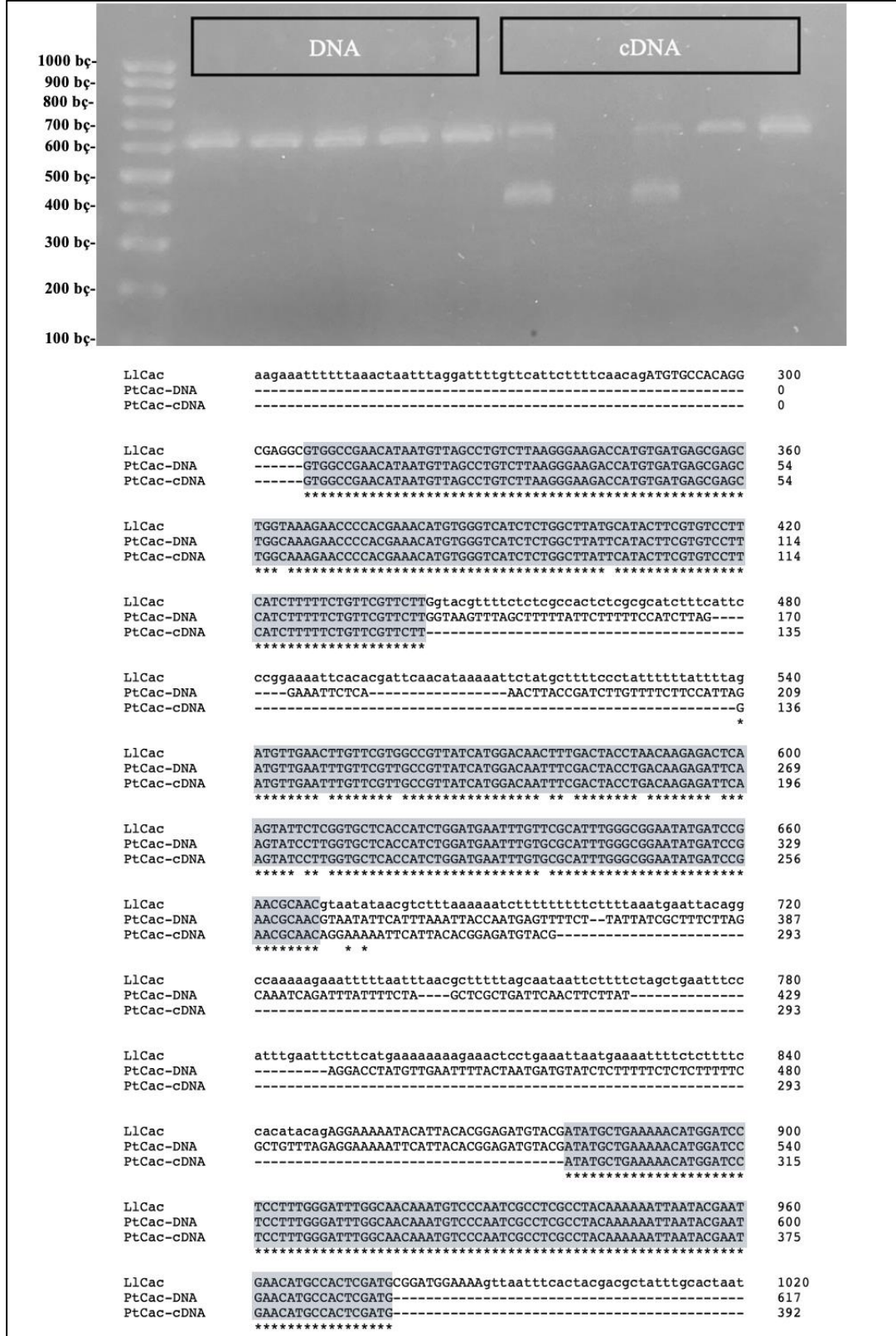
LLOJ006699-RA L. longipalpis Cacophony Intron 18- Inrton 21:

```
atgtgatagtgatcctaaattaggaagttaattatacataaattagaaaaaaaagaattacctaaatccttaga
aatcacgtatattggaatatttaatttaaattgtctatgcaaacaaaggacaatgagctagaagaaggtaaaagtgc
taaaatcattgatttttcttgattctaactcattgtccggagtttaagtatttaattgagtttttagtgcagaaa
ataaaattaaaaaagaatttttttaactaatttaggattttgttcattcttttcaacagATGTGCCACAGGCGAG
GCGTGGCCGAACATAATGTTAGCCTGTCTTAAGGGAAGACCATGTGATGAGCGAGCTGGTAAAGAACCCACGAAA
CATGTGGGTCATCTCTGGCTTATGCATACTTCGTGTCCTTCATCTTTTCTGTTCGTTCTTGgtacgttttctctc
gccactctcgcgcacatctttcattcccggaaaattcacacgattcaacataaaaaattctatgcttttccctattttt
tatttttagATGTTGAACCTGTTTCGTGGCCGTTATCATGGACAACCTTGACTACCTAACAGAGACTCAAGTATTCT
CGGTGCTCACCATCTGGATGAATTTGTCGCATTTGGCGGGAATATGATCCGAACGCAACgtaataataacgtcttt
aaaaaatcttttttttcttttaaatgaattacaggccaaaaaagaatttttaatttaacgcttttttagcaataat
tcttttctagctgaatttccatttgaatttcttcatgaaaaaaaagaactcctgaaattaatgaaaattttctct
tttccacatacagAGGAAAAATACATTACACGGAGATGTACGATATGCTGAAAAACATGGATCCTCCTTTGGGATT
TGGCAACAAATGTCCCAATCGCCTCGCCTACAAAAAATTAATACGAATGAACATGCCACTCGATGCGGATGAAAA
gtaatttcactacgacgctatttgcactaattcgggaaaatttaaacatcaaaatgagatcgggtgagtcctttt
gtttaaacgcaatttatgtgaaagaaaatattcgaatgatttgcagaaggaatcaaaataatcggcagataaaca
tatttttttaagtataaaagacacagattaaagagcaaaaacttcaaagtcaattcaaagtacttttaacttc
aaaaactactaaa
```

Şekil 7: LICac (LLOJ006699-RA) 18. ve 21. intronlar arası genomik dizisi ve *PtCac* genin ilgili bölgesini tespit etmek için tasarlanan primer çiftlerinin dizi üzerindeki yerleri. Küçük harfli kısımlar intron, büyük harfli kısımlar ekzon ve gri boyalı kısımlar İleri (5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3'), Geri (5'-CATCGAGTGGCATGTTTCATT-3') primerlerin dizi üzerindeki konumlarını belirtmektedir.

Reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde DNA örneklerinde yaklaşık 700 bp'lik bir bant, cDNA örneklerinde ise sırasıyla yaklaşık 700 bp ve 400 bp'lik iki bant gözlenmiştir. Bu farkı aminoasit dizileriyle de ortaya koymak için PZR örneklerinin Sanger sekanslama tekniği ile dizileri oluşturulmuş ve elde edilen diziler *LICac* gen dizisi ile üst üste karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre, sırasıyla 136, 128 ve 128 bp'lik *LICac* geninin ekzon bölgeleri ile yüksek oranda eşleşme göstermiştir. Bu çalışma sonucunda *PtCac* genine ait 617 bp'lik gen bölgesi için ekzon-intron örüntüsü ortaya çıkarılmıştır (Şekil 8).

Elde edilen yeni genomik dizi kalıp olarak kullanılarak *PtCac* için RT-PZR analizlerine uygun 154 bp'lik bir bölgeyi çoğaltan primer dizileri tasarlanmıştır. Yalnızca cDNA dizisini hedef alması için iki primerin de intron bölgelerini kesmesi sağlanmıştır. Tasarlanan yeni primerlerin cDNA'ya özgül bağlandığı DNA ve cDNA örneklerinde PZR analizi ile test edilerek doğrulanmıştır. *PtCac* geni için tasarlanan primerlere ait detaylı bilgi Çizelge 3'de gösterilmektedir.



Şekil 8: *Phlebotomus tobbi* DNA ve cDNA örneklerine ait PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki ve bu örneklerin Sanger sekans sonuçlarının üst üste çakıştırılmış görüntüleri. Gri boyalı kısımlar *PtCac* geninin olası ekzon bölgelerini betimlemektedir. “*” işareti iki dizide birbiriyile eşleşen nükleotidleri göstermektedir.

PtSP32:

Odor bağlayıcı protein ailesinden olan *P. tobbi Salivary Gland Protein 32 (PtSP32)*, *P. papatasi*'ye ait *PpSPI5*-benzeri protein olarak tanımlanmakta ve yalnızca belli türlerde salgılanmaktadır (Rohoušová ve ark. 2012). Bu proteine sahip kum sineği türleri için yapılan literatür ve veri tabanı taramalarında ekzon-intron örüntüsünü gösteren hiçbir genomik diziyeye ulaşılamamıştır. Bu nedenle *PtSP32* için GenBank veri tabanından elde edilen 529 bç uzunluğundaki mRNA dizisi (GenBank erişim numarası: HM164144.1) üzerinde çalışılmıştır. Bu transkriptoma ait genomik DNA dizisinin intron bölgesi içerip içermediğini test etmek amacıyla mRNA dizisinin baş ve son kısımlarına denk gelecek uygun primer çifti tasarlanıp bu bölgenin tamamı çoğaltılmıştır (Şekil 9).

```
HM164144.1 TSA: Phlebotomus tobbi Phtom2 A01 14.6 kDa salivary
PpSPI5-like protein mRNA, complete cds, mRNA sequence

ACCAACCATGAACTATTTAGTCGCTGTAAGTATTTCTGCAGTCTTTCTTGCTAGAAGCTGCCAAGGAGACCATC
CGGAAGCTAAATGCATCAGAGATTTCAAGGATAAGAACCCAGCATGTATCATCCATTGCAAGTACAACCTTTTAC
AAGTTCACCGATGATAAGTACAACATCAATGATGAACATATGCGTAAACTTTTCAGATATCCTGATAAAGTATAA
GGCAGTGGATGCTGCCAAAAGACTCAAGTGGATCAACATTTGAAGAAATGCAAAGAAGAAGCAATGAAAAAGT
CTAAAACCTCAAGTTGTGAGAGAATCATGTATTATTACTCGTGCCTTGTGACCTCAGATTGATCGACTATTAT
AAGTACAACGACGCTATGAAGACCTATGATAAATCTATCTACTTGTGCGGTTATTCAAACATAATGACCAATAA
AATGTATTTGGTTTGAAGAATAATAATTTGTCAAAACATATAATAATAAAATGCATATAAATAAAAAAAAAA
AAAAAAAAA
```

Şekil 9: *Phlebotomus tobbi PtSP32* mRNA dizisi (HM164144.1). Gri boyalı bölgeler genomik dizi için tasarlanmış İleri (5'- CAAGGATAAGAACCCAGCA -3') ve Geri (5'- ATCATAGGTCTTCATAGCGTC -3') primer çiftinin dizi üzerindeki konumlarını betimlemektedir.

Daha önce belirtilen PZR koşulları uygulanarak *P. tobbi* DNA ve cDNA örnekleri ile bu gen bölgesi için PZR yapılmış ve PZR ürünleri Sanger sekanslama yöntemi ile dizilenmiştir. Sonuçlar üst üste karşılaştırıldığında DNA ve cDNA dizileri arasında 63 bç'lik bir fark gözlenmiştir (Şekil 10). Bu farkın *PtSP32* geni için intron bölgesi olabileceği göz önünde bulundurularak RT-PZR analizinde kullanılacak uygun primer çifti tasarlanmıştır. Primerler cDNA'da 173 bç uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltmaktadır ve yalnız ileri primer olası intron bölgesini kesmektedir. Primerlerin DNA dizisine bağlanıp bağlanmadığı *P. tobbi* DNA ve cDNA örneklerinde PZR analizi ile test edilip doğrulanmıştır. *PtSP32* primer çiftleri hakkında detaylı bilgi Çizelge 3'de verilmiştir.

3.3.2. RT-PZR analizi

Gen ifadesi analizine başlanmadan önce tüm cDNA örneklerinin konsantrasyonları spektrometre cihazında ölçülmüş ve her birinin başlangıç konsantrasyonları PZR suyu ile sulandırılarak eşitlenmiştir.

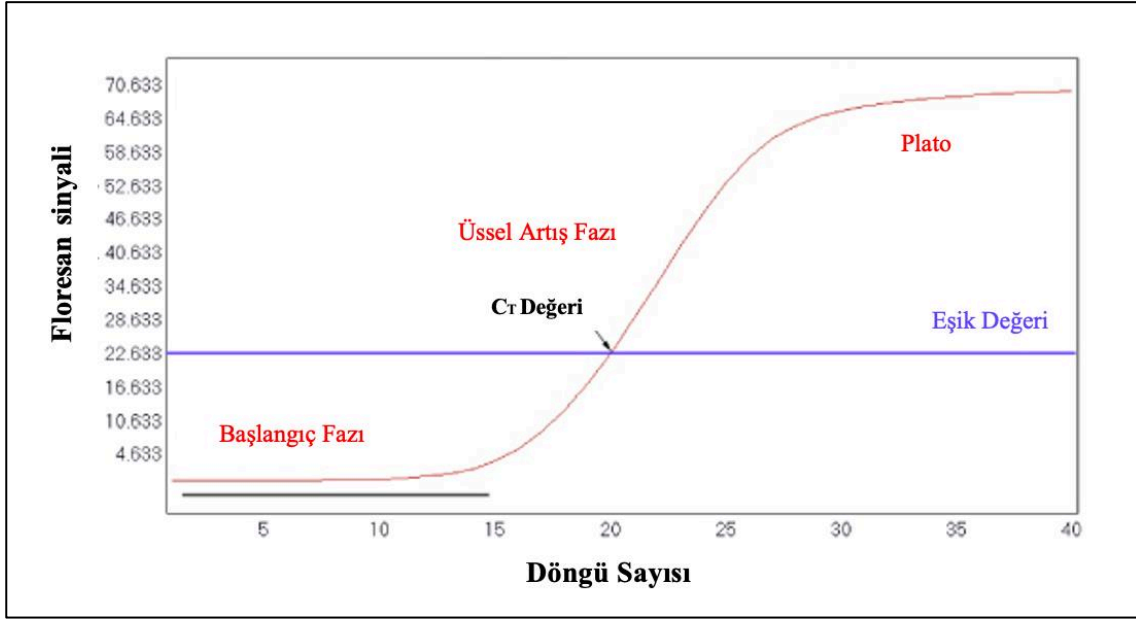
Gen ifadesi deneyleri Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System cihazında GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (Promega Co., USA) SYBR Green kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bir hedef genin reaksiyonu için 10 µl GoTaq qPCR Master Mix (2X), 0.2 µl ileri ve geri primer, 2 µl cDNA ve 7.6 µl PZR suyu kullanılmıştır. Tüm örnekler uygun şekilde 96'lı RT-PZR kuyucuklarına yüklendikten sonra reaksiyon ilgili kitin önerdiği standart döngü koşulları (95°C – 2dk, 1 döngü; 95°C – 15 sn ve 60°C – 1dk, 40 döngü) uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Gen ifadesi deneylerinde housekeeping referans gen olarak, ön çalışmalarla uygun şekilde çalıştığı kanıtlanmış, Ponton ve ark. 2011'de önerilen *18S-rRNA* primer çifti kullanılmıştır (İleri: 5'-CTGAGAAACGGCTACCACATC-3', Geri: 5'-ACCAGACTTGCCCTCCAAT-3').

Laboratuvar kolonileri için gerçekleştirilen RT-PZR analizlerinde iki sıcaklık koşulu için 10 adet dişi kullanılmış ve tüm hedef genler için gerçekleştirilen her reaksiyon iki kez tekrarlanmıştır. Arazi çalışmalarından elde edilen *P. tobbi* örneklerinden her bölge için 25 dişi birey seçilmiştir. Bu set için uygulanan RT-PZR deneyleri 5'erli gruplar halinde gerçekleştirilmiştir. Tüm hedef genler için her bölgeden 5 dişi örnek rastgele olarak 5 adet gruba ayrılarak 96'lı kuyucuklara ikişer tekrar olacak şekilde yüklenmiştir. Hedef genin amplifikasyon miktarını gösteren floresan sinyallerinin eşik değerini aştığı döngü sayısını belirten ve Ct değeri olarak adlandırılan eşik döngü sayısı, her bir reaksiyon için ayrı ayrı hesaplanmış (Şekil 12), örneklere ait iki tekrarın Ct değerlerinin ortalaması alınmıştır. Ct değeri 35'in üzerinde olan örnekler ileri hesaplamalara dahil edilmemiştir.

Tüm RT-PZR analizlerinde kullanılan örneklerin 96'lı kuyucuklara yerleşim sırası ve RT-PZR sonuçlarına ait grafik görüntüleri Ek 1, Ek 2 ve Ek 3'te mevcuttur.

Hedef genlerin gen ifade seviyelerinin göreceli olarak hesaplanması için kontrol gruplarının belirlenmesi gerekmektedir. Laboratuvar deneyleri için standart iklim odası koşulu olan 27°C sabit sıcaklığı kontrol grubu olarak seçilmiştir. Arazi örnekleri için ise, hem *P. tobbi*'nin bu bölgenin dominant türü olması hem de en uygun ve daha stabil çevresel koşullara sahip olmasından kaynaklı Adana örneklem alanı kontrol grubu olarak alınmıştır.



Şekil 12: Bir hedef gene ait amplifikasyon eğrisinin şematik görüntüsü.

Gen ifadelerindeki göreceli değişimler, bir grubun hedef genindeki ifade seviyesinin kontrol grubuna kıyasla ne kadar değiştiğini ortaya koyan $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu yöntemle göre, öncelikle her bir örneğin hedef gen için elde edilen C_T değerlerinin aynı örneğin Housekeeping referans gene ait C_T değerlerine göre farkı alınarak normalize edilmiş, ΔC_T değerleri oluşturulmuştur. Daha sonra ΔC_T değeri belirlenen kontrol grubunun ΔC_T ortalamasından çıkartılarak, $\Delta\Delta C_T$ değeri hesaplanmıştır. Son olarak tüm örneklerin $2^{-\Delta\Delta C_T}$ katı alınarak kontrol grubuna kıyasla gen ifadesi miktarı belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi için yapılan hesaplamalar aşağıda formüle edilmiştir:

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Hedef Gen})} - C_{T(\text{Housekeeping Gen})},$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Değişken Grup})} - \text{Ortalama } \Delta C_{T(\text{Kontrol Grubu})},$$

$$\text{Hedef genin miktarı} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.3.3. Veri analizi

İki farklı sıcaklık koşulunda yetiştirilen laboratuvar kolonilerindeki gen ifade seviyelerinin karşılaştırmalı analizi için parametrik olmayan Wilcoxon testi kullanılmıştır. Gen ifade seviyelerinin sıcaklıkla olan ilişkisi ise korelasyon ve regresyon testleri ile ortaya konmuştur.

Phlebotomus tobbi doğal popülasyonları arasındaki gen ifade farklılıklarını tespit etmek için üç örneklem alanına ait sonuçlar parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi ile analiz

edilmiş, anlamlı farklılık gözlenen gruplarda ise Mann-Whitney U post-hoc testi uygulanarak ikili karşılaştırmalar yapılmıştır.

Doğal populasyonlardaki gen ifade değişimlerini çevresel faktörlerle ilişkilendirmek amacıyla Türkiye Cumhuriyeti Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nden (www.mgm.gov.tr) örneklem alanlarına ait iklimsel veriler toplanmıştır. Araziden örneklenen ergin *P. tobbi* bireylerinin ergin öncesi gelişim dönemlerinde maruz kaldıkları çevresel koşulların da ergin bireylerin hedef gen ifadeleri üzerinde etkili olabileceği düşünülmüştür. Kum sineklerinin gelişimlerini tamamlayabilmeleri için gerekli olan çevresel koşulların sağlandığı yaz mevsiminde *Phlebotomus tobbi*'nin bir jenerasyonunun tamamlanması için gerekli olan sürenin ortalama bir ay olduğu daha önceki çalışmalarla belirlenmiştir (Yılmaz 2020). Bu nedenle, bu çalışmada *P. tobbi* örneklerinin toplandığı lokalitelere ait günlük ortalama sıcaklık ve günlük ortalama bağıl nem verileri, arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği tarihten yaklaşık bir ay öncesini kapsayacak şekilde temin edilmiştir.

Bu değerler kendi aralarında Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U post-hoc testleri ile değerlendirilmiştir. Her bir hedef gene ait sonuçlar ile iklimsel veriler arasındaki ilişkiler ise negatif binomial regresyon modelleri ile analiz edilmiştir. Bu modele göre ilişkilendirilmek istenen her değişken parametrenin hem tek hem de kümülatif etkileri test edilebilmektedir (Irwin 2006).

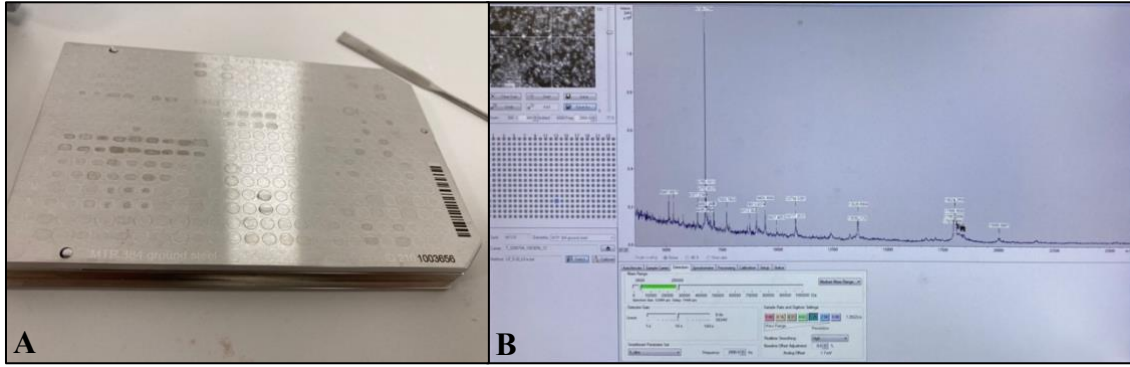
Tüm istatistiksel analizler ve grafikler R istatistik versiyon 4.1.2 programı (PBC, Boston) kullanılarak yapılmıştır.

3.2. MALDI-TOF MS Protein Profili Oluşturulması

Türkiye de yayılım gösteren *P. tobbi* doğal populasyonlarının protein örüntülerindeki farkları gözlemek ve MALDI-TOF MS yönteminin bu populasyonların ayırımını yapabilme etkinliğini tayin etmek amacıyla Prof. Dr. Ömür Çelikbıçak'ın önderliğinde ve Öğr. Gör. Dr. Melis Şardan Ekiz'in katkıları ile Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HUNITEK) bünyesindeki Bruker Daltonics Ultraflex extreme cihazı kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. Protein profil analizleri için uygun yöntem ve protokolün oluşturulmasında, kum sinekleri üzerine MALDI-TOF MS çalışmalarına öncülük eden Prag, Charles Üniversitesi Parazitoloji Bölümü'nden Dr. Vit Dvorak ve Dr. Petr Halada'nın yürüttüğü çalışmalar kaynak olarak alınmıştır (Dvorak ve ark. 2014; Hlavackova ve ark. 2019).

