

# Molecular Characterization and Expression Analysis of the Sterol-carrier Protein-2 Fragment in *Anopheles sacharovi* Generations

## *Anopheles sacharovi* Nesillerinde Sterol Taşıyıcı Protein-2 Fragmanının Moleküler Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri

© Sümeyye Aygün, © Önder Düzülü, © Alparslan Yıldırım

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Cite this article as: Aygün S, Düzülü Ö, Yıldırım A. Molecular Characterization and Expression Analysis of the Sterol-carrier Protein-2 Fragment in *Anopheles sacharovi* Generations. Türkiye Parazitoloj Derg 2022;46(4):312-21.

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, *Anopheles sacharovi*'de sterol taşıyıcı protein-2 (SCP-2) geninin ilk kez moleküler karakterizasyonunun yapılması ve bu proteini kodlayan genin *An. sacharovi* gelişim dönemleri ve dişi nesillerin tükürük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusu gibi farklı dokularında ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Sultan Sazlığı yöresinden toplanan ergin dişi *An. sacharovi* ve insektaryumda elde edilen gelişim dönemleri çalışma materyalini oluşturmuştur. Morfolojik ve moleküler tür identifikasyonu yapılan *An. sacharovi* nesilleri ve ergin dişi dokularından total RNA ekstraksiyonunu takiben cDNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. cDNA kalıplarında SCP-2 geninin 216 bp fragmenti optimize edilmiş primerlerle amplifiye edilmiş ve ampikonlar sekanslanmıştır. Sekanslar in-silico analizlerle işlenerek genetik karakterizasyonları sağlanmıştır.

**Bulgular:** Sekans analizine alınan toplam 14 izolata ait SCP-2 nükleotid sekanslarının 12'sinin %100 benzer olduğu, birbirine homolog olan diğer iki izolata ait SCP-2 sekanslarının ise 183. bazda tek nükleotid değişimi gösterdiği belirlenmiştir. SCP-2 gen bölgesinin 216 bp fragmentinin 72 amino asit zincirini kodladığı tespit edilmiştir. Filogenetik analiz sonucu SCP-2 gen sekanslarının sivrisinek türü ve soyu bazında monofiletik olarak kümelendiği, *An. sacharovi* izolatlarının *Anopheles* kümesi içerisinde *An. stephensi* ve *An. funestus*'la birlikte alt küme oluşturduğu görülmüştür. qPCR ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2'nin en yüksek ergin erkeklerde ifade olduğu ve bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Ergin dişi dokularında ise SCP-2'nin en yüksek, fatbody'de ifade olduğu bunu sırasıyla midgut ve tükürük bezinin izlediği belirlenmiştir.

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

**Anahtar Kelimeler:** *Anopheles sacharovi*, sterol taşıyıcı protein-2, moleküler karakterizasyon, ekspresyon analizleri

### ABSTRACT

**Objective:** It was aimed to characterize the sterol carrier protein-2 (SCP-2) gene in *Anopheles sacharovi* using molecular methods for the first time, and to reveal the expression levels of *An. sacharovi* in the developmental stages and female generation in different tissues such as salivary gland, midgut and adipose tissue.

**Methods:** The adult female *An. sacharovi* collected from the Sultan Sazlığı region and the development stages in the insectarium constituted the study material. cDNA isolation was performed following total RNA extraction from *An. sacharovi* strains. The 216 bp fragment of the SCP-2 gene was amplified with optimized primers in cDNA templates and was sequenced. Genetic characterization of the sequences was provided in silico analysis.

**Results:** Twelve of the SCP-2 nucleotide sequences of 14 isolates included in the sequence analysis were 100% identical and the SCP-2 sequences of the other two isolates that were homologous to each other showed a single nucleotide change at base 183. The 216 bp fragment of the SCP-2 gene region was found encoding the 72 amino acid chain. SCP-2 gene sequences clustered the isolates monophyletically on the basis of mosquito species and strains, and that *Anopheles sacharovi* isolates formed a subcluster together with *Anopheles stephensi* and *Anopheles funestus* within the *Anopheles* cluster in phylogenetic analysis. Because of q-polymerase chain reaction-mediated expression analysis, SCP-2 gene was expressed highest in adult males, followed by an adult female, ss L4, L3, L2, L1, and pupal stages, respectively. In adult female tissues, the SCP-2 gene was expressed the highest in the fat body, followed by the midgut and salivary glands, respectively.