Arazi çalışmalarından toplanan dişi bireylerin abdomen kısımlarının son iki segmenti kuru ortamda disekte edilmiş ve daha önce bahsedilen karakterler (Şekil 2) baz alınarak morfolojik tür teşhisleri yapılmıştır. Her bölgeden 10'ar adet *P. tobbi* dişi bireyi protein profil analizi için ayrılmıştır. Dişilerin kalan vücut parçaları içerisinde 10ul %25'lik formik asit çözeltisi bulunan 1,5ml'lik eppendorf tüplerinin içine teker teker alınarak tüm hücreleri parçalanana kadar bu sıvı içerisinde homojenize edilmiştir. Vücut parçalarını dibe çöktürmek için tüm örnekler 10.000g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

Protein iyonizasyonu için %60'luk Asetonitril ve %0,3'lük TFA sinapinik asit solventi ile MALDI Matriks solüsyonu hazırlanmış, 2 µl örnek üzerine 2 µl MALDI Matriks solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra tüm karışım MALDI-TOF MS target plate üzerine bırakılmıştır (Şekil 13A). Tüm örnekler target plate üzerinde kristalize edilmiş ve Bruker Daltonics Ultraflexextreme cihazına yüklenmiştir.



Şekil 13: A) MALDI-TOF MS target plate ve B) Bruker Daltonics flexAnalysis 3.4 programı

Proteinlerin pozitif iyon kütle spektrumlarını oluşturmak için, her bir örneğe ait kristalize olmuş protein kümeleri Bruker Daltonics flexAnalysis 3.4 programında görüntülenerek rastgele seçilen en az 20 farklı kristalize protein kümesine 1000 lazer atışı uygulanmıştır. Kütle spektrumları doğrusal modda, 2–25 kDa aralığında ölçülmüştür (Şekil 13B).

Sonuçların değerlendirilmesi için, Dr. Vit Dvorak ve Dr. Petr Halada tarafından Türkiye için *P. tobbi* referans veri tabanı oluşturulmuştur. Bu veri tabanı üç grup içermektedir. İlk grup Charles Üniversitesi Parazitoloji Bölümü'nde bulunan Adana'da doğal popülasyonundan köken almış *P. tobbi* koloni örneklerinden, ikinci grup ekibin arşivinde bulunan ve 2014 yılında Antalya'dan toplanan arazi örneklerinden ve son grup önceki yıllarda Balkan ülkelerinden toplanmış örneklerden oluşturulmuştur. Protein profil analizlerinde elde edilen sonuçlar bu veri tabanı ile karşılaştırılarak en yüksek skorda eşleşme gösteren iki grup ortaya çıkartılmıştır ve en yüksek skor değerleri ile dendrogram grafiği çizilerek kümelenmeler incelenmiştir.

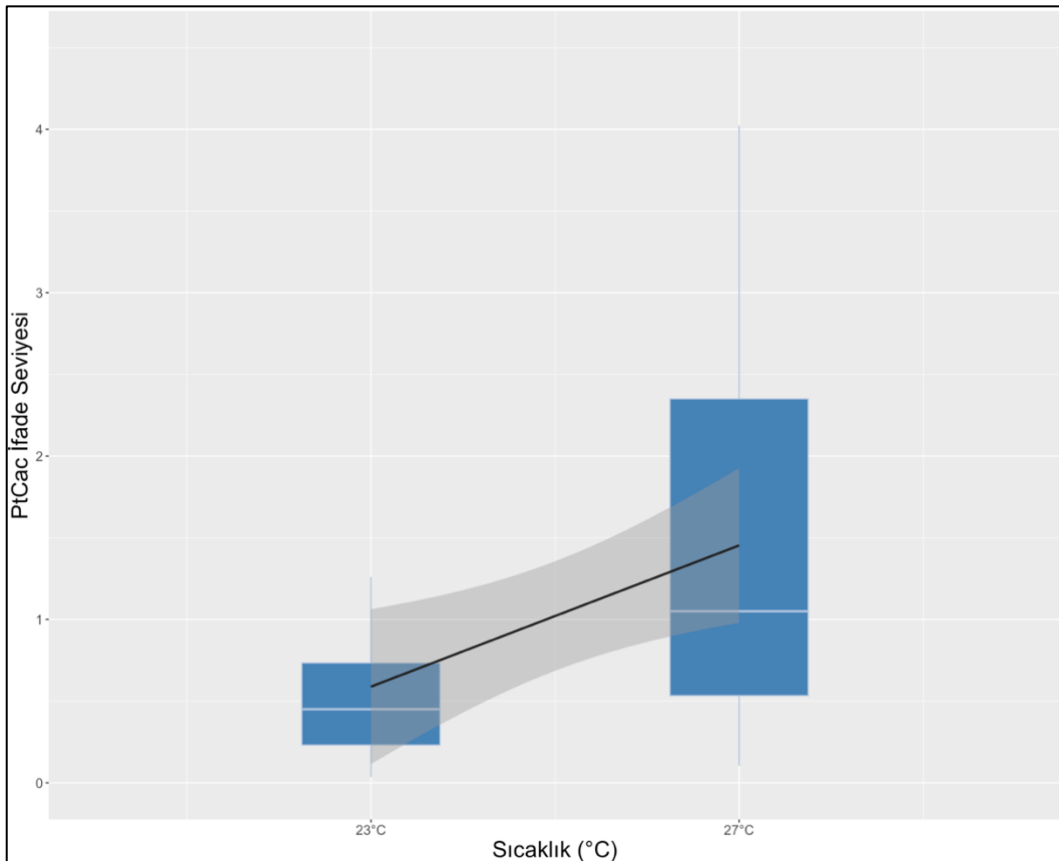
3. BULGULAR

3.1. Gen İfadesi Çalışmasına Ait Bulgular

3.1.1. *P. tobbi* Koloni Örnekleri ile İlgili Bulgular

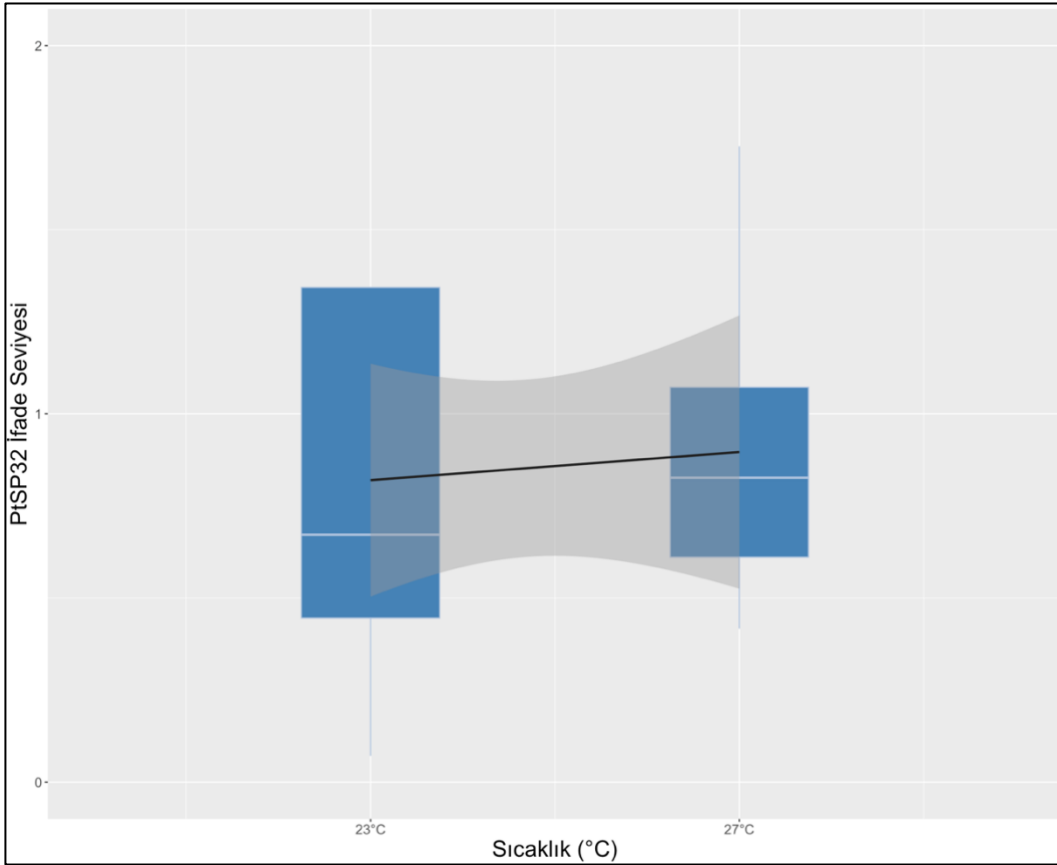
Farklı sabit sıcaklık koşulları altında yetiştirilen *P. tobbi* laboratuvar kolonilerine ait *PtCac* gen ifadesi deneylerinde 27°C sıcaklık koşulu için bir, 23°C sıcaklık koşulu için iki örnekten sonuç alınamamıştır (Ek 1) Tüm hedef genlere ait istatistik veriler Çizelge 4’te özetlenmiştir.

İki sıcaklık koşulu arasındaki *PtCac* ifade seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p = 0,018$). Kontrol grubu 27°C sıcaklık koşulu altında yetişen dişilerdeki *PtCac* seviyesi 23°C sıcaklık koşuluna göre daha yüksek ölçülmüştür. İstatistiksel analizler laboratuvar kolonisi için *PtCac* gen ifade değişimleri ile sıcaklık arasında anlamlı bir pozitif korelasyon ($p = 0,013$) olduğunu göstermektedir (Şekil 14).



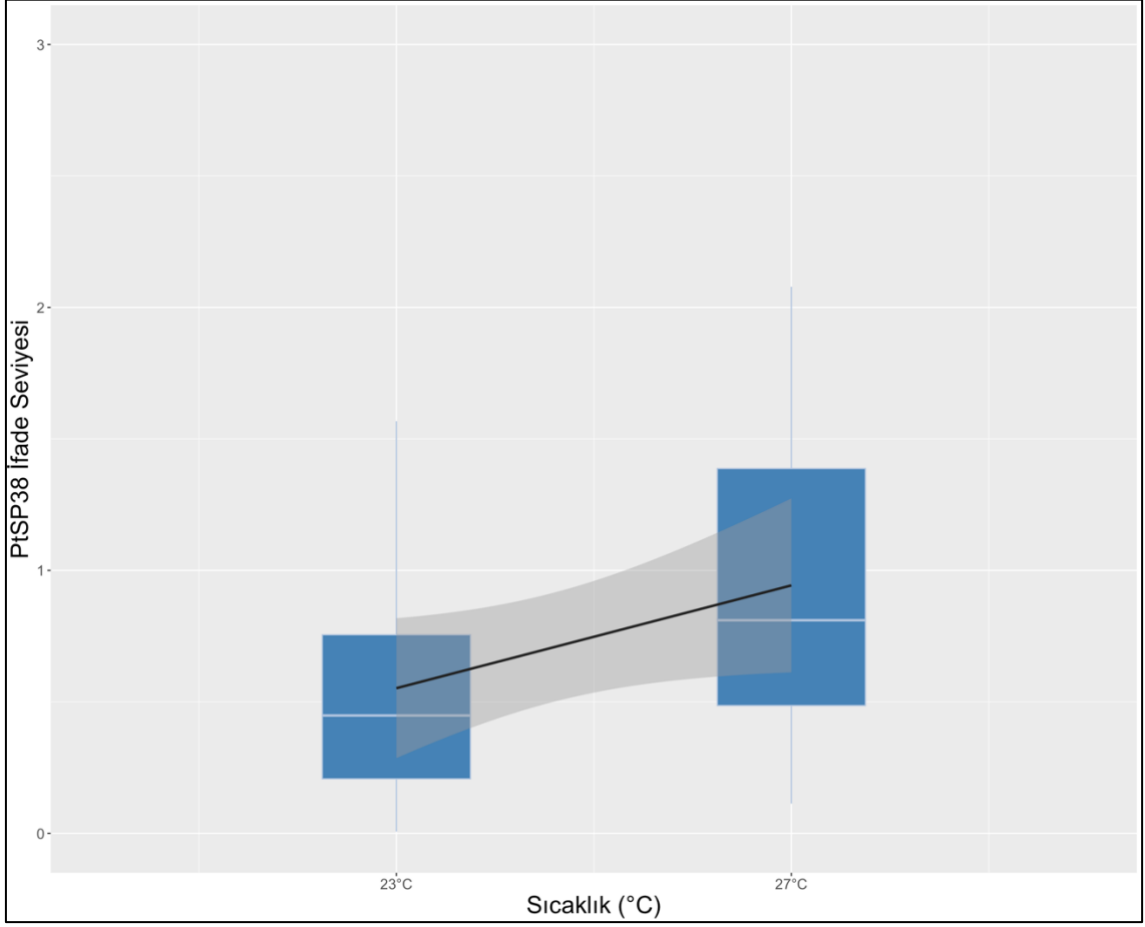
Şekil 14: Farklı sıcaklık koşulları için laboratuvar kolonilerine ait *PtCac* gen ifade seviyeleri ve regresyon eğrisi.

PtSP32 transkripti için yapılan RT-PZR analizlerinde 27°C sıcaklık koşulu için üç örnekten sonuç alınamamıştır. 23°C sıcaklık koşulunda ise dört örnek çalışmamış ve iki örneğe ait C_T değeri ise her iki tekrarında da 35'in üstünde çıktığı için analizlerden çıkartılmıştır. Laboratuvar kolonilerindeki *PtSP32* gen ifade seviyeleri karşılaştırıldığında iki sıcaklık koşulu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0,20$; Şekil 15).



Şekil 15: Farklı sıcaklık koşulları için laboratuvar kolonilerine ait *PtSP38* gen ifade seviyeleri ve regresyon eğrisi.

Son hedef gen *PtSP38*'e ait RT-PZR analizlerinde 27°C sıcaklık koşulundaki tüm örneklerden sonuç alınırken, 23 °C sıcaklık koşulu için yalnızca bir örnek çalışmamıştır. Hedef gen için yapılan istatistiksel sonuçlar, 27°C sıcaklık koşulunda yetişen dişilerdeki *PtSP38* gen ifade seviyelerinin 23 °C sıcaklık koşuluna göre daha yüksek olduğunu ($p = 0,005$) ve gen ifade seviyelerindeki değişimin çevresel sıcaklık ile anlamlı bir pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 16).



Şekil 16: Farklı sıcaklık koşulları için laboratuvar kolonilerine ait *PtSP38* gen ifade seviyeleri ve regresyon eğrisi.

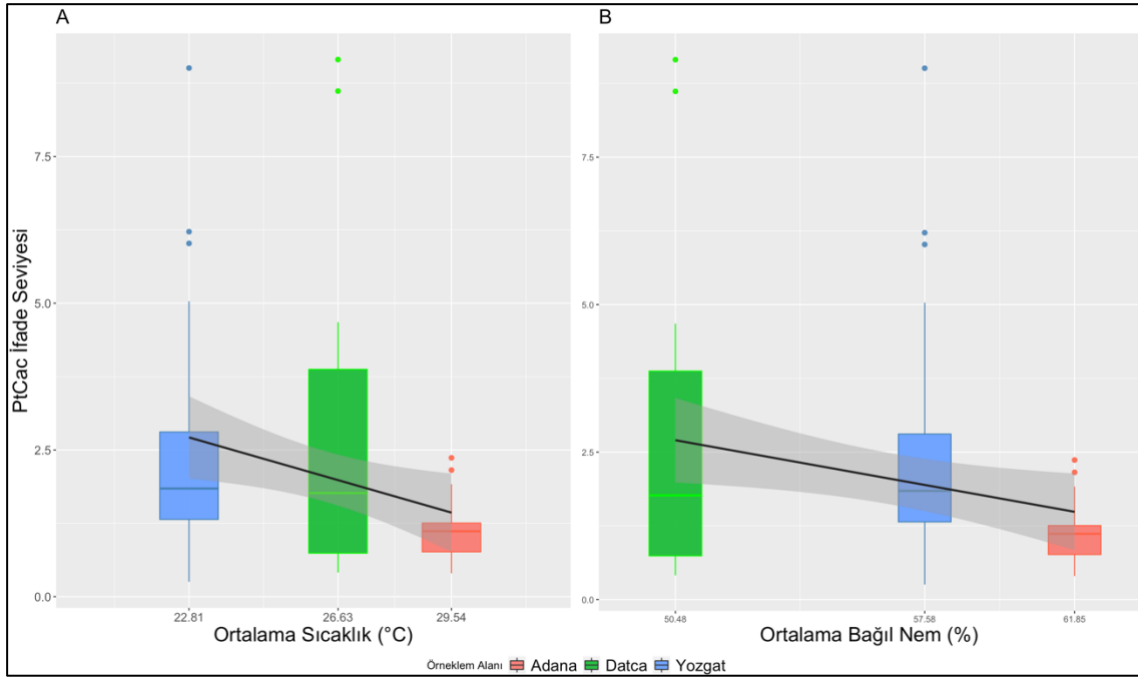
Çizelge 4: Hedef genlerin her sıcaklık koşulu için ortalama gen miktarları ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), ortalama standart hataları ve istatistiksel test sonuçları. “*” işareti anlamlı bulunan p değerlerini belirtmektedir.

	<u><i>PtCac</i></u> Ortalama Gen Miktarı ± Ortalama Standart Hata	<u><i>PtSp32</i></u> Ortalama Gen Miktarı ± Ortalama Standart Hata	<u><i>PtSp38</i></u> Ortalama Gen Miktarı ± Ortalama Standart Hata
23°C	0,59 ± 0,13	0,67 ± 0,20	0,38 ± 0,11
27°C	1,45 ± 0,30	2,25 ± 0,82	3,32 ± 1,25
Wilcoxon Test	W = 55, $p = 0,018^*$	W = 59, $p = 0,20$	W = 72, $p = 0,005^*$
Korelasyon (r) ve Regresyon Testleri	r = 0,45 $p = 0,013^*$	r = 0,36 $p = 0,07$	r = 0,37 $p = 0,024^*$

3.1.2. *P. tobbi* Doğal Populasyonları ile İlgili Bulgular

Üç farklı coğrafi bölgede bulunan *P. tobbi* doğal populasyonlarına ait *PtCac* gen ifadesi deneylerinde test edilen 5 grup arasında fark bulunmamıştır ($p_{Kruskal}=0,054$). Bu nedenle tüm sonuçlar birleştirilerek istatistiksel analizler yapılmıştır. Örneklem alanlarından analize alınan 25'er bireyden Adana'dan 18, Datça'dan 17 ve Yozgat'tan 19 örnek için sonuç alınabilmiştir (Ek 2). Tüm hedef genlerin ortalama gen ifadesi miktarı, ortalama standart hataları ve karşılaştırmalı istatistiksel analizler Çizelge 5'te verilmiştir.

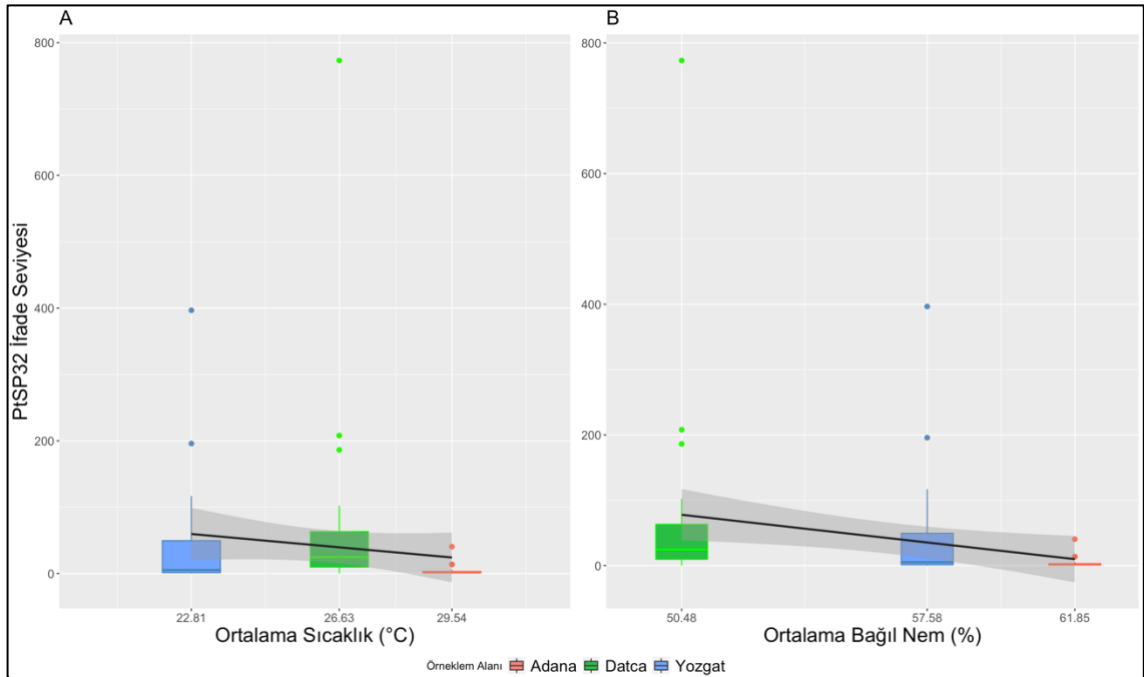
Üç bölgenin *PtCac* ifade seviyeleri karşılaştırıldığında gen ifade seviyesinin Adana'da en düşük olduğu ($1,14 \pm 0,10$) gözlenmiştir (Şekil 17). Datça ve Yozgat populasyonlarının *PtCac* gen ifade miktarları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamakla beraber Datça populasyonuna ait bireylerin gen ifade seviyelerinin ortalama değerin çok daha üstüne çıktığı tespit edilmiştir. Mann-Whitney U ikili karşılaştırmalarında yalnızca Adana ve Yozgat populasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p = 0,015$).



Şekil 17: Üç farklı *P. tobbi* doğal populasyonlarına ait *PtCac* gen ifade seviyeleri. A) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel sıcaklık arasındaki regresyon eğrisi, B) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel bağıl nem arasındaki regresyon eğrisi.

İkinci hedef gen *PtSP32* transkripti için yapılan gen ifadesi deneylerinde Adana, Datça ve Yozgat için sırasıyla 20, 16 ve 18 birey başarıyla analiz edilmiştir (Ek 2). Bu hedef gen için de 5 deney grubu arasında fark tespit edilmediğinden ($p_{Kruskal}=0,05$), tüm bireyler birleştirilerek istatistiksel analizlere alınmıştır.

Farklı coğrafi bölgelerden örneklenen *P. tobbi* bireyleri arasındaki gen ifade miktarları karşılaştırıldığında en yüksek *PtSP32* seviyesinin Datça populasyonunda ($74,49 \pm 31,17$), en düşük ise Adana’da ($4,35 \pm 1,67$) olduğu gözlenmiş; iki bölge arasındaki bu fark karşılaştırmalı istatistiksel analizlerde de doğrulanmıştır ($p < 0,05$). Yozgat’tan örneklenen bireylerin *PtSP32* seviyesinin ($44,47 \pm 17,75$), diğer örneklem alanlarından bireylere göre istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p = 0,05$) gözlenmiştir (Şekil 18).

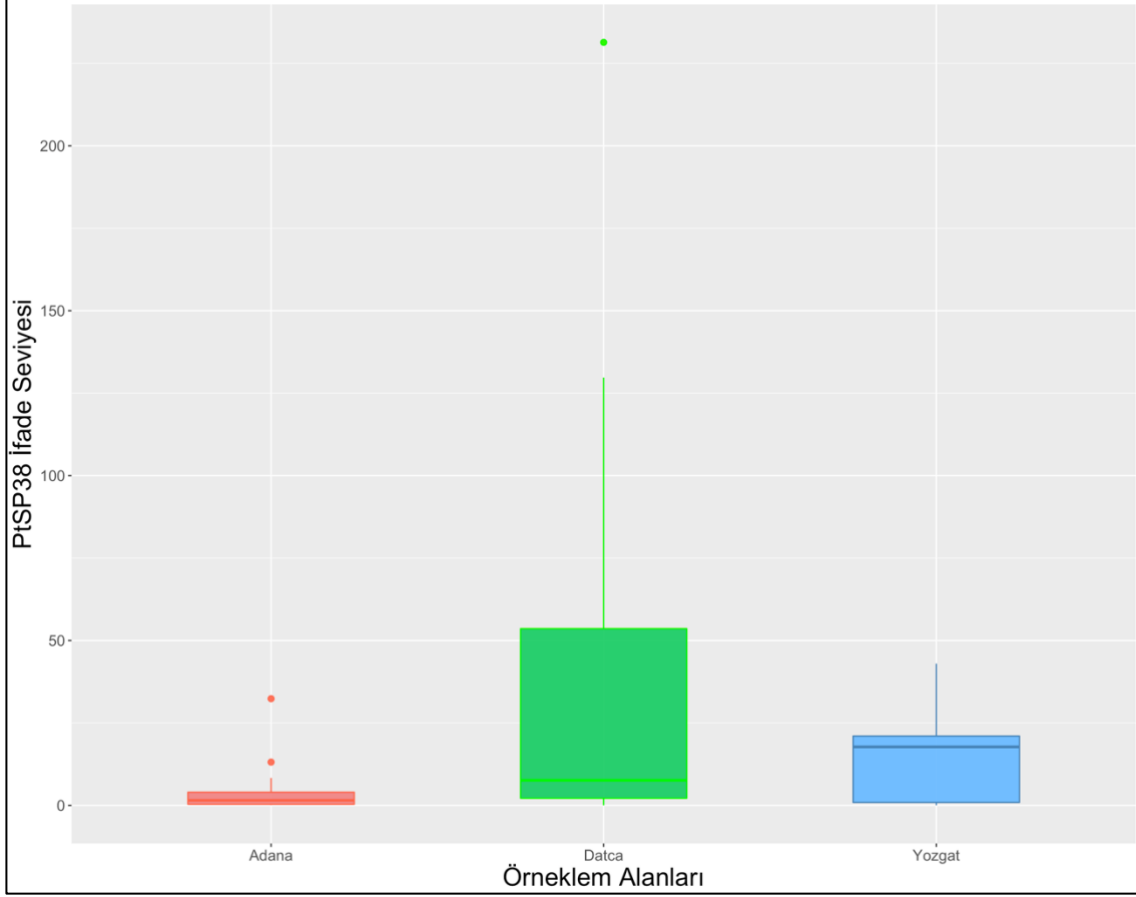


Şekil 18: Üç farklı *P. tobbi* doğal populasyonlarına ait *PtSP32* gen ifade seviyeleri. A) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel sıcaklık arasındaki regresyon eğrisi, B) Gen ifade seviyesi ve ortalama çevresel bağıl nem arasındaki regresyon eğrisi.

PtSP38 hedef geni için 3. grup için yapılan RT-PZR deneyleri çalışmamış, 2. gruptan elde edilen veriler ise ana veride yüksek oranda sapmaya neden olmuştur. Bu nedenle *PtSP38* gen ifade seviyeleri üç grup üzerinden analiz edilmiştir (Ek 3).

Her üç grupta çalışılan 15'er bireyden Adana ve Datça'dan 11, Yozgat'tan ise 7 örnek için başarılı sonuç alınabilmiştir. Örneklem alanlarındaki hedef gene ait ifade seviyelerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak bir anlam bulanamamış olsa da ($p = 0,07$) *PtSP38* transkriptinin en yüksek ifade olduğu bölge Datça ($44,29 \pm 16,93$), en

düşük ifade olduğu bölge ise Adana ($4,65 \pm 2,19$) olarak belirlenmiştir. Yozgat popülasyonuna ait bireylerin gen ifade değerlerinin ($13,37 \pm 3,20$) ise bu iki örneklem alanı arasında kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 19).



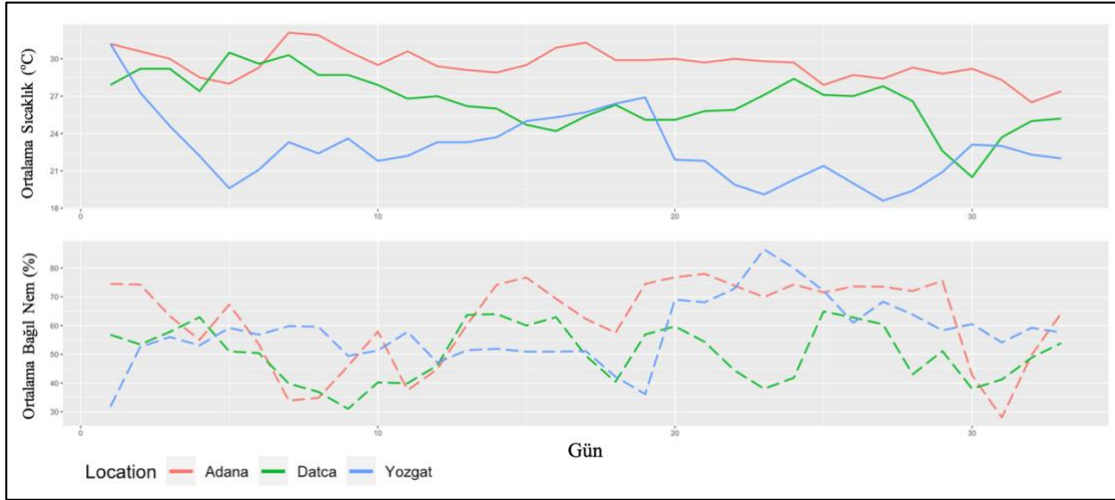
Şekil 19: Üç farklı *P. tobbi* doğal popülasyonlarına ait *PtSP38* gen ifade seviyeleri.

Çizelge 5: Hedef genlerin örneklem alanları için ortalama gen miktarı ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), ortalama standart hataları ve istatistiksel test sonuçları. “*” işareti anlamlı bulunan p değerlerini belirtmektedir.

	<u><i>PtCac</i></u>	<u><i>PtSp32</i></u>	<u><i>PtSp38</i></u>
	Ortalama Gen Miktarı ± Ortalama Standart Hata	Ortalama Gen Miktarı ± Ortalama Standart Hata	Ortalama Gen Miktarı ± Ortalama Standart Hata
Adana	1,14 ± 0,10	4,35 ± 1,67	4,65 ± 2,19
Datça	2,49 ± 0,48	74,49 ± 31,17	44,29 ± 16,93
Yozgat	2,49 ± 0,42	44,47 ± 17,75	13,37 ± 3,20
Kruskal-Wallis Testi	$X^2 = 8,04$ $p = 0,018^*$	$X^2 = 18,69$ $p < 0,05^*$	$X^2 = 5,39$ $p = 0,07$
Mann-Whitney U İkili Karşılaştırma	Adana vs. Datça: $p = 0,075$ Adana vs. Yozgat: $p = 0,015^*$ Datça vs. Yozgat: $p = 0,669$	Adana vs. Datça: $p < 0,05^*$ Adana vs. Yozgat: $p = 0,05$ Datça vs. Yozgat: $p = 0,05$	-

Üç farklı coğrafi bölgede bulunan *P. tobbi* doğal populasyonlarının gen ifade seviyelerini karşılaştırmak ve iklimsel verilerle ilişkilendirmek amacıyla TC. Meteoroloji Genel Müdürlüğü’nden arazi tarihlerinden bir ay öncesine kadar alınan günlük kayıtlar incelendiğinde, ortalama sıcaklık en yüksek Adana’da (29,54°C), en düşük ise Yozgat örneklem alanında belirlenmiştir (22,81°C). Ortalama Bağıl Nem değerlerinde ise en yüksek örneklem alanı Adana (%61,85), en düşük örneklem alanı ise Datça (%50,48) olarak belirlenirken, Yozgat’a ait verilerin (%57,58) bu iki örneklem alanı arasında değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 20).

Bölgeler arası yapılan karşılaştırmalı analizler her üç örneklem alanının ortalama günlük sıcaklık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir ($p < 0,05$). Ortalama günlük bağıl nem değerleri için yalnızca Adana ve Yozgat örneklem alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p = 0,06$). Tüm örneklem alanlarına ait iklimsel veriler ve karşılaştırmalı istatistiksel analizler Çizelge 6’te özetlenmektedir.



Şekil 20: Örneklem alanlarına ait 30 günlük iklimsel verinin şematik görünümü.

Çizelge 6: Örneklem alanlarında ölçülen 30 günlük iklimsel verilere ait değerler ve istatistiksel analizler.

	<u>Ortalama Günlük Sıcaklık</u> <u>(°C)</u>	<u>Ortalama Günlük Bağlı Nem</u> <u>(%)</u>
Adana	Maks.= 32,10 Min. = 26,50 Ort. = 29,54	Maks.= 78,00 Min. = 28,00 Ort. = 61,65
Datça	Maks.= 30,50 Min. = 20,50 Ort. = 26,63	Maks.= 64,90 Min. = 31,00 Ort. = 50,48
Yozgat	Maks.= 31,20 Min. = 18,60 Ort. = 22,81	Maks.= 86,50 Min. = 31,80 Ort. = 57,58
Kruskal-Wallis Testi	$X^2 = 63$ $p < 0,05^*$	$X^2 = 14$ $p = 0,001^*$
Mann-Whitney U İkilî Karşılaştırma	Adana vs. Datça: $p < 0,05^*$ Adana vs. Yozgat: $p < 0,05^*$ Datça vs. Yozgat: $p < 0,05^*$	Adana vs. Datça: $p = 0,002^*$ Adana vs. Yozgat: $p = 0,06$ Datça vs. Yozgat: $p = 0,032^*$

Doğal *P. tobbi* populasyonları arasındaki gen ifade farklılıklarının iklimsel verilerle olan ilişkisini ortaya koymak için yapılan negatif binomial regresyon modellerinde *PtCac* gen ifadesindeki bölgesel değişimler ile ortalama günlük sıcaklık değerleri arasında, laboratuvar kolonilerinin aksine, negatif bir ilişki ($p = 0,018$) olduğu gözlenmiştir (Şekil 17A). Aynı zamanda ortalama günlük bağlı nem değerleri ile de istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0,024$) bir negatif bir korelasyon tespit edilmiştir (Şekil 17B). Modele göre bu iki değişkenin kümülatif etkisi ilişkiyi kuvvetlendirici yöndedir ($p < 0,05$).

PtSP32 geni için yapılan modellemede ise yalnızca ortalama günlük bağlı nem miktarı ile istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0,021$) bir negatif ilişki belirlenmiştir (Şekil 18B).

Ortalama günlük sıcaklık ve *PtSP32* gen ifade değişimleri arasında tek başına anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p = 0,24$). Ancak bu iki çevresel değişkenin kümülatif etkisi test edildiğinde ortalama sıcaklıkla negatif bir ilişki ($p < 0,05$) gözlenebilmiştir (Şekil 18A).

PtSP38 geni için ise bölgeler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediği için iklimsel ilişkilendirme yapılmamıştır.

3.2. MALDI-TOF MS Protein Profil Analizlerine Ait Bulgular

Üç ayrı coğrafi bölgeden toplanan *P. tobbi* doğal populasyonlarına ait protein profilleri MALDI-TOF MS protein profil analiz yöntemi ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Prag'da oluşturulan referans veri tabanı ile eşleştirilerek populasyonlar sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen bulgularda, populasyonların protein motifleri arasında ufak farklılıklar olmasına rağmen benzer örüntüler gözlenmiştir (Ek 4).

Protein profilleri referans veri tabanı ile eşleştirildiğinde elde edilen bulgular eşleşme skorlarına göre, en yüksek (+++), yüksek (++) , düşük (+) ve güvenilir olmayan eşleşme (-) olmak üzere dört kategoride değerlendirilmektedir. Çalışılan hiçbir birey için en yüksek skorda eşleşme gözlenmemiştir. Adana için analiz edilen 10 bireyin hepsinin referans veri tabanındaki Adana populasyonu ile yüksek skorlarda eşleşme gösterdiği tespit edilmiştir. Örneklerden yalnızca iki tanesi (Adana - 5 ve Adana - 9) düşük skorda eşleşme göstermiştir. En yüksek ikinci eşleşme ise yine yüksek skorla Antalya referans grubu olmuştur. Öte yandan, Adana - 5 protein profili ikincil eşleşme göstermemiştir (Çizelge 7).

Datça örnekleri için elde edilen sonuçlarda Datça - 4 ve Datça - 5 bireyelerine ait protein örüntüleri hiçbir referans grupta tanımlanamamıştır. Datça doğal populasyonuna ait örneklerden beş tanesi yüksek (Datça - 6, Datça - 7, Datça - 8, Datça - 9, Datça - 10), iki tanesi (Datça - 2, Datça - 3) düşük skorla olmak üzere Adana referans grubu ile, Datça - 1 örneği ise düşük skorla, Antalya grubu ile eşleşme göstermiştir. Datça - 7, Datça - 8 ve Datça - 9 protein profillerinde hem Adana hem de Antalya referans grubuyla yüksek skorlarla eşleşme tespit edilmiştir. Datça - 6 örneğinde Balkan referans grubuyla, Datça - 10 protein profilinde ise Antalya grubu ile düşük skorlu ikinci en iyi eşleşme tespit edilmiştir. Diğer bireylerde ise hiçbir ikincil eşleşme gözlenmemiştir (Çizelge 7).

Yozgat'a ait 10 adet *P. tobbi* örneğinden yalnızca Yozgat - 2 protein örüntüsü Adana referans grubu ile yüksek skorda eşleşme göstermiştir. Bu örnekte ikinci olarak Balkan

grubuyla düşük skorda eşleşme gözlenmiştir. Yozgat -6 ve Yozgat - 8 örneklerine ait protein profilleri yalnızca Adana in- house referans grubuyla, Yozgat - 1 ve Yozgat - 3 protein profilleri ise hem Adana hem de Antalya referans gruplarıyla düşük skorda eşleşmiştir. Çalışılan diğer örnekler ise hiçbir referans grubuyla eşleşme göstermemiştir (Çizelge 7).

Doğal populasyonların en iyi eşleşme gösteren gruplara ait skorlarla elde edilen dendogram grafiğinde sınıflandırıldığında hiçbir referans grubuyla eşleşme göstermeyen Yozgat ve Datça örnekleri birlikte kümelenme göstermiştir. Diğer bireyler ise iki ayrı grupta kümelenmiştir. Birinci grup yalnızca yüksek skorla Adana koloni referans grubuyla eşleşme göstermiş Datça ve Adana bireylerini içerirken, Datça – 9 bireyi bu küme içerisinde tek başına bir dalda temsil edilmiştir. Eşleşme gösteren tüm Yozgat örneklerini içeren ikinci kümelenme ise iki ana dala ayrılmaktadır. Bu dallardan birinde Antalya referans grubuyla eşleşmiş Datça – 1 örneği, en düşük eşleşme skorlarına sahip iki Datça, iki Yozgat ve bir Adana örneği ile birlikte kümelenmiştir (Şekil 21).

Çizelge 7: *Phlebotomus tobbi* arazi örneklerinin referans veri tabanı ile yapılan eşleştirme sonuçları.

Birey Adı	En İyi Eşleşme	Skor		En İyi İkinci Eşleşme	Skor	
Adana - 1	Adana	2,199	(++)*	Antalya	2,049	(++)
Adana - 2	Adana	2,061	(++)	Antalya	2,014	(++)
Adana - 3	Adana	2,006	(++)	Antalya	1,705	(+)
Adana - 4	Adana	2,093	(++)	Antalya	1,867	(+)
Adana - 5	Adana	1,797	(+)	Eşleşme yok	1,402	(-)
Adana - 6	Adana	2,019	(++)	Antalya	1,822	(+)
Adana - 7	Adana	2,188	(++)	Antalya	1,904	(+)
Adana - 8	Adana	2,195	(++)	Antalya	1,924	(+)
Adana - 9	Adana	1,996	(+)	Antalya	1,718	(+)
Adana - 10	Adana	2,239	(++)	Antalya	2,072	(++)
Datça - 1	Antalya	1,852	(+)	Eşleşme yok	1,421	(-)
Datça - 2	Adana	1,876	(+)	Eşleşme yok	1,662	(-)
Datça - 3	Adana	1,880	(+)	Eşleşme yok	1,686	(-)
Datça - 4	Eşleşme yok	1,608	(-)	Eşleşme yok	1,439	(-)
Datça - 5	Eşleşme yok	1,163	(-)	Eşleşme yok	1,070	(-)
Datça - 6	Adana	2,046	(++)	Balkan	1,763	(+)
Datça - 7	Adana	2,149	(++)	Antalya	2,017	(++)
Datça - 8	Adana	2,216	(++)	Antalya	2,075	(++)
Datça - 9	Adana	2,333	(++)	Antalya	2,169	(++)
Datça - 10	Adana	2,156	(++)	Antalya	1,825	(+)
Yozgat - 1	Adana	1,960	(+)	Antalya	1,770	(+)
Yozgat - 2	Adana	2,067	(++)	Balkan	1,752	(+)
Yozgat - 3	Adana	1,945	(+)	Antalya	1,790	(+)
Yozgat - 4	Eşleşme yok	1,496	(-)	Eşleşme yok	1,461	(-)
Yozgat - 5	Eşleşme yok	1,154	(-)	Eşleşme yok	0,949	(-)
Yozgat - 6	Adana	1,766	(+)	Eşleşme yok	1,658	(-)
Yozgat - 7	Eşleşme yok	1,552	(-)	Eşleşme yok	1,376	(-)
Yozgat - 8	Adana	1,834	(+)	Eşleşme yok	1,663	(-)
Yozgat - 9	Eşleşme yok	1,415	(-)	Eşleşme yok	1,410	(-)
Yozgat - 10	Eşleşme yok	0,958	(-)	Eşleşme yok	0,925	(-)

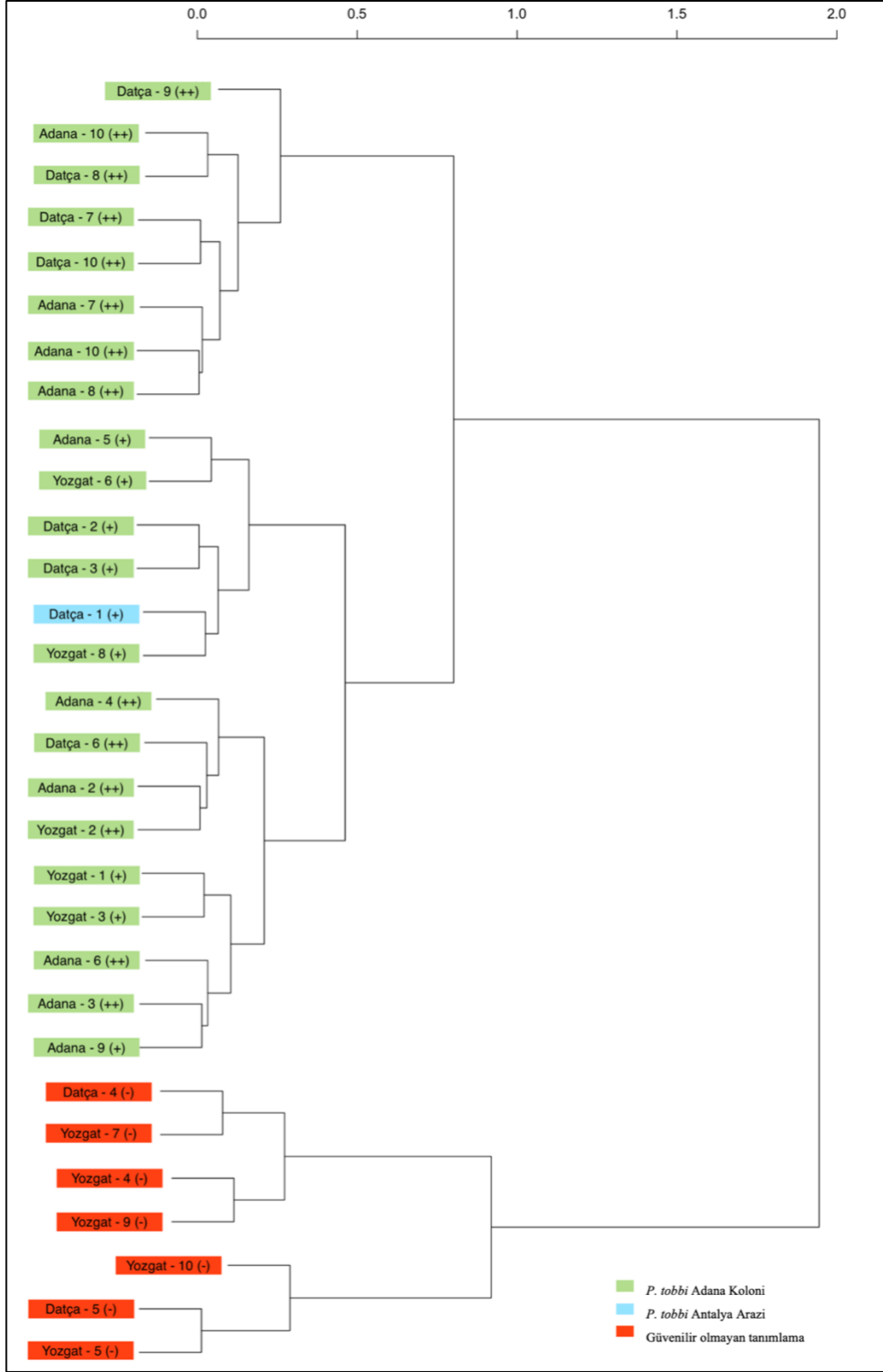
*Eşleşme skorlarının güven aralıkları;

3,000-2,300: En yüksek skorlu eşleşme (+++)

2,299-2,000: Yüksek skorlu eşleşme (++)

1,999-1,700: Düşük skorlu eşleşme (+)

1,699-0,000: Güvenilir olmayan eşleşme (-)



Şekil 21: Üç farklı *P. tobbi* doğal popülasyona ait protein profillerinin en yüksek eşleşme gösteren referans gruplarına göre dendrogram kümelene grafiği. “(++)” yüksek skorla tanımlanan örnekler, “(+)” düşük skorla tanımlanan örnekler ve “(-)” tanımlanamayan örnekleri göstermektedir.

4. TARTIŞMA

4.1. *Phlebotomus tobbi Cacophony* Proteini İçin Elde Edilen Bulguların Yorumlanması

Vücut sıcaklıkları doğrudan buldukları ortam sıcaklığına bağlı olan, böceklerin de dahil olduğu tüm poikiloterm organizmalar için çevre sıcaklığı ömür uzunluğu, morfoloji ve fekondite gibi pek çok biyolojik parametrenin temel belirleyici abiyotik faktörüdür. Her böcek türü, belli aralıklardaki sıcaklık dalgalanmalarına tolerans gösterebilmektedirler (Colinet ve ark. 2015). Böceklerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebildikleri sıcaklık aralıkları ise adapte oldukları coğrafyaya göre belirlenmektedir. Örneğin, tropikal ve sub-tropikal böcek türlerinin tolerans gösterebildikleri en düşük sıcaklık ortalaması 10°C iken, daha soğuk iklimlere adapte olmuş türler için bu değer -5°C'nin altına inebilmektedir (Denlinger ve Lee, Jr. 2010).