Geliş Tarihi/Received: 25.08.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 28.09.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Önder Düzülü, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye  
Tel/Phone: +90 352 207 66 66 E-Posta/E-mail: onderduzulu@erciyes.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6951-0901



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

**Keywords:** *Anopheles sacharovi*, sterol carrier protein-2, molecular characterization, expression analysis

## GİRİŞ

*Anopheles* soyunda yer alan Maculipennis kompleks sibling ve kriptik türleri içerdiği anlaşılan sivrisinekler içerisinde ilk örnek olması ve medikal önemleri ile taksonomik klasifikasyon ve filogenetik ilişkiler üzerine çalışmalarda ilgi odağı olmuştur. Maculipennis kompleksin günümüze kadar palearktık bölgede 10'un üzerinde türü identifiye edilmiş olmakla birlikte (1) henüz ilgili coğrafik alanda genetik çeşitlilik üzerine veriler oldukça sınırlıdır. Ülkemizde günümüze kadar morfolojik analizlerle *Anopheles* soyunda 10 türün varlığı bildirilmiş olup bunlardan dördünün Maculipennis komplekste yer alan *An. sacharovi*, *An. maculipennis* s.s., *An. melanoon* ve *An. messae* olduğu görülmektedir (2-5). *Anopheles sacharovi*, *An. atroparvus* ve *An. labranchiae* ile birlikte palearktık bölgede geçmişten günümüze etkin sıtma vektörleri olarak nitelenmektedir (6-9). Türkiye (3,7), Suriye (10,11) ve Orta Doğu'nun farklı bölgelerinde (12,13) *P. vivax* malaryasının en etkin vektörü *An. sacharovi* olarak kaydedilmiştir. Ayrıca Güney Avrupa Bölgeleri'nde ana potansiyel vektör olarak da görülmektedir (8,14). *Anopheles* türlerinin vektörlüğünü yaptığı sıtmanın önlenmesindeki en kritik nokta geleneksel olarak kullanılan insektisitlerle beraber sivrisinek popülasyonlarının baskılanmasıdır (15). Ancak bu mücadelede karşılaşılan en büyük sıkıntı insektisitlere karşı gelişen direnç mekanizmasıdır (16). Bu noktada sivrisineklere karşı kolesterol alımı veya taşınması gibi yeni biyoteknolojik yaklaşımlara ihtiyaç bulunmaktadır (17). İncektler, tüm ökaryotlar gibi yapısal ve metabolik amaçlar için sterollere ihtiyaç duyarlar. Ancak insektler, tüm artropodlar gibi kolesterol sentez aşamasında anahtar enzimlerden yoksun oldukları için sterol üretmezler ve bu ihtiyaçlarını dışardan karşılamak zorundadırlar (18).

İncektler kolesterole bağımlıdırlar, çünkü kolesterol olmadan gelişimlerini tamamlayamaz ve çoğalamazlar. Dolayısıyla dışarıdan kolesterol almak insektler için fizyolojik olarak bir zorunluluktur. Kolesterol oldukça hidrofobiktir. Taşıyıcı proteinler, kolesterolün hidrofobik kısmını sitoplazmanın veya hemolenfin sulu ortamından koruyarak kolesterolün verilmesine aracılık eder (19). Böceklerde kolesterolü hücre içi olarak orta bağırsak epitelinin lümenal tarafından bazal tarafına veya lipid damlacıklarından yağ gövdesindeki sitoplazmik membrana taşımak için bir sterol taşıyıcı proteine (SCP) ihtiyaç vardır. *Aedes* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda (20-22), hücre içi bir sterol taşıyıcı protein olan SCP-2'nin hücrel kolesterol transferinden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, biyoteknolojik mücadele kapsamında çeşitli zararlı ve/veya hastalık nakleden böcekler için aşı adayı veya hedef ilaç bölgelerinden birisi olarak nitelenen SCP-2 geninin *Anopheles sacharovi*'de moleküler karakterizasyonunun ilk kez gerçekleştirilmesi ve bu antijenin sineğin yaşam dönemlerindeki ekspresyon analizlerinin karşılaştırmalı bir şekilde ortaya konulması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### *Anopheles* Soyundaki Ergin Sivrisinek Örneklerinin Sahadan Toplanması

*Anopheles* soyundaki ergin sivrisinek örnekleri Mayıs-Ağustos 2021 tarihleri arasında Sultan Sazlığı ekosisteminden toplanmıştır. Belirlenen örnekleme alanlarında kan emmiş, yarı gravid veya gravid ergin *An. sacharovi* dişi örnekleri hayvan ahırları/barınakları, ev içleri, kiler, depo gibi uygun kapalı alanlarda gündüz saatlerinde bataryalı aspiratörler (2809D, BioQuip, ABD) ve hepa filtreli basit ağız aspiratörleri ve el fenerleri yardımıyla toplanmıştır (23). Örnekler küçük sivrisinek kafeslerine aktarılmış ve içerisinde buz aküleri bulunan arazi tipi taşınabilir buzluklara aktararak laboratuvara taşınmıştır. Örneklerin taşınma sırasında ölüm oranını azaltmak için buzluklar içerisine ayrıca nemli bez parçaları konulmuş, nemli ve serin bir ortamda taşınmaları sağlanmıştır.