Çevre sıcaklığındaki ani yükseliş ya da düşüşler böcekleri kuruma, metabolizma ritimlerinde bozulma ve hatta paralyze olmaya kadar giden ölümcül risklere açık hale getirmektedir (Denlinger ve Lee, Jr. 2010). Kanla beslenen böcek gruplarında ise bu riskler, omurgalı konaklarından vücutlarına aldıkları sıcak kan ile daha da artmaktadır. Kandaki protein ve yağ içeriğinin şekerli bitki nektarlarından daha yüksek olması yumurta gelişimine büyük katkı sağlamaktadır. Ancak bu durumun hematofajik böcek grupları için yüksek maliyeti olmaktadır. Böceklerin vücut sıcaklıkları, konaklarından emdikleri sıcak kan ile 15-20°C arasında ani artış göstermektedir (Benoit 2019). Hem çevresel sıcaklığın hem de kan içeriğinin neden olduğu bu ani sıcaklık stresinin yarattığı hasarı minimuma indirebilmek için, böcekler evrimsel süreçte, davranışsal, morfolojik ya da moleküler düzeyde çeşitli adaptasyonlar geliştirmişlerdir (Perez ve Aron 2020).

Örneğin, özellikle ılıman iklimlerde yaşayan böcek türleri aydınlık saatlerde serin ve gölgelik yerlerde saklanırken, geceleri aktif kan emme davranışı göstererek yüksek çevresel sıcaklıklara karşı önlem almaktadır (Reinhold ve ark. 2018). Öte yandan, *Anopheles* cinsine ait sivrisinek türleri ise kan emme esnasında abdomenlerinden sıvı damlacık bırakarak konak kanının maruz bıraktığı yüksek sıcaklığa karşı fizyolojik bir adaptasyon geliştirmişlerdir (Lahondère ve Lazzari 2012). Yüksek sıcaklığın böcekler üzerinde küçük boyut, koyu renklilik, vücutta kıllanma gibi morfolojik etkileri olmakla birlikte, ani sıcaklık değişimlerinde, *Heat Shock Protein*lerinin (*HSP*'ler) salımı ile termoregülasyonun sağlanması ya da sinapslardaki kalsiyum, sodyum ve potasyum

iyonlarının akışının düzenlenmesi ile sıcaklığa bağlı sinirsel hasarların önlemesi gibi çeşitli enzimatik müdahaleler de gözlenmektedir (González-Tokman ve ark. 2020).

Cacophony geninin bilinen başlıca görevlerinden biri, kanatlı böceklerde yüksek oranda türlere göre özelleşmiş ve türler arasında çiftleşme izolasyonu sağlayan, “kur şarkısı” adı verilen kanat hareketlerinin üretimini sağlamaktır (Oliveira ve ark. 2001). *Cac* geni yüksek oranda türlere göre özelleşmiş bölgeler içerdiğinden hem Yeni dünya hem de Eski dünya kum sineği türlerinin sistematik ayrımı için uygun bir moleküler belirteçtir (Bottecchia ve ark. 2004).

Ancak *Cacophony* geni içerisinde yer alan voltaj duyarlı Ca^{+2} kanalının α -1 alt ünitesini kodlayan bölge böceklerin hayatta kalması için ayrı bir önem az etmektedir. Bu gen bölgesi, motor sinirlerin kas zarı ile birleşim noktalarındaki (neuromuscular junction) presnaptik terminalde Ca^{+2} akışının düzenlenmesinde temel bir rol oynamaktadır (Kawasaki ve ark. 2002). Bu gen bölgesinde görülen sıcaklığa-duyarlı mutasyonların, çiftleşme şarkısında akustik bozulmalara yol açmasının yanı sıra nöromüsküler hasara bağlı hareket yeteneklerinde kayıplar ve ayrıca görme fonksiyonunda kusurlar da görülmektedir (Peixoto ve Hall 1997; Smith ve ark. 1998; Chan ve ark. 2002).

Böceklerin kas hücre membranı ile kas aksiyon potansiyelini kontrol eden motor sinir hücresi arasındaki iyon akışı sıcaklık düştükçe bozulmaktadır. Bu durumun devamlılığı, istemsiz kasılma ya da felç gibi nöromüsküler fonksiyonda bozulmalar, hücresel kayıplar gibi ölümcül hasarlara neden olmaktadır (Overgaard ve MacMillan 2017). Kas hücresinin hareketi sırasında, kalsiyum (Ca^{+2}) iyonu sinapslardan nörotransmitter madde salınımını tetiklemektedir. Soğuk şoku ile, kas hücre sitoplazmasındaki fazla Ca^{+2} iyonlarının hücre dışına atılamaması kas hücresine giden aksiyon potansiyelini bozmaktadır. Bu durum böceklerde oluşan soğuk şokuna bağlı koma durumunun oluşmasının altında yatan nedenlerden biri olarak görülmektedir (MacMillan ve Sinclair 2011; Frolov ve Singh 2013). Model organizma *Drosophila*'da yapılan çalışmalar, bu fonksiyon kayıplarının, *Cac* ekspresyonunun artırılması ile giderilebildiğini göstermiştir (Lembke ve ark. 2017).

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, düşük sıcaklıkta yetişen *P. tobbi* laboratuvar koloni örneklerinde *Cac* transkripsiyonun ifade düzeyi normal şartlarda yetiştirilen bireylere göre daha düşük ölçülmüştür. Koloni örneklerinden elde edilen sonuçlar yukarıda özetlenen bulgularla uyumluluk göstermektedir. Bu sonuçlara göre sıcaklık düşüşünde kas hücrelerindeki hareket anomaliliklerin nedenlerinden biri *Cac* proteininin ifade düzeyindeki düşüş olarak yorumlanabilir.

Laboratuvar deneyleri sırasında 23°C ve kontrol grubu olan 27°C sıcaklık koşulları haricinde 18°C de *P. tobbi*'nin yumurtadan ergine gelişimi takip edilmiştir. Deneylerde sıcaklık azaldıkça gelişim süresinin ve ömür uzunluğunun arttığı saptanmıştır. Öte yandan, 18°C sıcaklık koşulunda yetiştirilen larvalarda durgunluk ve davranışsal bozukluklar gözlenirken, L4 larval evresinden sonra pupalaşma gözlenmemiştir (Yılmaz 2020). Bu durum, *Cacophony* proteininin *P. tobbi*'nin larval gelişim süresince soğuk ortam koşullarında yeterli miktarda salgılanmaması ile ilişkilendirilebilir. *Cac* salınımı holometabol organizmaların gelişim ve başkalaşım evrelerinde motornöron hücrelerinin normal gelişimi için gerekliliği, *Drosophila*'nın embriyo sonrası gelişimi takip edilerek gösterilmiştir. *Cac* proteininin düzgün salgılanmaması durumunda, *Drosophila* larvalarında motornöron dentrit hücrelerinin doğru bir şekilde oluşmadığı, pupalaşma sürecinin aksadığı hatta gerçekleşmediği, gelişim sürecini tamamlamış ergin bireylerde ise uçuş davranışlarında bozukluklar tespit edilmiştir (Ryglewski ve ark. 2014).

Mitochondrial Cytochrome C Oxidase I, *Cacophony* ve *Period* gen bölgeleri ile yapılan DNA sekans karşılaştırmalı analizleri, *P. tobbi*'nin Türkiye içerisinde kesintisiz gen akışına sahip tek bir popülasyon olarak temsil edildiğini göstermektedir (Kasap ve ark. 2019; Karaoğlu 2020). Ancak bu tez çalışmasıyla ortaya konan bulgular, farklı coğrafyalarda yaşayan popülasyonların bazı genlerine ait ifade miktarlarında farklılıklar olabileceğini göstermiştir.

P. tobbi laboratuvar örneklerindeki *PtCac* proteini ifade seviyelerindeki değişim sıcaklık ile pozitif korelasyon göstermiş olsa da doğal popülasyonlardan elde edilen sonuçlar tam tersi bir örüntüyü ortaya çıkarmıştır. Örneklem alanları arasında en soğuk iklime sahip bölge olan Yozgat'tan toplanan *P. tobbi* örneklerinin *PtCac* ekspresyon seviyesi diğer örneklem alanlarına göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bu durum *PtCac* geninin ifadesine etki eden sıcaklık haricinde başka çevresel unsurların varlığını gösteriyor olabilir. Yapılan iklimsel analizler ise çevresel bağıl nemin bu faktörlerden biri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Laboratuvar popülasyonlarında sıcaklığın direkt etkisini ölçebilmek için, yapılan deneylerde sıcaklık hariç tüm koşullar sabit tutulmaktadır. Ancak arazi koşullarında, popülasyonların gen ifadesine etki edebilecek, çevresel sıcaklık haricinde, pek çok farklı iklimsel değişken de bulunmaktadır. Mikro-klimadaki bağıl nem koşullarındaki değişimlerin kum sineği türlerinin popülasyon dinamiklerine ve morfolojik varyasyonları üzerine yüksek oranda etki ettiği bilinmektedir. Farklı coğrafik bölgelerde yapılan

araştırmalarda bağıl nemin yüksek olduğu durumlarda kum sineklerinin populasyon yoğunluğu ve dinamiklerinde düşüş tespit edilirken (Kasap ve ark. 2009; Lahouiti ve ark. 2013; Prudhomme ve ark. 2015), kanat boyutlarında pozitif yönde bir korelasyon gözlenmiştir (Prudhomme ve ark. 2016; Oguz ve ark. 2017). Örneklem alanlarına ait iklimsel analizler, *PtCac* gen ifade düzeyinin, sıcaklığın yanı sıra, bağıl nem ile de negatif korelasyon içinde olduğunu göstermiştir. *Cacaphony*'nin gelişim ve metabolizma ile ilişkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu sonuçların yukarıda özetlenen bulgularla birbirini doğrular nitelikte olduğu görülmektedir. Bu bulgular, *P. tobbi* doğal populasyonlarının *PtCac* gen ifade seviyelerindeki farklılıklar sıcaklık ve bağıl nemin birlikte etkisinden kaynaklanabileceği gibi, bu tez çalışmasında ölçülmemiş başka iklimsel parametrelerin birlikte etkilerinden dolayı da olabilir.

Örneklem alanlarına ait iklimsel veriler karşılaştırıldığında Adana'nın diğer örneklem alanlarına göre daha sabit çevresel koşullara sahip olduğu görülmektedir. Yozgat ve Tokat illerindeki en sıcak ve kurak dönem yaz aylarında gözlenilmektedir. Ancak bu dönemlerde ölçülen gece-gündüz sıcaklık farkı 10°C'nin üzerine çıkmaktadır. Datça ise yıl içinde yüksek oranda yağış almasına rağmen yüksek şiddette rüzgâr alan bir bölge olmasından dolayı, bağıl nem oranlarındaki günlük dalgalanmalar diğer bölgelere göre daha yüksektir.

P. tobbi de dahil pek çok böcek populasyonunun bu tip sert mikro-iklimsel değişimlere karşı hayatta kalma başarılarını artırmak ve populasyonlarının devamını sağlamak için çabuk tepki verebilen adaptasyonlar geliştirmeleri gerekmektedir. Ekstrem sıcaklıklar uzun vadede letal etki yaratsa da dalgalanan sıcaklık koşullarında yetişen böceklerin sabit sıcaklık koşullarında yetişenlere göre uyum değeri ve hayatta kalma başarısı bakımından daha başarılı olduklarını gösterilmiştir (Colinet ve ark. 2015). Örneğin, *Drosophila* larvaları 12°C'nin altındaki ve 32.5°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişim gsteremezken, bu değerler arasında dalgalanan sıcaklıklara maruz kaldıklarında hayatta kalma başarıları artmaktadır (Economos ve Lints 1986). Benzer şekilde, *Rhaphidioptera* türü üzerinde yapılan çalışmalarda, kısa dönemli soğuk çevresel koşulların larval gelişimi ve pupalaşma hızını artırdığı belirtilmiştir (Gruppe ve ark. 2020). Çevresel sıcaklık ve nem değişimlerinin aynı zamanda karınca populasyonlarının hayatta kalma başarısı ve gen ifade seviyeleri üzerine dolaylı etkisi olduğu gözlenmiştir (Stucki ve ark. 2017). Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, Yozgat ve Datça *P. tobbi* populasyonlarındaki *PtCac* ifade düzeyinin Adana'ya göre daha yüksek tespit edilmesinin nedenlerinden biri

de bu populasyonların hızlı değişen iklimsel dalgalanmalara karşı geliştirdikleri metabolik bir adaptasyon olabileceği dűřünülebilir.

Laboratuvar kolonisinden elde edilen örnekler yaklaşık aynı yaşta olan aynı jenerasyona ait bireylerden oluşmaktadır. Ancak bir tuzak içerisinde farklı yař gruplarından bireyler bulunabildiği gibi, kanla ya da bitki öz suyu ile beslenmiş ya da henűz hiç beslenmemiş bireyler de bulunabilmektedir. Bu bireyler gözle ayırt edilemediği için gen ifadesi çalışmalarında kullanılan kum sineği örnekleri farklı yař gruplarından ve farklı geçmişe sahip bireyler olmaktadır.

Sosyal böcek gruplarında yapılan araştırmalar, karınca ve bal arısında ifade olan bazı genlerin ifade dűzeylerinin yařa, çiftleşme durumu, fekondite, bireylerin yemek arama-toplama ya da yumurta bakımı gibi koloni içindeki davranışlarına göre değişim gösterdiğini ortaya koymuştur (George ve ark. 2019; Kohlmeier ve ark. 2019). *Anopheles gambiae* türünde bulunan metabolizma, vücut regülasyonu ve stres ile ilişkili bazı genlerin yaşlanma ve kan emme davranışına bağlı olarak ifade dűzeylerinde değişimler gözlenmiştir (Wang ve ark. 2010). Benzer fonksiyonlara sahip *Cacophony* geninin kanatlı bceklerdeki kur şarkısını kontrol ettiği de göz önünde bulundurulduğunda, doğal *P. tobbi* populasyonların *PtCac* gen ifadesindeki farklılıkların yař, besin arama, kan emme ya da çiftleşme davranışı ile de bağlantılı olması beklenebilir.

4.2. *Phlebotomus tobbi* SP32 Tükürük Bezi Proteini İçin Elde Edilen Bulguların Yorumlanması

Vektör organizmalarda iklimsel değişimler ile oluşan enzimatik modifikasyonlar yalnızca vektör türlerinin hayatta kalma başarılarını değil aynı zamanda taşıdıkları hastalık etmenlerin de hayatta kalma başarısını ve bulaş riskini de yüksek oranda etkilemektedir (Fouque ve Reeder 2019). *Leishmania* parazitleri vektör konaklarının içerisinde girdikleri andan itibaren kum sineklerinin orta bağırsak ve tükürük bezlerinden salgılanan çeşitli proteinler ile etkileşim içerisine girerler. Bu proteinlerden bazıları *Leishmania*'nın sindirilmemek için kaçınması gereken enzimler olsa da büyük çoğunluğu, birlikte evrim süreci ile, parazitlerin gelişim evrelerini tamamlaması ve enfeksiyon oluşturmasında önemli rol oynayan proteinler haline gelmişlerdir (Kamhawi 2006; Abdeladhim ve ark. 2014).

Kum sineği dişilerinin kan emme sırasında eř zamanlı olarak omurgalı konaklarına enjekte ettikleri tükürük bezi salgısındaki proteinler konaktaki immün cevabı

tetikleyebilirken, bazıları ise *Leishmania* parazitlerinin enjekte edildikleri yeni ortamda gelişimlerine devam edebilecekleri uygun substratın hazırlanmasına yardımcı olabilirler (Gomes ve ark. 2008; Oliveira ve ark. 2008; Serafim ve ark. 2021). Yakın zamanda *P. tobbi*'ye ait en çok salgılanan tükürük bezi proteinleri ve olası görevleri tanımlanmıştır. Bu proteinlerin çoğu katalitik reaksiyonlarda görev alırken büyük bir kısmı da kum sineği immün sisteminin kontrolünü sağlayan antijenlerdir (Rohoušová ve ark. 2012). Ancak bu proteinlerin *Leishmania* gelişimine ve omurgalı konakların immün sistemine olan etkileri henüz bilinmemektedir. Bu nedenle, akraba türleri üzerinde yapılan çalışmalardan yola çıkılarak, bu tez çalışması için *P. tobbi* tükürük bezinde en çok salgılanan iki önemli transkript seçilmiştir.

Bunlardan ilki *PtSP32*, odor bağlayıcı protein ailesinden köken alan ve yalnızca kum sineklerinde salgılanan özgün proteinler olan *PpSP15* benzeri protein grubuna dahil edilmektedir (Anderson ve ark. 2006; Rohoušová ve ark. 2012). *Phlebotomus papatasi* tükürük bezinde en çok salgılanan proteinlerden biri olan *PpSP15* (Abdeladhim ve ark. 2012), enjekte edildiği omurgalı konağın immün cevabını artırarak *Leishmania* enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı için (Valenzuela ve ark. 2001) çeşitli anti-*Leishmania* ilaç geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Chen ve ark. 2020; Davarpanah ve ark. 2020; Savar ve ark. 2021). Farklı kum sineği türlerine ait *PpSP15* benzeri proteinlerin farklı konaklardaki immün cevabı artırıcı etkisi çeşitli çalışmalarla da ortaya konmuştur (Oliveira ve ark. 2006, 2015; Martín-Martín ve ark. 2012; Cecilio ve ark. 2020). Bu çalışmalardan yola çıkılarak *P. tobbi*'den salgılanan *PtSP32* proteinin de benzer bir etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Laboratuvar kolonisi *PtSP32* ekspresyonunun sıcaklığa bağlı değişim göstermediğini ortaya koymuştur. Doğal *P. tobbi* populasyonlarına ait sonuçlar da bu bulguyu destekler niteliktedir. Ancak Datça bölgesinden toplanan örneklerin *PtSP32* gen ifade seviyelerinin diğer bölgelere oranla çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. İklimsel verilerle ilişkilendirildiğinde bölgesel farklılığın bağıl nem ile negatif korelasyon içinde olduğu gözlenmiştir. *Phlebotomus papatasi*'nin yayılım gösterdiği farklı coğrafi bölgelerde yapılan çalışmalarda *PpSP15* gen ifadesinin bölgesel ve mevsimsel farklılıkları ortaya konmuştur (Ramalho-Ortigão ve ark. 2015; Hosseini-Vasoukolaei ve ark. 2016; Bordbar ve Parvizi 2021). Bu çalışmalarda bizim sonuçlarımıza benzer şekilde daha kurak iklime sahip bölgelerde ve daha kurak geçen aylarda *PpSP15*'in daha yüksek seviyelerde ifade olduğu gözlenmektedir. Datça'nın genel iklimsel koşullarının, diğer örneklem alanlarına

göre özellikle yaz aylarında rüzgâr şiddetinin etkisiyle daha kurak olması ve arazinin yapıldığı dönemde hiç yağış almaması nedeniyle örneklem arazileri arasında en kurak döneme sahip olduğu gözlenmiştir (www.weatherspark.com). Bu bulgular sonucunda *PtSP32* de dahil *PpSP15* benzeri proteinlerin kuraklık ya da kuruma ile tetiklenebileceği yorumu yapılabilir.

Hosseini-Vasoukolaei ve ark. 2016 aynı zamanda, *PpSP15* gen ifadesinin kan emmiş bireylerde daha yüksek, *L. major* enfekte bireylerde ise daha düşük olduğunu göstermiştir. *Leishmania infantum* endemik bölge olan Adana’da *PtSP32* gen ifadesinin en düşük seviyede gözlenmesi bu bulgularla uyumluluk gösterse de daha güçlü bir çıkarım yapmak için bu proteinin konaklardaki *L. infantum* immün cevaplarına olan etkisinin araştırılması gerekmektedir.

Arazi çalışmasından elde edilen örneklerle ait gen ifade seviyesindeki en yüksek bireysel farklılıklar *PtSP32*’de gözlenmiştir. Bu gendeki ifade seviyesinde gözlenen bireysel farklılıkların bireylerin beslenme ve parazit taşımaları ile bağlantılı olabileceği de düşünülmektedir.

4.3. *Phlebotomus tobbi* SP38 Tükürük Bezi Proteini İçin Elde Edilen Bulguların Yorumlanması

Bu tez çalışması kapsamında analiz edilen ikinci *P. tobbi* tükürük bezi proteini *PtSP38*, orijinleri ilk kez bal arılarında tanımlanan *Arı Sütü Proteinleri (Major Royal Jelly Protein - MRJP)* olan (Albert ve ark. 1999), sarı protein (*Yellow Protein - YP*) ailesi içine dahil edilmektedirler (Rohoušová ve ark. 2012). Bal arılarında *MRJP*’ler genel olarak kütikül pigmentasyonu kontrol ederken, aynı zamanda larvaların kraliçe arı olarak başkalaşımında rol oynadığı için koloni içindeki kast sisteminin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Ramanathan ve ark. 2018). Yine, sosyal böceklerde *MRJP* sentezinin yaşa ve fekonditeye bağlı değişim gösterdiği gözlenirken (Korb ve ark. 2021), *D. melanogaster*’e ait *MRJP* benzeri sarı proteinlerin gen ifadesindeki artışın ise ömür uzunluğu, fekondite ve beslenme oranını artırdığı ortaya konmuştur (Xin ve ark. 2016).

MRJP benzeri sarı proteinler pek çok kum sineği türünün tükürük bezinde yüksek oranda sentezlenmektedir (Valenzuela ve ark. 2001; Volf ve ark. 2002; Anderson ve ark. 2006; Hostomská ve ark. 2009; Rohoušová ve ark. 2012). Bu proteinlerin kum sinekleri üzerindeki fonksiyonları henüz bilinmese de omurgalı konaklarda çeşitli immunojenik özellikler gösterdikleri tespit edilmiştir (Gomes ve ark. 2008). *Lutzomyia longipalpis*

tükürük bezlerinden salgılanan bazı sarı proteinler serotonin, histamin ve katekolamin gibi biyojenik aminleri bağlayarak omurgalı konaklardaki gecikmiş tip aşırı duyarlılık (Delayed Type Hypersensitivity - DTH) olarak adlandırılan *Leishmania sp.* enfeksiyonuna karşı immün cevabın artmasını sağlamaktadır (Teixeira ve ark. 2010; Xu ve ark. 2011). Ancak *P. papatasi* türüne ait *PpSP44* sarı proteini, bu durumun tersi olarak, farelerdeki *L. major* enfeksiyonunu artırıcı etki göstermektedir (Oliveira ve ark. 2008). *Phlebotomus duboscqi*'ye ait son bulgular ise bu türün salgıladığı sarı proteinlerin omurgalı konaktaki nötrofil kemotaksisini tetikleyerek *Leishmania* enfeksiyonunu artırdığını ortaya koymuştur (Guimaraes-Costa ve ark. 2021). Kum sineği türlerine ait sarı proteinlerin yapısal profilleri incelendiğinde, protein dizilerinde ve üç boyutlu yapılarında türler arası farklılıklar tespit edilmiş ve bu farklılıkların sarı proteinlerin *DTH* cevabını artıran biyoaminleri bağlama yeteneklerini değiştirebileceği öne sürülmüştür (Sima ve ark. 2016).

Bu tez çalışmasından elde edilen laboratuvar verilerine göre *P. tobbi*'ye ait *PtSP38* sarı proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin sıcaklıkla pozitif ilişkili olduğunu ortaya koymuş olsa da doğal populasyonlarda bölgeler arası bir fark gözlenmemiştir. Hosseini-Vasoukolaei ve ark. 2016 İran'da yayılım gösteren *P. papatasi* populasyonunda, *PpSP44* sarı proteininin yaz aylarında ve aynı zamanda kan emen bireylerde daha fazla ifade olduğunu belirtmiştir. İran'ın yaz aylarının sıcak ve kurak geçtiği göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmanın dolaylı yoldan *P. tobbi*'ye ait laboratuvar bulguları destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

Yürütülen *PtSP38* geni ifadesi deneyleri sırasında arazi örnekleri için oluşturulan beş grubun ikisinden teknik sebeplerden dolayı sonuç alınamamış olmasından dolayı, her bölgeden 15'er birey istatistiksel analize sokulmuştur. *PtSP38* ifadesindeki bölgeler arası farklılıkların istatistiksel olarak gözlenmemesinin birey sayısının azlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez çalışmasındaki kısıtlamalardan bir diğeri ise, *P. tobbi* tüm genom dizisinin bilinmemesinden dolayı, *PtSP38* geni için ekzon-intron örüntüsünü gösteren, uygun bir kalıp DNA dizisinin ortaya çıkarılamamasıdır. Bu nedenle, cDNA'ya özgü primer tasarlanmasını engellediği için, *PtSP38* için kullanılan primerler hem DNA hem de cDNA'ya bağlanma özelliği göstermektedir. Bu durum, gen ifadesi deney sonuçlarında tespit edilemeyen bir sapmaya neden olmuş olabilir.

Doğal populasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemesine rağmen *PtSP38* gen ifadesi en yüksek bölge Datça olarak tespit edilmiştir. Gen ifade seviyeleri

iklimsel verilerle ilişkilendirildiğinde ise bağıl nem ile negatif bir korelasyon gözlenmiştir. Ancak yukarıda bahsedilen aksaklıklar ve problemler nedeniyle, daha sağlıklı bir çıkarım yapılabilmesi için bu deneylerin daha özgün bir primer setiyle ve daha fazla örnek sayısı ile tekrarlanması önerilmektedir.

4.4. *Phlebotomus tobbi* Doğal Populasyonlarının MALDI-TOF MS Protein Profiline Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kum sineği-parazit etkileşimlerinin ve hastalığın aktarım dinamiklerinin en iyi şekilde anlaşılması için kum sineklerinin doğru tanımlanması gerekmektedir. Gerek örneklerdeki organ kayıpları ya da hasarlanmalarından dolayı, gerekse yakın türlerdeki morfolojik karakterlerdeki benzerliklerden dolayı kum sineklerinde morfolojik tür tanımlamasının yapılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle kum sineği tanımlamasına uygun genetik belirteçler kullanılarak moleküler tabanlı alternatif yöntemler geliştirilmektedir (Latrofa ve ark. 2012; Kasap ve ark. 2019). MALDI-TOF MS protein profil analizi kum sineği taksonomik çalışmalarında yakın zamanda kullanılmaya başlanmış ve pek çok türün tanımlanması başarı ile gerçekleştirilmiştir (Dvorak ve ark. 2014; Mathis ve ark. 2015).

Bu tez çalışmasında MALDI-TOF MS protein profil analiz yöntemi aynı türün farklı coğrafi populasyonlarının ayırımı yapmak için kullanılmıştır. Bulgular Adana doğal populasyonundan çalışılan tüm örneklerin Prag'taki *P. tobbi* koloni ile yüksek skorlarla eşleştiğini göstermiştir. Prag'ta bulunan bu koloni 2005 yılında Adana'da yapılan araziden toplanan örneklerle kurulmuş ve günümüze kadar koloninin devamlılığı sağlanmıştır (Lawyer ve ark. 2017). Bu tez çalışmasında Adana için yapılan arazi çalışmasında da benzer koordinatlara ışık tuzakları bırakılmıştır. Laboratuvar kolonisi ile Adana doğal populasyonunun aynı kökenden geldikleri göz önünde bulundurulduğunda, bu grup için elde edilen sonuçlar beklenir niteliktedir.

Ancak, Datça ve Yozgat doğal populasyonlarının koloni referans grubuyla eşleşme oranlarında düşüş gözlenmiştir. Datça populasyonu konum olarak Antalya populasyonuna yakın olmasına rağmen, çalışılan örneklerin yalnızca bir tanesinde bu populasyonla en yüksek oranda eşleşme gösterirken, ikinci en iyi skorla eşleştikleri referans grup Antalya olmuştur. Bu durum referans veri tabanına eklenen Antalya örneklerinin sayısındaki azlıktan kaynaklanıyor olabileceği gibi Datça populasyonun Adana populasyonuna protein profil örüntüsü olarak daha yakın olmasından da kaynaklanıyor olabilir.

Dendogram kümelenmeleri incelendiğinde ise, Adana ve Datça popülasyonlarına ait bireylerin genel olarak birlikte gruplandıkları gözlenmektedir. Bu bulgular iki popülasyonun protein örüntüleri açısından benzer olduğunu ve MALDI-TOF MS yöntemi ile tam bir popülasyon ayrımı yapılamadığını göstermiştir. Önceki çalışmalarda *Cytochrome C Oxidase I* barkod sekansı ile elde edilen genetik bulgular *P. tobbi* haplotiplerinin Türkiye genelinde kesintisiz bir ağa sahip olduğunu ortaya çıkarmış ve *P. tobbi*'nin Türkiye'de bir popülasyon olarak temsil edildiğini belirtmiştir (Kasap ve ark. 2019). Benzer sonuçlar daha sonra *Cacophony* ve *Period* genleri ile yapılan genetik çalışmalarla ortaya konarak doğrulanmıştır (Karaoğlu 2020). Bu bulgular gözetildiğinde, protein profilleri baz alınarak Adana ve Datça bireylerinin popülasyon ayrımı yapılamamasının nedenlerinden birinin genetik alt yapılarının protein örüntülerinde değişim yaratacak ölçüde farklılaşmamış olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Öte yandan, Yozgat popülasyonu için analiz edilen örneklerden yalnızca biri yüksek skorla Adana referans grubunda tanımlanmıştır. Bu örneğin ikinci en iyi eşleşmesi ise dış grup olarak düşünülen ve Balkan arazi çalışmalarından elde edilen örneklerle oluşturulmuş veri tabanı ile uyumu olmuştur. Tanımlanabilen diğer dört örneğin eşleşme skorları düşük olduğundan, Adana referans grubuyla tam olarak tanımlanabildiği söylenememektedir. Bu durum, Yozgat doğal popülasyonunun, coğrafi koşullardaki farklılıkların etkisi ile, Adana popülasyonundan, Datça'ya göre, daha fazla farklılaşmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Adana ve Datça örneklem alanları da Akdeniz biyo-coğrafyası içinde yer alan, Yozgat örneklem alanına göre daha benzer iklimsel özelliklere sahip bölgelerdir. Ancak Yozgat örneklem alanı, diğer örneklem alanlarına göre daha hızlı dalgalanan ve kum sinekleri için daha az uygun çevresel koşullara sahip Orta Anadolu'nun iklimsel özelliklerini göstermektedir. Protein profilleri bakımından bu üç popülasyon incelendiğinde Adana ve Datça popülasyonlarının benzer örüntüler sergilemesi, Yozgat'ın ise bu iki popülasyondan daha farklı protein profili göstermesi bu coğrafi farklılıkları yansıtır niteliktedir. Yozgat ve çevresinde yayılım gösteren *P. tobbi* popülasyonunun hızlı dalgalanan çevresel koşullara adaptasyon sürecinde diğer iki protein örüntüleri açısından ayrıldığı söylenebilir.

Farklı coğrafi bölgelerden köken alan *P. perniciosus* koloni larvaları MALDI-TOF MS protein profil analizlerinde coğrafik olarak ayırım gözlemlenmezken (Halada ve ark. 2018-B), üç farklı coğrafi bölgeden toplanmış *Phlebotomus mascittii Grassi, 1908* doğal

populasyonlarının coğrafi bölgelerine göre başarılı bir şekilde gruplandıkları tespit edilmiştir (Kniha ve ark. 2020). *Phlebotomus mascittii* coğrafi populasyonlarının birbirlerine uzak mesafelerde ve düşük populasyon büyüklüğü ile temsil edilmesi, populasyonlar arası gen akışını kısıtlamaktadır. Bu türde gözlenen populasyonlar arası proteomik farklılıklar populasyonların genetik altyapılarındaki farklılaşmanın protein motiflerine yansımalarından kaynaklanıyor olabilir (türün güncel yayılım haritası www.ecdc.europa.eu adresinde bulunmaktadır). Öte yandan Türkiye’de geniş bir yayılım alanına sahip olan *P. tobbi*’nin coğrafi populasyonları arasındaki gen akışının devamlılığı (Kasap ve ark. 2019), bu populasyonların MALDI-TOF MS protein profil analiz yöntemi ile ayırımını güçleştirmesi muhtemeldir.

Buna ek olarak, tez çalışmasında kullanılan, Prag’ta bulunan kum sineği arşivi ile oluşturulan referans veri tabanının Türkiye’den yalnızca Akdeniz Bölgesi’ne ait iki alanı ve daha kuzeyde bulunan Balkan örneklerini içermesi, *P. tobbi* coğrafi populasyonlarının bu veri tabanı ile ayırımını güçleştirmiş olabilir. Ayrıca, her ne kadar *P. tobbi* genetik olarak Türkiye’de tek bir populasyon olarak tanımlansa da (Kasap ve ark. 2019), yalnızca Akdeniz coğrafi bölgesini içeren referans veri tabanı Yozgat’ta ait beş ve Datça’ya ait iki örneği tanımlamada da yetersiz kalmıştır. MALDI-TOF MS protein profil analizlerinde çözünürlüğü yüksek referans veri tabanları oluşturulması populasyonların daha sağlıklı sınıflandırılmasını sağlayan bir unsurdur (Normand ve ark. 2017). Bu nedenle daha geniş coğrafyaları kapsayan çözünürlüğü yüksek bir referans veri tabanının *P. tobbi* populasyonu hakkı da daha sağlıklı sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Protein profil analizlerindeki bir diğer önemli unsur örneklerin kalitesi olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar, örneklem yöntemi, örneklerin saklanma durumu ve süresinin protein spektrum kalitesini etkilediğini göstermektedir. Aynı zamanda kum sineği kolonilerinde farklı yetiştirme koşulları ve besin içeriğinin de protein spektrumlarında küçük değişimlere neden olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalarda iyon kütle spektrumunun yüksek kalitede olması için en uygun kum sineği örnekleme yönteminin CDC ışık tuzağı olduğu ve toplanan örneklerin %70’lik alkol içerisinde, -20°C soğutucuda muhafaza edilmesi gerektiği belirtilmektedir (Halada ve ark. 2018-A, B). Ancak bu tez çalışması kapsamında toplanan arazi örnekleri, diğer çalışmalarda da kullanılabilmesi için, kuru şartlarda -80°C’de muhafaza edilmiştir. Bu durum örnek kalitesinde az da olsa bir düşüş yaratmış olabilir.

Kum sinekleri için protein profil analizleri geçtiğimiz on yıl içerisinde başlamış görece yeni çalışmalardır. MALDI-TOF MS protein profil analiz yöntemi ile pek çok Yeni Dünya (Chavy ve ark. 2019) ve Eski Dünya (Dvorak ve ark. 2014) kum sineklerinin tür bazında ayırımı yapılmış, farklı coğrafi bölgelerin kum sineği faunaları başarı ile ortaya konmuş (Cazan ve ark. 2019; Şuleşco ve ark. 2021; Mhaidi ve ark. 2022) ve farklı bölgeler için yeni türler tespit edilmiştir (Dvořák ve ark. 2020; Kniha ve ark. 2020). Ayrıca, kum sineklerinin kan içerik tespiti (Hlavackova ve ark. 2019) ve *Leishmania* parazitlerinin hızlı ve pratik tanımlanması için MALDI-TOF MS yöntemi ile proteomik veri tabanları oluşturulmaktadır (Culha ve ark. 2014; Mouri ve ark. 2014).

Bu protein analiz yöntemi pek çok farklı çalışmada etkin bir biçimde kullanılsa da bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, MALDI-TOF MS protein profil analiz yönteminin türlerin coğrafik alt populasyonlarını ayırmada henüz başarılı olamadığını göstermiştir. İleriki çalışmalarda örneklem alanlarının artırılması ve daha geniş kapsamlı referans veri tabanı oluşturulmasıyla türlerin coğrafi populasyonlarının ayırımı konusunda daha net yorumlar yapılabileceği düşünülmektedir.

4.5. Genel Yorum ve Öneriler

Bu tez çalışması ile farklı sıcaklık koşulları altında üç önemli *P. tobbi* geninin farklı sıcaklıklarda yetişen dişi bireylerdeki ifade farklılıkları incelenmiş, bu genlerin Türkiye'deki farklı coğrafi konumlarda bulunan doğal populasyonlara ait ifade seviyeleri karşılaştırılmış ve MALDI-TOF MS yöntemi ile bu populasyonların protein profilleri ortaya çıkartılmıştır.

Bu çalışma süresince çeşitli aksaklıklar ve kısıtlamalarla karşılaşmıştır. Bu kısıtlamalardan en önemlisi çalışılan hedef genlere ait genomik dizilerin bulunamamasıdır. Özellikle tükürük bezi proteinleri yüksek oranda türe özgü transkriptlerdir ve hatta bazı proteinler yalnızca belli kum sineği türlerinde üretilmektedir (Rohoušová ve ark. 2012). Gen ifadesi çalışmaları için tasarlanan primer çiftlerinin cDNA'ya spesifik bağlanması, analiz sırasında genomik DNA kontaminasyonunu engellediği için gen ifadesi analiz sonuçlarının doğruluk oranını artırmaktadır (Piazza ve ark. 2017). Ancak *P. tobbi*'ye ait tüm genomik sekansının henüz bilinmiyor olması, RT-PZR analizleri için uygun, cDNA'ya spesifik bağlanan primer tasarımını güç hale getirmiştir. *Cacophony* geninde yüksek oranda korunmuş bölgelerin bulunması, daha önceki çalışmalarda kullanılan *P. tobbi* *Cac* gen bölgesinin ekzon/intron örüntüsünü

ortaya çıkarabilmek için akraba türlerin genomik dizilerinden yararlanmayı imkanı kılmiştir. Ancak *PtSP32* ve *PtSP38* için yapılan araştırmalarda akraba türlerle eşleşen genomik bir dizi bulunamamıştır. *PtSP32* için hem genomik DNA hem de mRNA'dan üretilen cDNA ile yapılan sekans analizleri sonucunda iki dizi arasında kısa bir olası intron bölgesi bulunmuş olsa da *PtSP38* için böyle bir sonuç elde edilememiştir.

Benzer problem housekeeping referans geni olarak kullanılan *18S-rRNA* geninde de görülmektedir. Bu gen için elde edilen referans primerler hiçbir intron bölgesini kesmemektedir (Ponton ve ark. 2011). Öte yandan, *18S-rRNA* gen ifadesi deneylerinde sıklıkla kullanılsa da bu genin ekspresyon stabilitesi böcek türlerine, gelişim evrelerine, beslenme durumlarına ve hastalık yüklerine göre değişim gösterebilmektedir (Ponton ve ark. 2011; Paim ve ark. 2012; Yang ve ark. 2015; Zheng ve ark. 2020). Bu nedenle, housekeeping genlerin ilgili türdeki ekspresyon varyasyonları bilinmiyorsa, RT-PZR analizlerinde en az iki tip referans gen kullanılması tavsiye edilmektedir (Thellin ve ark. 1999). Tez çalışmasında *18S-rRNA* haricinde böcek gen ifadesi deneylerinde sıklıkla kullanılan *Elongation Factor 1- α* , *α -Tubulin* ve *β -Actin* genleri de referans olarak kullanılmak üzere incelenmiş, ancak *P. tobbi*'deki genomik dizileri ortaya çıkarılamadığı için uygun primerler tasarlanamamıştır. Bu nedenle, genomik DNA kontaminasyonunu önlemek amacıyla tüm örnekler *DNase I* enzimi ile muamele edilerek örneklerdeki genomik DNA miktarı minimuma indirilmiştir. Ancak yine de gen ifadesi çalışmalarının daha sağlıklı yapılabilmesi için *P. tobbi*'ye ait tüm genom dizi analizinin yapılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında yürütülen tüm deneyler birey bazında analiz edilmiştir. Ancak kum sineklerinin küçük boyutlu olmasından kaynaklı mevcut RNA miktarları çok azdır. Ayrıca arazi örneklerinde tür teşhisi yapılabilmesi için uygulanan diseksiyon işlemi de bir miktar RNA kaybına neden olmaktadır. Bireylerin RNA miktarlarının az olmasından dolayı gen ifadesi deneylerinde örneklerin tekrar sayısı artırılmamıştır.

Bunlara ek olarak, arazi çalışmaları ile elde edilen bireylerdeki yaş, beslenme durumu, çiftleşme potansiyeli ya da parazit yükü gibi faktörlerden kaynaklanan farklılıklar bu tez çalışmasında yürütülen deneylerde tespit edilemeyen bir sapmaya neden olması göz ardı edilmemelidir. İleride yapılacak olan bilimsel çalışmalarda bu tip faktörlerin *P. tobbi* transkriptleri üzerindeki etkilerinin detaylı bir şekilde ortaya konması transkriptomik ve proteomik bulguların daha sağlıklı yorumlanmasına yardımcı olacaktır.

Gen ifadesi deneylerinde yaşanan sıkıntılara rağmen, elde edilen bulgular *P. tobbi* türü için ilk defa ortaya konmuştur. Bu bulgular *P. tobbi*'nin değişen çevresel koşullarda hayatta kalmasını sağlayan proteomik modifikasyonları anlayabilmeye yardımcı olmaktadır. Gelecek çalışmalarla *P. tobbi* tüm genom dizilemesinin yapılması ve bu vektöre ait proteinlerin *L. infantum* gelişimi ve hastalık oluşumundaki rollerinin ortaya konması, hem bu çalışma ile tespit edilen protein miktar değişimlerinin vektör-parazit-konak ilişkileri ile daha yüksek çözünürlükte yorumlanabilmesini sağlayacak hem de konvansiyonel yöntemlerle daha geniş çaplı transkriptomik çalışmaların yapılmasına ön ayak olacaktır.

Tez çalışması kapsamında ayrıca *P. tobbi*'nin farklı coğrafi popülasyonlarının ayrımı MALDI-TOF MS protein profil analizi ile ilk defa ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen ilkin bulgular Türkiye'nin farklı coğrafyalarında bulunan doğal popülasyonların bu yöntemle net ayrımının yapılamadığı yönünde olsa da elde edilen bulgular kum sineklerine ait proteomik veri tabanına katkıda bulunmaktadır.

Doğal popülasyonlara ait protein örüntüleri arasında bazı farklılıklar gözlemlense de daha kesin yorumlar yapabilmek için, çözünürlüğü daha yüksek bir referans veri tabanı oluşturulması ve *P. tobbi*'nin yayılım alanlarını kapsayan daha geniş çaplı arazi çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

MALDI-TOF MS protein profil analizlerinin kullanım alanı şimdilik taksonomik çalışmalarla sınırlı kalsa da kolay uygulanabilir olması ve hızlı çıktı verebilmesi sayesinde yöntemin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (Murugaiyan ve Roesler 2017). Gelecek çalışmalarla protein veri tabanlarının geliştirilmesi, vektör kum sineği türlerinin alt popülasyonlarının tanımlanma olasılığını artırabilir.

6. KAYNAKLAR

Abdeladhim, M., Jochim R. C., Ahmed M. B., Zhioua, E., Chelbi, I., Cherni, S., Louzir, H., Ribeiro, J. M. C., Valenzuela J. G., Updating the salivary gland transcriptome of *Phlebotomus papatasi* (Tunisian Strain): The search for sand fly-secreted immunogenic proteins for humans, *PLoS ONE* 7, 11, e47347, **2012**.

Abdeladhim, M., Kamhawi, S., Valenzuela., J. G., What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 691–703, **2014**.

Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzova, J., Simuth, J., The family of major royal jelly proteins and its evolution., *Journal of Molecular Evolution*, 49, 2, 290–97, **1999**.

Alkan, C., Vaziri, V. M., Ayhan, N., Badakhshan, M., Bichaud, L., Rahbarian, N., Javadian, E., Alten B., Lamballerie, X., Charrel, R. N., Isolation, Genetic Characterization, and seroprevalence of *Adana Virus*, a novel *Phlebovirus* belonging to the *Salehabad Virus* complex, in Turkey., *Journal of Virology*, 89, 8, 4080–91, **2015**.

Alkan, C., Kasap, O. E., Alten B., Lamballerie, X., Charrel, R. N., Sandfly-Borne *Phlebovirus* isolations from Turkey: New insight into the *Sandfly Fever Sicilian* and *Sandfly Fever Naples* species., *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, 3, e0004519, **2016**.

Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A. L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S. K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L., Seasonal dynamics of Phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*., *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, 2, **2016**.

Anderson, J. M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B. J., Reynoso, D., Seitz, A. E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham M., Valenzuela, J. G., Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*, 7, 1, 52, **2006**.

- Arboleda-Bustos, C. E., Segarra, C., The *Dca* Gene Involved in Cold Adaptation in *Drosophila melanogaster* Arose by Duplication of the Ancestral *regucalcin* Gene., *Molecular Biology and Evolution*, 28, 8, 2185-2195, **2011**.
- Artemiev, M. M., A Revision of sandflies of subgenus *Adlerius* (Diptera, *Phlebotominae*, *Phlebotomus*). *Zoologicheskii Zhurnal* 59: 1177–92, **1980**.
- Belen, A., Alten, B., Seasonal dynamics and altitudinal distributions of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Cukurova region of Turkey., *Journal of Vector Ecology*, 36, 8, **2011**.
- Benoit, J. B., Lopez-Martinez, G., Phillips, Z. P., Patrick, K. R., Denlinger, D. L., Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance., *Journal of Insect Physiology*, 56, 151–156, **2010**.
- Benoit, J. B., Lazzari, C. R., Denlinger D. L., Lahondere, C., Thermoprotective adaptations are critical for Arthropods feeding on warm-blooded hosts.” *Current Opinion in Insect Science*, 34, 7-11, **2019**.
- Bordbar, A., Parvizi, P., Species diversity and spatial distribution of CL/VL vectors: Assessing bioclimatic effect on expression plasticity of genes possessing vaccine properties isolated from wild-collected sand flies in endemic areas of Iran., *BMC Infectious Diseases*, 21, 1, 455, **2021**.
- Bottechia, M., Oliveira, S. G., Bauzer, L. G. S. R., Souza, N. A., Ward, R. D., Garner, K. J., Kyriacou, C. P., Peixoto, A. A., Genetic divergence in the *Cacophony IVS6* intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*., *Journal of Molecular Evolution*, 58, 6, 754–61., **2004**.
- Brown, T.A., Gene Cloning And DNA Analysis: an introduction, 6th ed., Wiley-Blackwell, UK, Chapter 12, **2010**.
- Cazan, C., D., Păstrav, I. R., Ionică, A. M., Oguz, G., Kasap, O. E., Dvorak, V., Halada, P., Dumitrache, M. O., Volf, P., Alten B., Mihalca, A. D., Updates on the distribution and diversity of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Romania., *Parasites & Vectors*, 12, 1, 247, **2019**.
- Cecílio, P., Oristian, J., Meneses, C., Serafim, T. D., Valenzuela, J. G., Silva, A. C., Oliveira F., Engineering a vector-based pan-leishmania vaccine for humans: proof of principle. *Scientific Reports*, 10, 1, 18653, **2020**.

- Chalghaf, B., Chemkhi, J., Mayala, B., Harrabi, M., Benie, G. B., Michael, E., Ben Salah, B., Ecological niche modeling predicting the potential distribution of leishmania vectors in the Mediterranean basin: impact of climate change, *Parasites & Vectors*, 11, 461, **2018**.
- Chan, B., Vilella, A., Funes, P., Hall J. C., Courtship and other behaviors affected by a heat-sensitive, molecularly novel mutation in the *Cacophony* calcium-channel gene of *Drosophila*., *Genetics*, 162, 135–53, **2002**.
- Chang, J. C., Hazelett, D. J., Stewart, J. A., Morton. D. B., Motor neuron expression of the voltage-gated calcium channel *Cacophony* restores locomotion defects in a *Drosophila*, TDP-43 loss of function model of ALS., *Brain Research*, 1584,39–51, **2014**.
- Chavy, A., Nabet, C., Normand, A. C., Kocher, A., Ginouves, M., Prevot, G., Santos, T. V., Demar, M., Piarroux, R., Thoisy, B., Identification of French Guiana Sand Flies Using MALDI-TOF Mass Spectrometry with a new mass spectra library., *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13, 2, e0007031, **2019**.
- Chen, W. H., Nyon, M. P., Poongavanam, M. V., Liu, Z., Biter, A. B., Kundu, R. T., Strych, U., Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Process characterization and biophysical analysis for a yeast-expressed *Phlebotomus papatasi* salivary protein (*PpSP15*) as a *Leishmania* vaccine candidate.” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109, 5, 1673–80, **2020**.
- Cohen, J. M., Sauer, E. L., Santiago, O., Spencer, S., Rohr, J. R., Divergent impacts of warming weather on wildlife disease risk across climates., *Science*, 370, 6519, eabb1702, **2020**.
- Colinet, H., Sinclair, B. J., Vernon, P., Renault, D., Insects in fluctuating thermal environments., *Annual Review of Entomology*, 60, 123–40, **2015**.
- Coutinho-Abreu, I. V., Mukbel, R., Hanafi H. A., Fawaz, E. Y., El-Hossary, S. S., Wadsworth, M., Stayback, G., Pitts, D. A., Abo-Shehada, M., Hoel, D. F., Kamhawi, S., Ramalho-Ortigão, M., McDowell, M. A., Expression plasticity of *Phlebotomus papatasi* salivary gland genes in distinct ecotopes through the sand fly season., *BMC Ecology* 11, 1, 24, **2011**.
- Culha G., Akyar, I., Zeyrek, F. Y., Kurt, O., Gunduz, C., Toz, S. O., Ostan, I., Cavus, I., Gulkan, B., Kocagöz, T., Ozbel, Y., Ozbilgin, A., Leishmaniasis in Turkey: Determination of *Leishmania* species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)., 9, 2, 239-248, **2014**.

Davarpanah, E., Seyed, N., Bahrami, F., Rafati, S., Safaralizadeh, R., Taheri, T., *Lactococcus lactis* expressing sand fly *PpSPI5* salivary protein confers long-term protection against *Leishmania major* in BALB/c mice., *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14, 1, e0007939, **2020**.

Dehghani, R., Kassiri, H., Khodkar, I., Karami, S., A comprehensive overview on sandfly fever., *Journal of Acute Disease*, 10, 3, 98, **2021**.

Denlinger, D. L., Lee Jr, R. E., *Low Temperature Biology of Insects.*, Cambridge University Press, Newyork, **2010**.

Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P. E., Peyrefitte, C., Arthropod- borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Eurosurveillance*, 15, **2010**.

Depaquit, J., Randrianambinintsoa, F. J., Jaouadi, K., Payard, J., Bounamous, A., Augot, D., Krueger, A., Brengues, C., Couloux A., Robert, V., Léger, N., Molecular and morphological systematics of the sandfly *Sergentomyia (Sintonius) clydei* Sinton, 1928 and questions about its record in the Seychelles., *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 41–53, **2014**.

Dieme, C., Yssouf, A., Vega-Rúa, A., Berenger, J., Failloux, A., Raoult, D., Parola, P., Almeras, L., Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling., 7, 14, **2014**.

Dostálová, A., Votýpka, J., Favreau, A. J., Barbian, K. B., Volf, P., Valenzuela, J. G., Jochim, R. C., The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies., *BMC Genomics*, 12, 223, **2011**.

Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., Identification of *Phlebotomine* sand flies (Diptera: Psychodidae) by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry., *Parasites & Vectors* 7, 1, 21, **2014**.

Dvorak, V., Hlavackova, K., Kocisova, A., Volf, P., First record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* in Slovakia, *Parasite*, 23, 48, **2016**.

Dvorak, V., Kasap, O. E., Ivovic, V., Mikov, O., Stefanovska, J., Martinkovic, F., Omeragic, J., Pajovic, I., Baymak, D., Oguz, G., Hlavackova, K., Gresova, M., Gunay,

F., Vaselek, S., Ayhan, N., Lestinova, T., Cvetkovikj, A., Soldo, D. K., Katerinova, I., Tchakarova, S., Yilmaz, A., Karaoglu, B., Iranzo, J. R., Kadriaj, P., Velo, E., Ozbel, Y., Petric, D., Volf, P., Alten, B., Sand flies (Diptera: Psychodidae) in eight Balkan countries: Historical review and region-wide entomological survey., *Parasites & Vectors*, 13, 1, 573, **2020**.

Dvorak, V., Tsirigotakis, N., Pavlou, C., Dokianakis, E., Akhoundi, M., Halada, P., Volf, P., Depaquit, J., Antoniou M., Sand fly fauna of Crete and the description of *Phlebotomus (Adlerius) creticus* n. sp. (Diptera: Psychodidae)., *Parasites & Vectors*, 13, 1, 547, **2020**.

Economos, A.C., Lints., F.A., Developmental Temperature and life span in *Drosophila melanogaster*. *Gerontology*, 32, 1, 18–27, **1986**.

Ergunay, K., Kasap, O. E., Orsten, S., Oter, K., Gunay, F., Yoldar A. Z. A., Dincer E., Alten B., Ozkul A., *Phlebovirus* and *Leishmania* detection in sandflies from Eastern Thrace and Northern Cyprus., 7, 575, **2014**.

Florence, F., Reeder, J. C., Impact of past and on-going changes on climate and weather on vector-borne diseases transmission: A Look at the evidence., *Infectious Diseases of Poverty*, 8, 51, **2019**.

Frolov, R. V., Singh, S., Temperature and functional plasticity of L-Type Ca²⁺ channels in *Drosophila*. *Cell Calcium* 54, 4, 287–94, **2013**.

Gehman, A. M., Hall, R. J., Byers, E. J., Host and parasite thermal ecology jointly determine the effect of climate warming on epidemic dynamics., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 4, 744–49, **2018**.

George, E. A., Broger, A., Thamm, M., Brockmann, A., Scheiner, R., Inter-individual variation in honey bee dance intensity correlates with expression of the *foraging* gene., *Genes, Brain and Behavior* 19(1), **2019**.

Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., Silva, C., Oliveira, C. I., Miranda, J. C., Elnaiem, D., Kamhawi, S., Valenzuela J. G., Brodskyn C., I., Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22): 7845–50, **2008**.

González-Tokman, D., Córdoba-Aguilar, A., Dáttilo, W., Lira-Noriega, A., Sánchez-Guillén, R. A., Villalobos, F., Insect responses to heat: Physiological mechanisms,

evolution and ecological implications in a warming world., *Biological Reviews*, 95, 3, 802–21, **2020**.

Gruppe, A., Abbt, V., Aspöck, H., Aspöck, U., Chilling temperatures trigger pupation in Raphidioptera: *Raphidia mediterranea* as a model for insect development. 43, 1, 119-126, 0341-8391, **2020**.

Gubler, D. J., Reiter, P., Ebi, K. L., Yap, W., Nasci, R., Patz, J. A., Climate variability and change in the United States: Potential impacts on vector- and rodent-borne diseases., *Environmental Health Perspectives*, 2, 223–233, **2001**.

Guimaraes-Costa, A. B., Shannon, J. P., Waclawiak, I., Oliveira, J., Meneses, C., Castro, W., Wen, X., Brzostowski, J., Serafim, T. D., Andersen, J. F., Hickman, H. D., Kamhawi, S., Valenzuela J. G., Oliveira, F., A Sand Fly Salivary protein acts as a neutrophil chemoattractant., *Nature Communications*, 12, 3213, **2021**.

Gürel, M. S., Yeşilova, Y., Ölgen, M. K., Özbel, Y., Cutaneous Leishmaniasis in Turkey., *Turkish Journal of Parasitology*, 36, 2, 121-129, **2012**.

Halada, P., Hlavackova, K., Risueño, J., Berriatua E., Volf, P., Dvorak, V., Effect of trapping method on species identification of *Phlebotomine* sandflies by MALDI-TOF MS protein profiling: Trap effect on sandfly protein profiling., *Medical and Veterinary Entomology*, 32, 3, 388–392, **2018-A**.

Halada, P., Hlavackova, K., Dvorak, V., Volf, P., Identification of immature stages of *Phlebotomine* sand flies using MALDI-TOF MS and mapping of mass spectra during sand fly life cycle., *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 93: 47–56, **2018-B**.

Hlavackova, K., Dvorak, V., Chaskopoulou A., Volf, P., Halada, P., A Novel MALDI-TOF MS-Based method for blood meal identification in insect vectors: A proof of concept study on *Phlebotomine* sand flies., *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13, 9, e0007669, **2019**.

Hoffmann, A. A., Anderson, A., Hallas, R., Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*., *Ecology Letters* 5, 5, 614–618, **2002**.

Hoffmann, A. A., Harshman, L. G., Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels., *Heredity*, 83, 7, 637–643, **1999**.

- Hosseini-Vasoukolaei, N., Idali, F., Khamesipour, A., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., Edalatkhah, H., Arandian, M. H., Mirhendi, H., Emami, S., Jafari, R., Saeidi, Z., Jeddi-Tehrani, M., Akhavan, A. A., Differential expression profiles of the salivary proteins *SP15* and *SP44* from *Phlebotomus papatasi*. *Parasites & Vectors* 9, 357, **2016**.
- Hostomská, J., Volfová, V., Mu, J., Garfield, M., Rohoušová, I., Volf P., Valenzuela, J. G., Jochim R. C., Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*., *BMC Genomics* 10, 282, **2009**.
- Irwin, M. E., Negative Binomial Model for Count Data Log-Linear Models for Contingency Tables - Introduction., *In Statistics 149*, Harward, ABD, **2006**.
- Jochim, R. C., Teixeira, C. R., Laughinghouse, A., Mu, J., Oliveira, F., Gomes, R. B., Elnaiem, D. E., Valenzuela, J. G., The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum chagasi*-infected sand flies., *BMC Genomics*, 9, 15, 1471-2164, **2008**.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L., Valenzuela J. G., A Role for Insect Galectins in Parasite Survival., *Cell Press*, 119, 329–341, **2004**.
- Kamhawi, S., *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: Friends or foes?, *Trends in Parasitology*, 22, 9, 439–45, **2006**.
- Karaoglu, B., Türkiye’de bulunan kum sineği türlerinde (Diptera: Psychodidae) *Cacophony* ve *Period* gen bölgelerinin varyasyonu., Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2020**.
- Kasap, O. E., Belen, A., Kaynas, S., Simsek, F. M., Biler, L., Ata, N., Alten, B., Activity patterns of sand fly (Diptera: Psychodidae) species and comparative performance of different traps in an endemic cutaneous leishmaniasis focus in Cukurova Plain, Southern Anatolia, Turkey., *Acta Veterinaria Brno*, 78, 2, 327–35, **2009**.
- Kasap O. E., Linton, Y., Karakus, M., Ozbel, Y., Alten, B., Revision of the species composition and distribution of Turkish sand flies using DNA barcodes., *Parasites & Vectors* 12, 410, **2019**.

- Kawasaki, F., Collins, S. C., Ordway, R. W., Synaptic Calcium-Channel function in *Drosophila*: Analysis and transformation rescue of temperature-sensitive paralytic and lethal mutations of *Cacophony*., *The Journal of Neuroscience*, 22, 14, 5856–64, **2002**.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J. A., Ratify, M., Guy, M. W., Wilkes, T. J., Guy, F. M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R. D., Guilvard, E., Perieres, J., Durois, H., Ecology of leishmaniasis in the south of France: 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 59, 555–572, **1984**.
- Killick-Kendrick, R., Tang, Y., Killick-Kendrick, M., Sang, D. K., Sirdar, M. K., Ke, L., Ashford, R. W., Schorscher, J., Johnson, R. H., The identification of female sandflies of the Subgenus *Larroussius* by the morphology of the spermathecal ducts., *Parassitologia* 33, 1, 335–47, **1991**.
- King A. M., MacRae, T. H., Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause., *Annual Review of Entomology*, 60, 59–75, **2015**.
- Kniha, E., Dvorak, V., Halada, P., Milchram, M., Obwaller, A. G., Kuhls, K., Schlegel, S., Köhler, M., Poepl, W., Bakran-Lebl, K., Fuehrer, H., Volfová, V., Mooseder, G., Ivovic, V., Volf, P., Walochnik, J., Integrative approach to *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908: First record in Vienna with new morphological and molecular insights., *Pathogens* 9(12): 1032, **2020**.
- Kniha, E., Dvorak, V., Milchram, M., Obwaller, A. G., Köhler, M., Poepl, W., Antoniou, M., Chaskopoulou, A., Paronyan, L., Stefanovski, J., Mooseder, G., Volf, P., Walochnik, J., *Phlebotomus (Adlerius) simici* Nitzulescu, 1931: First record in Austria and phylogenetic relationship with other *Adlerius* species., *Parasites & Vectors*, 14, 20, **2021**.
- Kohlmeier, P., Alleman, A. R., Libbrecht, R., Foitzik, S., Feldmeyer, B., Gene expression is more strongly associated with behavioural specialization than with age or fertility in ant workers., *Molecular Ecology*, 28, 3, 658–70, **2019**.
- Koltas, I. S., Eroglu, F., Alabaz, D., Uzun, S., The emergence of *Leishmania major* and *Leishmania donovani* in southern Turkey., *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108, 3, 154-158, **2014**.

- Korb, J., Meusemann, K., Aumer, D., Bernadou, A., Elsner, D., Feldmeyer, B., Foitzik, S., Heinze, J., Libbrecht, R., Lin, S., Majoe, M., Kuhn, J. M. M., Nehring, V., Negroni, M. A., Paxton, R. P., Séguret, A. C., Stoldt, M., Flatt, T., So-Long consortium, Comparative transcriptomic analysis of the mechanisms underpinning ageing and fecundity in social insects., *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376, 1823, 20190728, **2021**.
- Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C., Izri, A., Raoult, D., Parolaet P., Identification of Algerian field-caught *Phlebotomine* sand fly vectors by MALDI-TOF MS, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10,1, e0004351, **2016**.
- Lahondère, C., Lazzari, C. R., Mosquitoes cool down during blood feeding to avoid overheating. *Current Biology*, 22, 40–45, **2012**.
- Lahouiti, K., Lalami, A. E. O., Maniar, S., Bekhti, K., Seasonal fluctuations of *Phlebotomines* sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the Moulay Yacoub Province, Centre Morocco: Effect of ecological factors., *African Journal of Environmental Science and Technology*, 7, 11, 1028–36, **2013**.
- Lane, R. P., Crosskey, R.W., *Medical Insects and Arachnids*, Springer, Netherlands, Dordrecht, 78–119, **1993**.
- Laroche, M., Almeras, L., Pecchi, E., Bechah, Y., Raoult, D., Viola A., Parola P., MALDI-TOF MS as an innovative tool for detection of *Plasmodium* parasites in *Anopheles* mosquitoes. *Malaria Journal*, 16, 1, 5, **2017**.
- Latrofa, M. S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D., Towards a rapid molecular identification of the common *Phlebotomine* sand flies in the Mediterranean Region., *Veterinary Parasitology* 184, 267–70, **2012**.
- Lawyer, P., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D., Laboratory colonization and mass rearing of *Phlebotomine* sand flies (Diptera, Psychodidae)., *Parasite* 24, 42, **2017**.
- Lee, Y., Seifert, S. N., Nieman, C. C., Mcabee, R. D., Goodell, P., Fryxell, R. T., Lanzaro, G. C., Cornel, A. J., High Degree of Single Nucleotide Polymorphisms in California *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) sensu lato., *Journal of Medical Entomology*, 49, 2, 299–306, **2012**.

Léger, N., Depaquit, J., Ferté, H., Rioux, J. A., Gantier, J. C., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Michaelides, A., Christophi, N., Economides, P., Les Phlébotomes (Diptera-Psychodidae) de l'île de Chypre.II - Presence de *Leishmania* (*Leishmania*) *Infantum* Nicolle, 1908 (Zymodeme MON 1) Chez *Phlebotomus* (*Larroussius*) *tobbi* Adler et Theodor, 1930., *Parasite*, 7, 2, 143–46, **2000**.

Lembke, K. M., Scudder, C., Morton, D. B., Restoration of motor defects caused by loss of *Drosophila* TDP-43 by expression of the voltage-gated calcium channel, *Cacophony* , in central neurons., *The Journal of Neuroscience*, 37,39, 9486–97, **2017**

Lewis, D. J., A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae)., *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 45, 121–29, **1982**.

Lins, R. M. M. A., Oliveira, S. G., Souza, N. A., Queiroz, R. G., Justiniano, S. C. B., Ward, R. D., Kyriacou C. P., Peixoto A. A., Molecular evolution of the *Cacophony IVS6* Region in sandflies., *Insect Molecular Biology*, 11, 2, 117–22, **2002**.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method., *METHODS*, 25, 402–8, **2001**.

MacMillan, H. A., Sinclair, B. J., Mechanisms underlying insect chill-coma., *Journal of Insect Physiology*, 57, 1, 12–20, **2011**.

Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A. F., Newman, S., Ramanan, P., Suarez, J. A., A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions., *Current Tropical Medicine Reports*, 8, 121–132, **2021**.

Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., *Phlebotomine* sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern., *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 2, 123–47, **2013**.

Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M., An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach.” *Acta Tropica* 123(1): 22–30, **2012**.

Matamoro-Vidal, A., Salazar-Ciudad, I., Houle, D., Making Quantitative Morphological Variation from Basic Developmental Processes: Where Are We? The Case of the *Drosophila* Wing., *Developmental Dynamics*, 244, 1058–1073, **2015**.

Mathis, A., Depaquit, J., Dvorak, V., Tuten, H., Bañuls, A., Halada, P., Zapata, S., Lehrter, V., Hlavačková, K., Prudhomme, J., Volf, P., Sereno, D., Kaufmann, C., Pflüger, V., Schaffner, F., Identification of *Phlebotomine* sand flies using one MALDI-TOF MS

reference database and two mass spectrometer systems., *Parasites & Vectors*, 8, 266, **2015**.

Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivovic, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M., Leishmaniasis and the Cyprus paradox., *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 3, 441–48, **2010**.

Mhaidi, I., Kbaich, M., A., Kacem, S. E., Daoui, O., Akarid, K., Spitzova, T., Halada, P., Dvorak, V., Lemran, M., Entomological study in an anthroponotic cutaneous leishmaniasis focus in Morocco: Fauna survey, *Leishmania* infection screening, molecular characterization and MALDI-TOF MS Protein Profiling of relevant *Phlebotomus* species., *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, 3, 1073–83, **2022**.

Morrow, G. V., Samson, M. L., Michaud, S. B., Tanguay R. M., Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress., *The FASEB Journal*, 18, 3, 598-599, **2004**.

Mouri, O., Morizot, G., Auwera, G., V., Ravel, C., Passet, M., Chartrel, N., Joly, I., Thellier, M., Jaureguiberry, S., Caumes, E., Mazier, D., Marinach-Patrice, C., Buffet, P., Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry., *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, 6, e2841, **2014**.

Munstermann E. L., Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In Marquardt, William C., and B. C. Kondratieff, eds. Biology of Disease Vectors. 2nd ed., *Elsevier Academic Press*, Burlington, MA, **2005**.

Murugaiyan, J., Roesler, U., MALDI-TOF MS Profiling-Advances in species identification of pests, parasites, and vectors., *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 184, **2017**.

Nieves, E., Oraá, L., Rondón, Y., Sánchez, M., Sánchez, Y., Rojas, M., Rondón, M., Rujano, M., González, N., Cazorla, D., Effect of environmental disturbance on the population of sandflies and *Leishmania* Transmission in an endemic area of Venezuela., *Journal of Tropical Medicine*, 7, 280629, **2014**.

Normand, A., Cassagne, C., Gautier, M., Becker, P., Ranque, S., Hendrickx, M., Piarroux, R., Decision criteria for MALDI-TOF MS-Based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases., *BMC Microbiology*, 17, 25, **2017**.

- Oerther, S., Jöst, H., Heitmann, A., Lühken, R., Krüger, A., Steinhausen, I., Brinker, C., Lorentz, S., Marx, M., Schmidt-Chanasit, J., Naucke, T., Becker, N., *Phlebotomine sand flies in Southwest Germany: An update with records in new locations.*, *Parasites & Vectors*, 13, 173, **2020**.
- Oguz, G., Kasap, O. E., Alten, B., Wing morphology variations in a natural population of *Phlebotomus tobbi* Adler and Theodor 1930., *Journal of Vector Ecology*, 42, 2, 223–32, **2017**.
- Ok, Ü. Z., Balcıoğlu, I. C., Ozkan, A. T., Ozensoy, S., Ozbel, Y., Leishmaniasis in Turkey, *Acta Tropica*, 84, 43 - 48, **2002**.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A. E., Pham, V. M., Guigal, P. M., Fischer, L., Ward, J., Valenzuela, J. G., From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library., *Vaccine*, 24, 3, 374–90, **2006**.
- Oliveira, F., Rowton, E., Aslan, A., Gomes, R., Castrovinci, P. A., Alvarenga, P. H., Abdeladhim, M., Teixeira, C., Meneses, C., Kleeman, L. T., Guimarães-Costa, A., B., Rowland, T. E., Gilmore, D., Dombia, S., Reed, S. G., Lawyer, P. G., Andersen, J. F., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in Nonhuman primates., *Science Translational Medicine*, 7, 290, **2015**.
- Oliveira, F., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions., *Parasitology International*, 58, 1, 1–5, **2009**.
- Oliveira, F., Lawyer, P. G., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease., *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2, 4, e226, **2008**.
- Oliveira, S.G., Bottecchia, M., Bauzer, L. G. S. R. , Souza, N. A ., Ward, R. D., Kyriacou, C. P., Peixoto, A. A., Courtship song genes and speciation in sand flies., *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 3, 403–5, **2001**.
- Ordaya, E. E., Maguiña, C. P., Bartonellosis: Carrion’s Disease and Other *Bartonella* Infections., *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 604-607, 978-0-323-55512-8, **2020**.

- Orshan, L., Szekely, D., Khalfa, Z., Bitton, S., Distribution and seasonality of *Phlebotomus* sand flies in cutaneous leishmaniasis foci, Judean Desert, Israel., *Journal of Medical Entomology*, 47, 3, 319–28, **2010**.
- Orshan, L., Elbaz, S., Ben-Ari, Y., Akad, F., Afik, O., Ben-Avi, I., Dias, D., Ish-Shalom, D., Studentsky, L., Zonstein, I., Distribution and dispersal of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in a zoonotic cutaneous leishmaniasis focus, the Northern Negev, Israel (H. Louzir, Ed.), *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, **2016**.
- Overgaard, J., MacMillan, H. A., The integrative physiology of insect chill tolerance., *Annual Review of Physiology*, 79, 187–208, **2017**.
- Ozbel, Y., The infections transmitted by sand flies in Turkey., *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 60, 3, 225–28, **2013**.
- Özbilgin, A., Culha, G., Uzun, S., Harman, M., Topal, S. G., Okudan, F., Zeyrek, F., Gündüz, C., Ostan, I., Karakus, M., Toz, S., Kurt, O., Akyar, I., Erat, A., Güngör, D., Kayabaşı, C., Çavuş, İ., Bastien, P., Pratlong, F., Kocagoz, T., and Ozbel, Y., Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions., *Tropical Medicine & International Health*, 21, 6, 783-791, **2016**.
- Özbilgin, A., Töz, S., Harmanc, M., Topal, S. G., Uzune, S., Okudan, F., Güngör, D., Erat, A., Ertabaklar, H, Ertuğ, S., Gündüz, C., Çavuş, İ., Karakuş, M., Ural, İ. Ö., Ölgen, M. K., Kayabaşı, Ç., Kurt, Ö., Özbel, Y., The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey., *Acta Tropica*, 190, 59–67, **2019**.
- Özbilgin, A., Gencoglan, G., Tunalı, V., Çavuş, İ., Yıldırım, A., Gündüz, C., Harman, M., Refugees at the crossroads of continents: a molecular approach for cutaneous leishmaniasis among refugees in Turkey., *Acta Parasitologica*, 65, 1, 136-143, **2020**.
- Özkan, E. A., Yaşar, A., Domur, E, Geçit, U. A., Arıkan, F. İ., Two unexpected pediatric cases with cutaneous leishmaniasis., *Bozok Medical Journal*, 6, 2, 70–72, **2016**.
- Paim, R. M., Pereira, M. H., Ponzio, R. D., Rodrigues, J. O., Guarneri, A. A., Gontijo, N. F., Araújo R. N., Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by Quantitative Real-Time PCR., 5, 11, **2012**.

- Pareyn, M., Dvorak, V., Halada, P., Houtte, N. V., Girma, N., Kesel, W., Merdekios, B., Massebo, F., Leirs, H., Volf, P., An integrative approach to identify sand fly vectors of leishmaniasis in ethiopia by morphological and molecular techniques., *Parasites & Vectors*, 13, 1, 580, **2020**.
- Peixoto, A. A., Hall, J. C., Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila*, 148, 827–838, **1997**.
- Pekağırbaş, M., Karakus, M., Kasap, O. E., Demir, S., Nalçacı, N., Töz, S., Eren, H., Ozbel, Y., Investigation of *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae) fauna, seasonal dynamics, and natural *Leishmania* spp. infection in Muğla, Southwest of Turkey., *Acta Tropica*, 216, 105827, **2021**.
- Perez, R., Aron, S., Adaptations to thermal stress in social insects: recent advances and future directions., *Biological Reviews*, 95, 6, 1535–53, **2020**.
- Piazza, V., Bartke, A., Miquet, J., Sotelo, A., Analysis of different approaches for the selection of reference genes in RT-qPCR experiments: A case study in skeletal muscle of growing mice.” *International Journal of Molecular Sciences* 18(5): 1060, **2017**.
- Pimsler, M. L., Oyen, K. J., Herndon, J. D., Jackson, J. M., Strange, J. P., Dillon, M. E., Lozier, J. D., Biogeographic parallels in thermal tolerance and gene expression variation under temperature stress in a widespread bumble bee., *Scientific Reports*, 10, 17063, **2020**.
- Ponton, F., Chapuis, M., Pernice, M., Sword, G. A., Simpson, S. J., Evaluation of potential reference genes for Reverse Transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*., *Journal of Insect Physiology*, 57, 6, 840–50, **2011**.
- Prudhomme, J., Rahola, N., Toty, C., Cassan, C., Roiz, D., Vergnes, B., Thierry, M., Rioux, J., Alten, B., Sereno, D., Bañuls, A.,. Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc Region (Roquedur Area, Gard, France)., *Parasites & Vectors*, 8, 642, **2015**.
- Prudhomme, J., Cassan, C., Hide, M., Toty, C., Rahola, N., Vergnes, B., Dujardin, J., Alten, B., Sereno, D., Bañuls, A.,. Ecology and morphological variations in wings of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae) in the Region of Roquedur (Gard, France): A geometric morphometrics approach., *Parasites & Vectors*, 9, 578, **2016**.

- Ramalho-Ortigão, J. M., Kamhawi, S., Rowton, E. D., Ribeiro, J. M. C., Valenzuela, J. G., Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 163–171, **2003**.
- Ramalho-Ortigão, M., Coutinho-Abreu, I. V., Balbino, V. Q., Figueiredo Jr, C. A. S., Mukbel, R., Dayem, H., Hanafi, H. A., El-Hossary, S. S., Fawaz, E. E. Y., Abo-Shehadeh, M., Hoel, D. F., Stayback, G., Wadsworth, M., Shoue, D. A., Abrudan, J., Lobo, N. F., Mahon, A., R., Emrich, S. J., Kamhawi, S., Collins, F. H., McDowell, M. A., *Phlebotomus papatasi* SP15: mRNA expression variability and amino acid sequence polymorphisms of field populations., *Parasites & Vectors*, 8, 298, **2015**.
- Ramanathan, A. Ganapathi, N. K., Nair, A. J., Sugunan, V. S., A review on royal jelly proteins and peptides., *Journal of Functional Foods*, 44, 255–64, **2018**.
- Ramos, W. R., Medeiros, J. F., Julião, G. R., Ríos-Velásquez, C. M., Marialva, E. F., Desmoulière, S. J. M., Luz, S. L. B., Pessoa, F. A. C., Anthropoc effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil., *Acta Tropica*, 139, 44 - 52, **2014**.
- Rassi, Y., Dehkordi, A. S., Oshaghi, M. A., Abai, M. R., Mohtarami, F., Enayati, A., Zarei, Z., Javadianet, E., First report on natural infection of the *Phlebotomus tobbi* by *Leishmania infantum* in Northwestern Iran., *Experimental Parasitology*, 131, 3, 344–49, **2012**.
- Reeve, M. A., Haye, T., Discrimination between eggs from stink bugs species in europe using MALDI-TOF MS., *Insects*, 12, 7, 587, **2021**.
- Reinhold, J. M., Lazzari, C. R., Lahondère, C., Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: A review., 17, **2018**.
- Rohoušová, I., Subrahmanyam, S., Volfova, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J. G., Jochim, R. C., Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis., *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, 5, e1660, **2012**.
- Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Mikhailov, A., Maia-Elkhoury, A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., Osman, M., Lin, Z., Beshah, A., Yajima, A., Gasimov, E., Global

leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap., *Weekly Epidemiological Record*, 35, 19, **2021**.

Ryglewski, S., Kilo, L., Duch C., Sequential acquisition of *Cacophony* calcium currents, sodium channels and voltage-dependent potassium currents affects spike shape and dendrite growth during postembryonic maturation of an identified *Drosophila* motoneuron., *European Journal of Neuroscience* 39(10): 1572–85, **2014**.

Savar, N. S., Vallet, T., Azizi, M., Arashkia, A., Lundstrom, K., Vignuzzi, M., Niknam, H. M., Quantitative evaluation of PpSP15-LmSTII fusion gene expression following transfection with an alphavirus-derived self-amplifying mRNA and conventional DNA vaccine platforms., *Molecular and Cellular Probes*, 59, 101749, **2021**.

Seblova, V., Myskova, J., Hlavacova, J., Votypka, J., Antoniou, M. Volf, P., Natural hybrid of *Leishmania infantum/L. donovani*: Development in *Phlebotomus tobbi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis* and comparison with non-hybrid strains differing in tissue tropism., *Parasites & Vectors*, 8, 605, **2015**.

Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Dey, R., Kissinger, R., Valenzuela, J. G., Oliveira, F., Kamhawi S., Leishmaniasis: The act of transmission., *Trends in Parasitology*, 37, 11, 976–87, **2021**.

Sima, M., Novotny, M., Pravda, L., Sumova, P., Rohousova, I., Volf, P., The diversity of yellow-related proteins in sand flies (Diptera: Psychodidae)., *PLOS ONE*, 11, 11, e0166191, **2016**.

Smith, L. A., Peixoto, A. A., Kramer, E. M., Villella, A., Hall, J. C., Courtship and visual defects of *Cacophony* mutants reveal functional complexity of a calcium-channel $\alpha 1$ subunit in *Drosophila*. 149, 1407–1426, **1998**.

Sternberg, E. D., Thomas, M. B., Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases., *Trends in Parasitology*, 30, 3, 115–22, **2014**.

Stucki, D., Freitag, D., Sundström, L., Survival and gene expression under different temperature and humidity regimes in ants., *PLOS ONE*, 12, 7, e0181137, **2017**.

Sulesco, T., Kasap, O. E., Halada, P., Oguz, G., Rusnac, D., Gresova, M., Alten, B., Volf, P., Dvorak, V., *Phlebotomine* sand fly survey in the Republic of Moldova: Species composition, distribution and host preferences., *Parasites & Vectors*, 14, 371, **2021**.

- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvorak, V., Hlavackova, J., Myskova, J., Seblova, V., Kasap, O. E., Belen, A., Votypka, J., Volf, P., Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*., *International Journal for Parasitology*, 39, 2, 251–56, **2009**.
- Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaiem, D., Caldas, A., Souza, A. P., Brodskyn, C. I., Oliveira, C., I., Mendonca, I., Costa, C. H. N., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America., *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, 3, e638, **2010**.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E., Housekeeping genes as internal standards: Use and limits., *Journal of Biotechnology*, 75, 2, 3, 291–95, **1999**.
- Theodor, O., Psychodidae - Phlebotominae. In: Lindner E (Ed.): Die Fliegen Der Palearktischen Region., *E. Schweizerbartsche Verlags Stuttgart Germany*, 1–55, **1958**.
- Utuk, A. E., Gokmen, T. G., Bolacali, M., Balkaya, I., Simsek, S., A serologic survey on canine leishmaniasis in Kocaeli, Sakarya, Mersin and Elazığ Provinces of Turkey., *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 74, 4, 4–7, **2018**.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E., D., Sacks, D. L., Ribeiro J. M. C. Toward a defined anti-leishmania vaccine targeting vector antigens., *Journal of Experimental Medicine*, 194, 3, 331–42, **2001**.
- Vaselek, S., Volf, P., Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus tobbi* with different *Leishmania tropica* strains., *International Journal for Parasitology*, 49, 11, 831–35, **2019**.
- Velo, E. Papparisto A., Bongiorno G., Di Muccio T., Khoury C., Bino S., Gramiccia M., Gradoni L., Maroli M., The current status of *Phlebotomine* sand flies in Albania and incrimination of *Phlebotomus neglectus* (Diptera, Psychodidae) as the main vector of *Leishmania infantum*. *PLOS ONE*, 12, 6, e0179118, **2017**.
- Vlkova, M., Sima, M., Rohousova, I., Kostalova, T., Sumova, P., Volfova, V., Jaske, E. L., Barbian, K. D., Gebre-Michael, T., Hailu, A., Warburg, A., Ribeiro, J. M. C. Valenzuela, J. G., Jochim, R. C., Volf, P., Canine antibody response to *Phlebotomus*

perniciosus bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, 10, e1344, **2011**.

Volf, P., Ozbel, Y., Akkafa, F., Svobodova, M., Votypka, J., Chang, K. P., Sand flies (Diptera: *Phlebotominae*) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis., *Journal of Medical Entomology* 39, 12–15, **2002**.

Wang, M., Marinotti, O., James, A. A., Walker, E., Githure, J., Yan, G., Genome-Wide patterns of gene expression during aging in the African Malaria vector *Anopheles gambiae*, *PLoS ONE* 5, 10, e13359, **2010**.

WHO, Weekly epidemiological record., *World Health Organization Publication No. 22*, 91, 285–296, 0049-8114, **2016**.

WHO, Weekly epidemiological record., *World Health Organization Publication No. 40*, 93, 521–540, 0049-8114, **2018**.

Xin, X., Chen, Y., Chen, D., Xiao, F., Parnell, L. D., Zhao, J., Liu, L., Ordovas, J. M., Lai, C., Shen, L., Supplementation with major royal-jelly proteins increases lifespan, feeding, and fecundity in *Drosophila*., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 29, 5803–12, 2016.

Xu, X., Oliveira, F., Chang, B. W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., Pham, V., Elnaiem, D., Kamhawi, S., Ribeiro, J. M. C., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Structure and function of a ‘Yellow’ protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection., *Journal of Biological Chemistry*, 286, 37, 32383–93, **2011**.

Xu, H. J., Xue, J., Lu, B., Zhang, X. C., Zhuo, J. C., He, S. F., Ma, X. F., Jiang, Y. Q., Fan, H. W., Xu, J. Y., Ye, Y. X., Pan, P. L., Li, Q., Bao, Y. Y., Nijhout, H. F., Zhang, X. C., Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers, *Nature*, 519, 7544, 464-467, **2015**.

Yablonovitch, A. L., Fu, J., Li, K., Mahato, J., Kang, L., Rashkovetsky, E., Korol, A. B. Tang, H., Michalak, P., Zelhof, A. C., Nevo, E., Li, J. B., Regulation of gene expression and RNA editing in *Drosophila* adapting to divergent microclimates., *Nature Communications* 8, 1570, **2017**.

Yang, C., Pan, H., Liu, Y., Zhou, X., Stably expressed housekeeping genes across developmental stages in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae.*, *PLOS ONE* 10, 3, e0120833, **2015**.

Yılmaz, A., Farklı sıcaklıkların *Phlebotomus tobbi* Adler, Theodor & Lourie, 1930 (Diptera:Psychodidae) üzerindeki etkisinin hayat tablosu verileri ve gün-derece modeliyle analizi., Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2020**.

Zeyrek, F. Y., Gürses, G., Uluca, N., Doni, N. Y., Toprak, Ş., Yeşilova, Y., Çulha, G., Is the agent of Cutaneous Leishmaniasis in Sanliurfa changing? First cases of *Leishmania major.*, *Turkish Journal of Parasitology*, 38, 4, 270-274, **2015**.

Zhang, J., Plowman, J. E., Tian, B., Clerens, S., On S. L. W., The influence of growth conditions on MALDI-TOF MS spectra of winemaking yeast: implications for industry applications., *Journal of Microbiological Methods*, 188, 106280, **2021**.

Zheng, C., Zhao, D., Xu, Y., Shi, F., Zong S., Tao, J., Reference gene selection for expression analyses by qRT-PCR in *Dendroctonus valens.*, 11, 328, **2020**.

Zhou, S., Campbell, T. G., Stone, E. A., Mackay, T. F. C., Anholt R. R. H., Phenotypic plasticity of the *Drosophila* transcriptome., *PLoS Genetics*, 8, 3, e1002593, **2012**.

Zimmerman, E., Palsson, A., Gibson, G., Quantitative Trait Loci Affecting Components of Wing Shape in *Drosophila melanogaster.*, *Genetics Society of America*, 155, 671–683, **2000**.

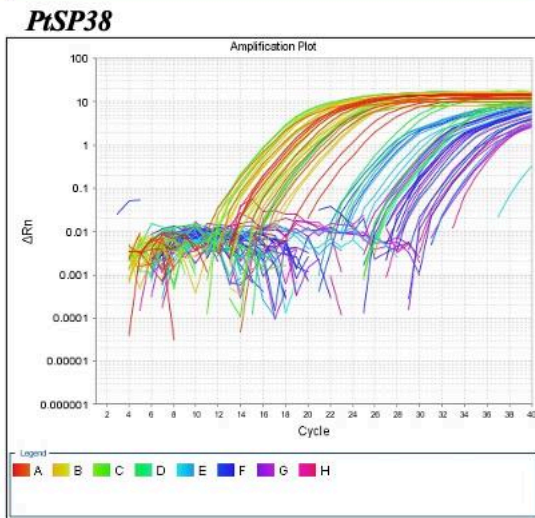
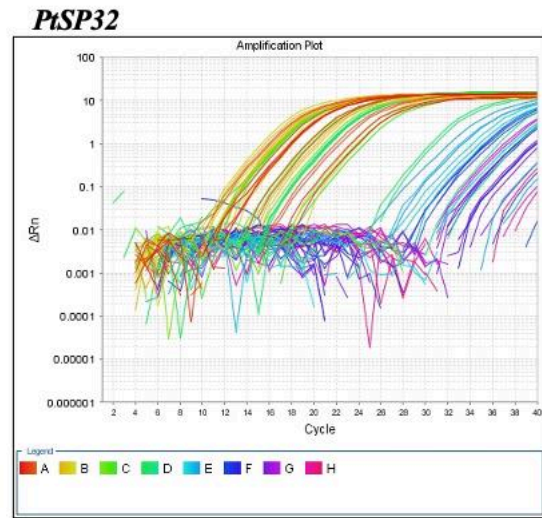
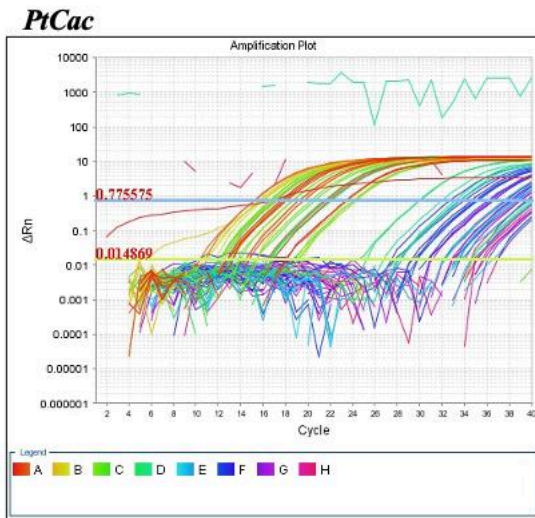
EKLER

EK 1: *Phlebotomus tobbi* Koloni Örneklerine Ait RT-PZR Analizinde Örneklerin Kuyucuklara Yerleşimi ve RT-PZR Sonuç Grafikleri

Kuyucuk	Örnek Adı	Hedef Gen	Kuyucuk	Örnek Adı	Hedef Gen
A1	27oC - 1	<i>18S-rRNA</i>	E1	27oC - 1	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A2	27oC - 1	<i>18S-rRNA</i>	E2	27oC - 1	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A3	27oC - 2	<i>18S-rRNA</i>	E3	27oC - 2	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A4	27oC - 2	<i>18S-rRNA</i>	E4	27oC - 2	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A5	27oC - 3	<i>18S-rRNA</i>	E5	27oC - 3	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A6	27oC - 3	<i>18S-rRNA</i>	E6	27oC - 3	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A7	27oC - 4	<i>18S-rRNA</i>	E7	27oC - 4	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A8	27oC - 4	<i>18S-rRNA</i>	E8	27oC - 4	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A9	27oC - 5	<i>18S-rRNA</i>	E9	27oC - 5	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A10	27oC - 5	<i>18S-rRNA</i>	E10	27oC - 5	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A11	27oC - 6	<i>18S-rRNA</i>	E11	27oC - 6	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
A12	27oC - 6	<i>18S-rRNA</i>	E12	27oC - 6	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B1	27oC - 7	<i>18S-rRNA</i>	F1	27oC - 7	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B2	27oC - 7	<i>18S-rRNA</i>	F2	27oC - 7	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B3	27oC - 8	<i>18S-rRNA</i>	F3	27oC - 8	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B4	27oC - 8	<i>18S-rRNA</i>	F4	27oC - 8	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B5	27oC - 9	<i>18S-rRNA</i>	F5	27oC - 9	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B6	27oC - 9	<i>18S-rRNA</i>	F6	27oC - 9	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B7	27oC - 10	<i>18S-rRNA</i>	F7	27oC - 10	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B8	27oC - 10	<i>18S-rRNA</i>	F8	27oC - 10	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B9	23oC - 1	<i>18S-rRNA</i>	F9	23oC - 1	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B10	23oC - 1	<i>18S-rRNA</i>	F10	23oC - 1	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B11	23oC - 2	<i>18S-rRNA</i>	F11	23oC - 2	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
B12	23oC - 2	<i>18S-rRNA</i>	F12	23oC - 2	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C1	23oC - 3	<i>18S-rRNA</i>	G1	23oC - 3	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C2	23oC - 3	<i>18S-rRNA</i>	G2	23oC - 3	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C3	23oC - 4	<i>18S-rRNA</i>	G3	23oC - 4	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C4	23oC - 4	<i>18S-rRNA</i>	G4	23oC - 4	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C5	23oC - 5	<i>18S-rRNA</i>	G5	23oC - 5	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C6	23oC - 5	<i>18S-rRNA</i>	G6	23oC - 5	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C7	23oC - 6	<i>18S-rRNA</i>	G7	23oC - 6	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C8	23oC - 6	<i>18S-rRNA</i>	G8	23oC - 6	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C9	23oC - 7	<i>18S-rRNA</i>	G9	23oC - 7	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C10	23oC - 7	<i>18S-rRNA</i>	G10	23oC - 7	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C11	23oC - 8	<i>18S-rRNA</i>	G11	23oC - 8	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
C12	23oC - 8	<i>18S-rRNA</i>	G12	23oC - 8	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D1	23oC - 9	<i>18S-rRNA</i>	H1	23oC - 9	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D2	23oC - 9	<i>18S-rRNA</i>	H2	23oC - 9	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D3	23oC - 10	<i>18S-rRNA</i>	H3	23oC - 10	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D4	23oC - 10	<i>18S-rRNA</i>	H4	23oC - 10	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D5	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H5	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D6	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H6	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D7	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H7	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D8	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H8	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D9	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H9	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D10	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H10	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D11	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H11	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>
D12	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	H12	Negatif	<i>PtCac / PtSP32 / PtSP38</i>

Not: Her bir hedef gen için aynı dizilim uygulanmıştır.

EK 1 – Devam



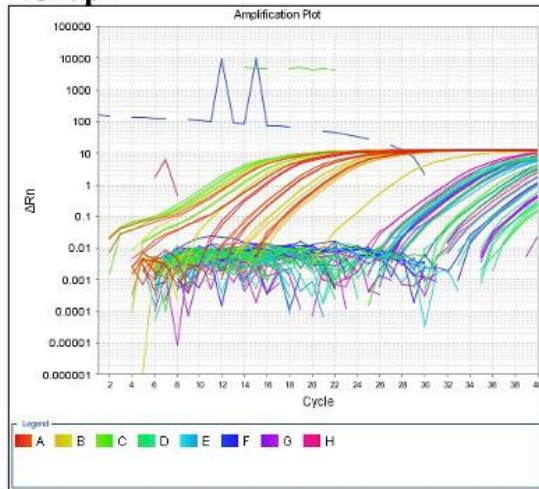
EK 2 – *Phlebotomus tobbi* Doğal Populasyonlarına Ait *PtCac* ve *PtSP32* Hedef Genleri İçin Yapılan RT-PZR Analizinde Örneklerin Kuyucuklara Yerleşimi ve RT-PZR Sonuç Grafikleri

Kuyucuk	Örnek Adı	Hedef Gen	Kuyucuk	Örnek Adı	Hedef Gen	Kuyucuk	Örnek Adı	Hedef Gen
A1	Adana - 1	<i>18S-rRNA</i>	C9	Adana - 1	<i>PtCac</i>	F5	Adana - 1	<i>PtSP32</i>
A2	Adana - 1	<i>18S-rRNA</i>	C10	Adana - 1	<i>PtCac</i>	F6	Adana - 1	<i>PtSP32</i>
A3	Adana - 2	<i>18S-rRNA</i>	C11	Adana - 2	<i>PtCac</i>	F7	Adana - 2	<i>PtSP32</i>
A4	Adana - 2	<i>18S-rRNA</i>	C12	Adana - 2	<i>PtCac</i>	F8	Adana - 2	<i>PtSP32</i>
A5	Adana - 3	<i>18S-rRNA</i>	D1	Adana - 3	<i>PtCac</i>	F9	Adana - 3	<i>PtSP32</i>
A6	Adana - 3	<i>18S-rRNA</i>	D2	Adana - 3	<i>PtCac</i>	F10	Adana - 3	<i>PtSP32</i>
A7	Adana - 4	<i>18S-rRNA</i>	D3	Adana - 4	<i>PtCac</i>	F11	Adana - 4	<i>PtSP32</i>
A8	Adana - 4	<i>18S-rRNA</i>	D4	Adana - 4	<i>PtCac</i>	F12	Adana - 4	<i>PtSP32</i>
A9	Adana - 5	<i>18S-rRNA</i>	D5	Adana - 5	<i>PtCac</i>	G1	Adana - 5	<i>PtSP32</i>
A10	Adana - 5	<i>18S-rRNA</i>	D6	Adana - 5	<i>PtCac</i>	G2	Adana - 5	<i>PtSP32</i>
A11	Datça - 1	<i>18S-rRNA</i>	D7	Datça - 1	<i>PtCac</i>	G3	Datça - 1	<i>PtSP32</i>
A12	Datça - 1	<i>18S-rRNA</i>	D8	Datça - 1	<i>PtCac</i>	G4	Datça - 1	<i>PtSP32</i>
B1	Datça - 2	<i>18S-rRNA</i>	D9	Datça - 2	<i>PtCac</i>	G5	Datça - 2	<i>PtSP32</i>
B2	Datça - 2	<i>18S-rRNA</i>	D10	Datça - 2	<i>PtCac</i>	G6	Datça - 2	<i>PtSP32</i>
B3	Datça - 3	<i>18S-rRNA</i>	D11	Datça - 3	<i>PtCac</i>	G7	Datça - 3	<i>PtSP32</i>
B4	Datça - 3	<i>18S-rRNA</i>	D12	Datça - 3	<i>PtCac</i>	G8	Datça - 3	<i>PtSP32</i>
B5	Datça - 4	<i>18S-rRNA</i>	E1	Datça - 4	<i>PtCac</i>	G9	Datça - 4	<i>PtSP32</i>
B6	Datça - 4	<i>18S-rRNA</i>	E2	Datça - 4	<i>PtCac</i>	G10	Datça - 4	<i>PtSP32</i>
B7	Datça - 5	<i>18S-rRNA</i>	E3	Datça - 5	<i>PtCac</i>	G11	Datça - 5	<i>PtSP32</i>
B8	Datça - 5	<i>18S-rRNA</i>	E4	Datça - 5	<i>PtCac</i>	G12	Datça - 5	<i>PtSP32</i>
B9	Yozgat - 1	<i>18S-rRNA</i>	E5	Yozgat - 1	<i>PtCac</i>	H1	Yozgat - 1	<i>PtSP32</i>
B10	Yozgat - 1	<i>18S-rRNA</i>	E6	Yozgat - 1	<i>PtCac</i>	H2	Yozgat - 1	<i>PtSP32</i>
B11	Yozgat - 2	<i>18S-rRNA</i>	E7	Yozgat - 2	<i>PtCac</i>	H3	Yozgat - 2	<i>PtSP32</i>
B12	Yozgat - 2	<i>18S-rRNA</i>	E8	Yozgat - 2	<i>PtCac</i>	H4	Yozgat - 2	<i>PtSP32</i>
C1	Yozgat - 3	<i>18S-rRNA</i>	E9	Yozgat - 3	<i>PtCac</i>	H5	Yozgat - 3	<i>PtSP32</i>
C2	Yozgat - 3	<i>18S-rRNA</i>	E10	Yozgat - 3	<i>PtCac</i>	H6	Yozgat - 3	<i>PtSP32</i>
C3	Yozgat - 4	<i>18S-rRNA</i>	E11	Yozgat - 4	<i>PtCac</i>	H7	Yozgat - 4	<i>PtSP32</i>
C4	Yozgat - 4	<i>18S-rRNA</i>	E12	Yozgat - 4	<i>PtCac</i>	H8	Yozgat - 4	<i>PtSP32</i>
C5	Yozgat - 5	<i>18S-rRNA</i>	F1	Yozgat - 5	<i>PtCac</i>	H9	Yozgat - 5	<i>PtSP32</i>
C6	Yozgat - 5	<i>18S-rRNA</i>	F2	Yozgat - 5	<i>PtCac</i>	H10	Yozgat - 5	<i>PtSP32</i>
C7	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	F3	Negatif	<i>PtCac</i>	H11	Negatif	<i>PtSP32</i>
C8	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	F4	Negatif	<i>PtCac</i>	H12	Negatif	<i>PtSP32</i>

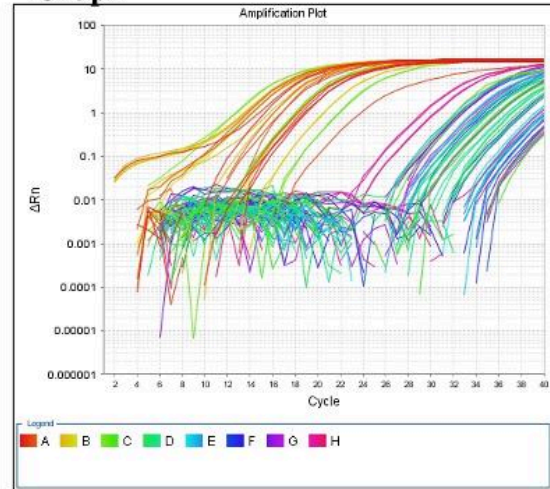
Not: Her bir grup için aynı dizilim uygulanmıştır.

EK 2 – Devam

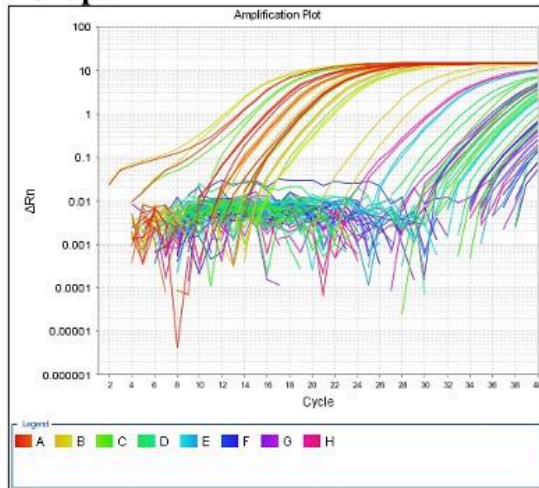
Grup 1



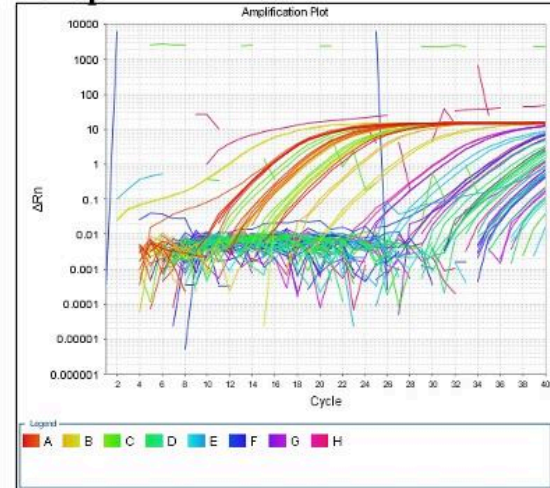
Grup 2



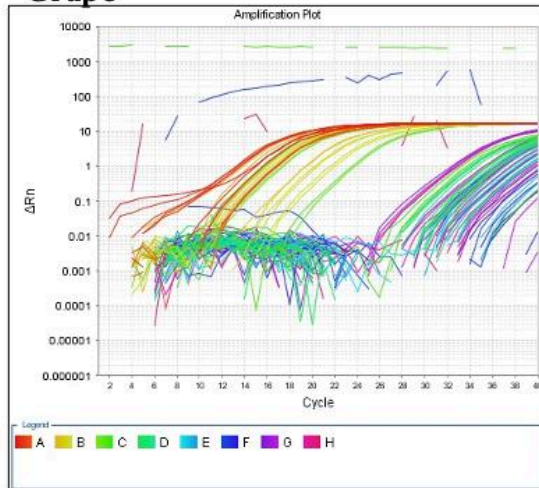
Grup 3



Grup 4



Grup 5



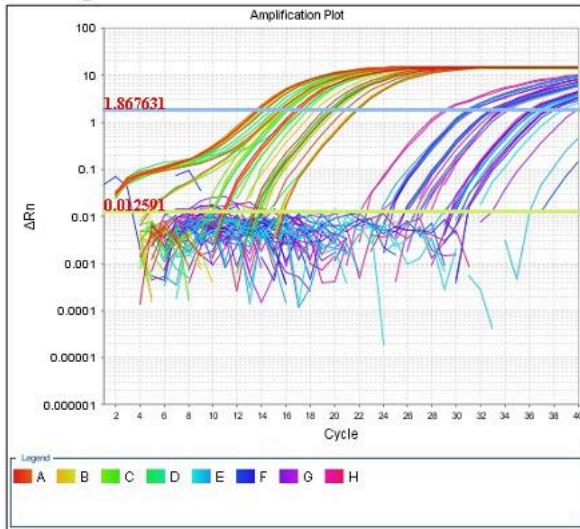
EK 3 – *Phlebotomus tobbi* Doğal Populasyonlarına Ait *PtSP38* Hedef Geni İçin Yapılan RT-PZR Analizinde Örneklerin Kuyucuklara Yerleşimi ve RT-PZR Sonuç Grafikleri

Kuyucuk	Örnek Adı	Hedef Gen	Kuyucuk	Örnek Adı	Hedef Gen
A1	Adana - 1	<i>18S-rRNA</i>	C9	Adana - 1	<i>PtSP38</i>
A2	Adana - 1	<i>18S-rRNA</i>	C10	Adana - 1	<i>PtSP38</i>
A3	Adana - 2	<i>18S-rRNA</i>	C11	Adana - 2	<i>PtSP38</i>
A4	Adana - 2	<i>18S-rRNA</i>	C12	Adana - 2	<i>PtSP38</i>
A5	Adana - 3	<i>18S-rRNA</i>	D1	Adana - 3	<i>PtSP38</i>
A6	Adana - 3	<i>18S-rRNA</i>	D2	Adana - 3	<i>PtSP38</i>
A7	Adana - 4	<i>18S-rRNA</i>	D3	Adana - 4	<i>PtSP38</i>
A8	Adana - 4	<i>18S-rRNA</i>	D4	Adana - 4	<i>PtSP38</i>
A9	Adana - 5	<i>18S-rRNA</i>	D5	Adana - 5	<i>PtSP38</i>
A10	Adana - 5	<i>18S-rRNA</i>	D6	Adana - 5	<i>PtSP38</i>
A11	Datça - 1	<i>18S-rRNA</i>	D7	Datça - 1	<i>PtSP38</i>
A12	Datça - 1	<i>18S-rRNA</i>	D8	Datça - 1	<i>PtSP38</i>
B1	Datça - 2	<i>18S-rRNA</i>	D9	Datça - 2	<i>PtSP38</i>
B2	Datça - 2	<i>18S-rRNA</i>	D10	Datça - 2	<i>PtSP38</i>
B3	Datça - 3	<i>18S-rRNA</i>	D11	Datça - 3	<i>PtSP38</i>
B4	Datça - 3	<i>18S-rRNA</i>	D12	Datça - 3	<i>PtSP38</i>
B5	Datça - 4	<i>18S-rRNA</i>	E1	Datça - 4	<i>PtSP38</i>
B6	Datça - 4	<i>18S-rRNA</i>	E2	Datça - 4	<i>PtSP38</i>
B7	Datça - 5	<i>18S-rRNA</i>	E3	Datça - 5	<i>PtSP38</i>
B8	Datça - 5	<i>18S-rRNA</i>	E4	Datça - 5	<i>PtSP38</i>
B9	Yozgat - 1	<i>18S-rRNA</i>	E5	Yozgat - 1	<i>PtSP38</i>
B10	Yozgat - 1	<i>18S-rRNA</i>	E6	Yozgat - 1	<i>PtSP38</i>
B11	Yozgat - 2	<i>18S-rRNA</i>	E7	Yozgat - 2	<i>PtSP38</i>
B12	Yozgat - 2	<i>18S-rRNA</i>	E8	Yozgat - 2	<i>PtSP38</i>
C1	Yozgat - 3	<i>18S-rRNA</i>	E9	Yozgat - 3	<i>PtSP38</i>
C2	Yozgat - 3	<i>18S-rRNA</i>	E10	Yozgat - 3	<i>PtSP38</i>
C3	Yozgat - 4	<i>18S-rRNA</i>	E11	Yozgat - 4	<i>PtSP38</i>
C4	Yozgat - 4	<i>18S-rRNA</i>	E12	Yozgat - 4	<i>PtSP38</i>
C5	Yozgat - 5	<i>18S-rRNA</i>	F1	Yozgat - 5	<i>PtSP38</i>
C6	Yozgat - 5	<i>18S-rRNA</i>	F2	Yozgat - 5	<i>PtSP38</i>
C7	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	F3	Negatif	<i>PtSP38</i>
C8	Negatif	<i>18S-rRNA</i>	F4	Negatif	<i>PtSP38</i>

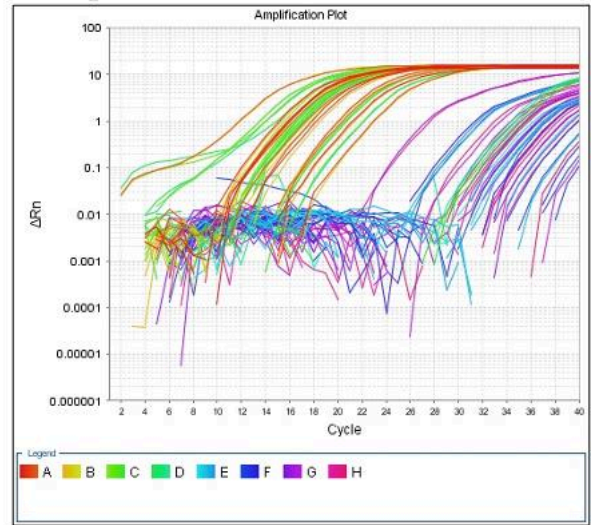
Not: Her bir grup için aynı dizilim uygulanmıştır.

EK 3 – Devam

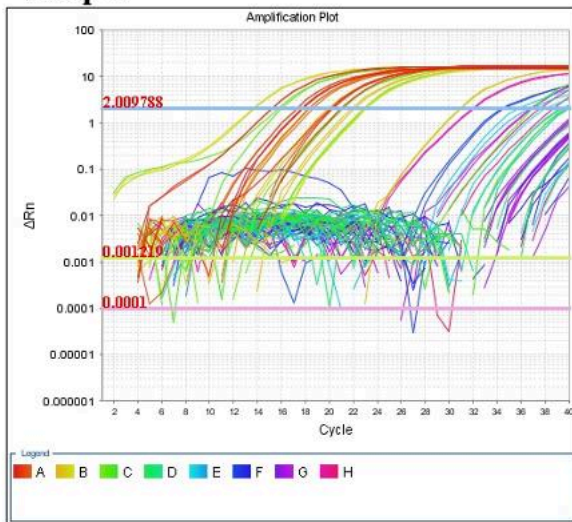
Grup 1



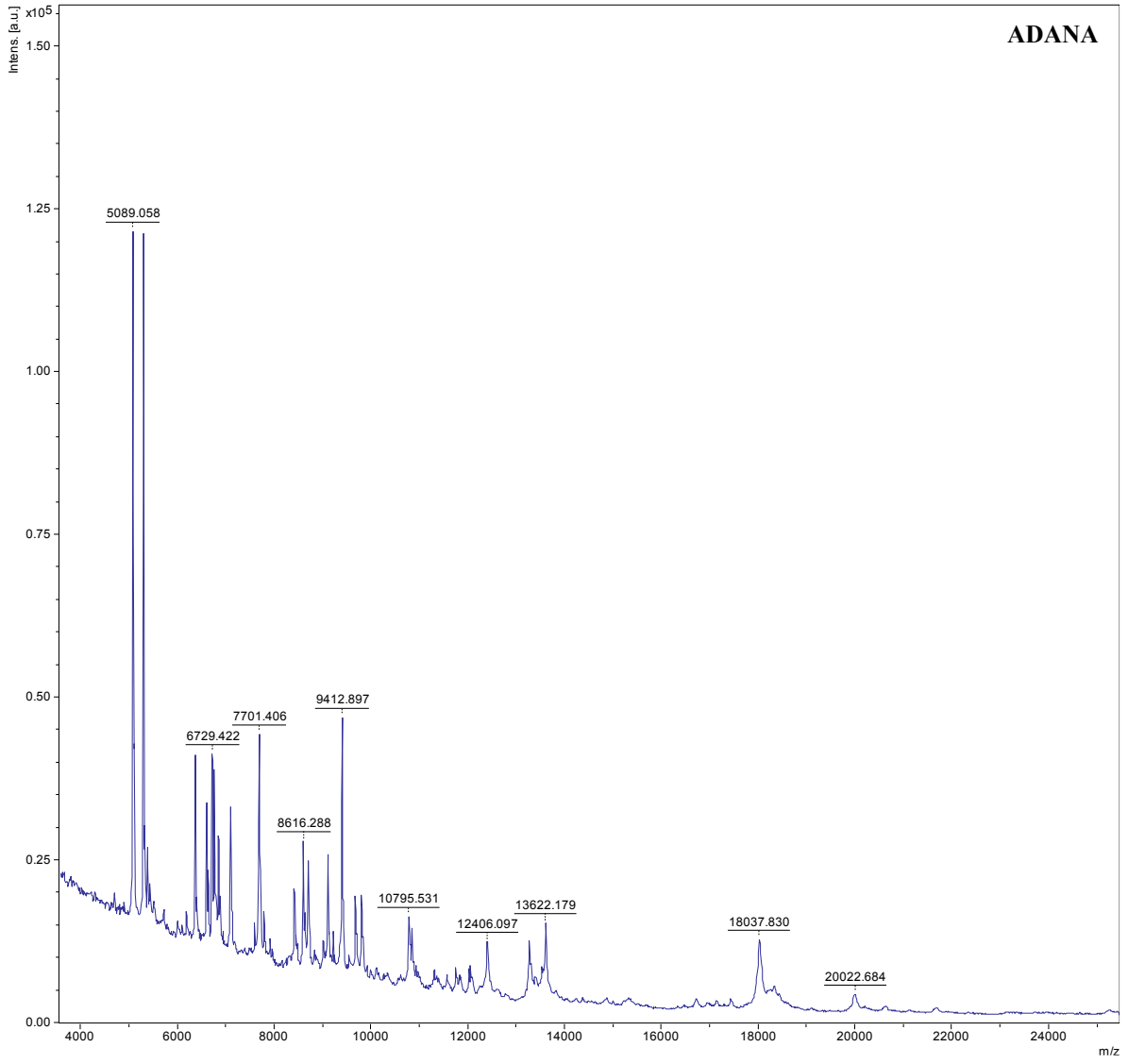
Grup 4



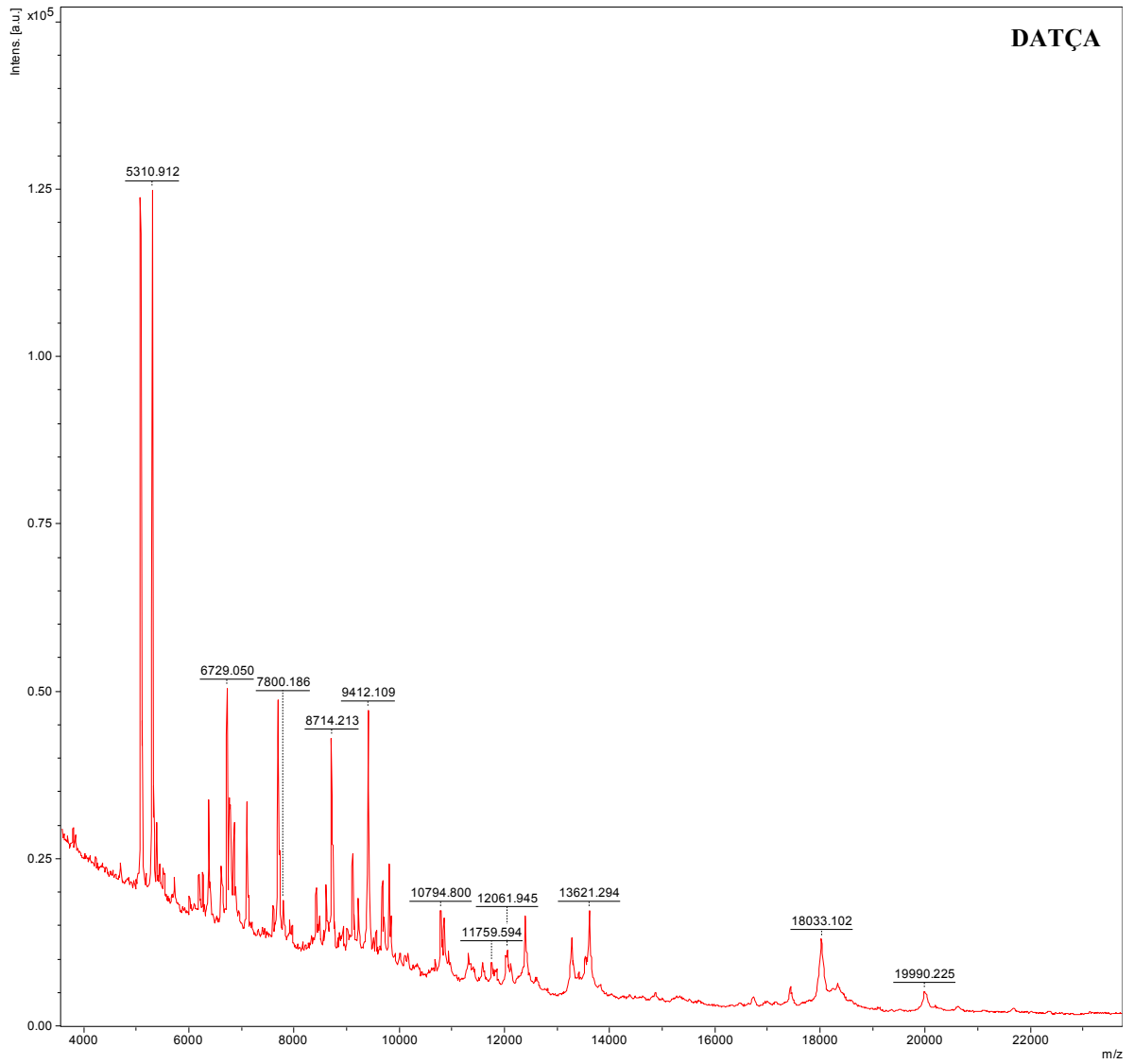
Grup 5



EK 4: *Phlebotomus tobbi* Doğal Populasyonlarına Ait İyon Kütle Spektrumları



EK 4 – Devam



EK 4 – Devam