### *Anopheles sacharovi*'nin Morfolojik ve Moleküler İdentifikasyonu, İncektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi

#### Morfolojik teşhis

İncektaryuma getirilerek uygun kaplar içerisinde yumurtlamaları sağlanan tüm dişiler ayrılmış ve stereo-mikroskop altında ergin ve yumurta morfolojisine göre teşhis anahtarı ile (24,25) tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir. *Anopheles sacharovi* dişi örneklerinin diğer grup örneklerine göre kanat lekelerinin daha az belirgin olması, scutumun soluk kahverenginde olması, sucutumda soluk doğrusal bir şeritin bulunmaması ve kanat ucu saçaklarının tek düze siyah olması gibi morfolojik karakterleri ile *An. maculipennis* grubunun diğer türlerinden (*An. maculipennis* s.s., *An. melanoon*, *An. messeae*) mikroskop ile ayrılması ve teşhis edilmesi mümkündür. Yumurtaların desenlenme biçimleri ve yumurta yüzgeçlerinin bulunma yerleri ve biçimleri ülkemizdeki *An. maculipennis* grubu türlerin ayrımında doğru sonuçlar vermektedir. *An. sacharovi*'nin yumurta deseni özellikleri diğer *An. maculipennis* grubu türlerinkinden farklıdır ve belirgin bant profilleri veya desenleri yoktur. Yumurtlayan ergin dişi örnekler PBS içerisinde en az üç kez yıkanarak kod numarasıyla birlikte -80 °C'lik derin dondurucuya total RNA izolasyonunda kullanılmak üzere alınmıştır. Derin dondurucuya alınmadan önce her örneğin bacakları ayrılarak içerisinde %96'lık etanol bulunan ayrı steril mikrosantrifüj tüplerine moleküler teşhis için DNA izolasyonu amacıyla alınmıştır. Morfolojik teşhis sonucu *An. sacharovi* olarak teşhis edilen örneklere ait yumurtalar ise gelişim dönemlerinin eldesi için incektaryumda yetiştirme prosesine alınmıştır.

#### Moleküler teşhis

Ergin dişi ve yumurta morfolojisine göre *An. sacharovi* olarak teşhisi sağlanan örnekler, tür teşhislerinin konfirmasyonu için moleküler analizlere alınmıştır. Etanol bulunan mikrosantrifüj tüplerine alınan bacaklardan genomik DNA izolasyonu, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler için gDNA izolatları, *An. sacharovi*

ITS-2 (26,27) gen bölgesininin 180 bp'lik fragmentini spesifik olarak amplifiye eden primerlerle polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) analiz edilmiştir. PCR analizleri sonrası, hedef büyüklükteki ITS-2 gen bölgesi ampikonları ayrıca PCR primerleri ile sekans analizine tabii tutulmuş ve tür teşhisleri elde edilen nükleotid dizilerinin GenBank veritabanındaki referans izolatlarla birlikte hizalama analizleri yapılarak konfirme edilmiştir.

### **İnsektaryumda Gelişim Dönemlerinin Elde Edilmesi**

*An. sacharovi* olarak teşhis edilen toplam 50 dişi sivrisinek örneğine ait yumurtalar larva 1 dönemi çıkana kadar buldukları kaplar içerisinde takip edilmiştir. Birinci dönem larvaların çıkışını takiben tüm larvalar geniş ağızlı pipetler yardımıyla dikkatli bir şekilde gelişim kaplarına aktarılmıştır. Larval besleme sürecinden önce 240 (3 tekrar oluşturmak üzere) adet L1 SCP-2 geninin karakterizasyonu ve ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere ayrılarak üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında -80 °C'lik derin dondurucuya konulmuştur. *An. sacharovi*'nin insektaryumda yetiştirilmesi ve gelişim dönemlerinin sağlanmasında ilgili referans protokoller takip edilmiştir (28,29). Gelişim dönemleri için insektaryum ortamının gerekli optimum sıcaklık, nispi nem ve fotoperiyot koşulları; 26-30 °C, %70±10 nispi nem ve 12saat:12saat aydınlık:karanlık fotoperiyot şeklinde ayarlanmıştır. Larval gelişim süreci takip edilerek yaklaşık 10-14 günde (30) (Yumurta-L1: 2-3 gün; L1-L2: 2-3 gün; L2-L3: 2-3 gün; L3-L4: 3-4 gün; L4-Pupa: 3-4 gün; Pupa-Ergin: 2-3 gün) pupaya dönüşen örneklerden L1, L2, L3, L4 ve pupa dönemleri için ilgili zaman aralıklarında SCP-2 geninin karakterizasyonu ve ekspresyon analizleri amacıyla sırasıyla 240, 180, 120, 60 ve 15 (3 tekrar oluşturmak üzere) (31) örnek ayrılarak üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında -80 °C'lik derin dondurucuya konulmuştur. Larval besleme kaplarında gelişen pupalar küçük ve geniş ağızlı pipetler aracılığıyla toplanarak erginleşme kaplarına alınmış ve bu kaplar büyük yetiştirme kafesine aktarılmıştır. Yaklaşık 2-3 gün içerisinde pupadan çıkan ergin sinekler, büyük kafes içerisinde pamuklara emdirilmiş %10'luk şeker çözeltisi ve ayrıca çeşitli bitki öz sularıyla yaklaşık 2 gün beslenmeleri yapılmıştır. Takiben ergin erkek ve dişilerden bireysel olarak ayrılan üçer örnek üç kez PBS'den geçirilmiş ve sonrasında SCP-2 geninin karakterizasyon ve ekspresyon analizleri amacıyla -80 °C'lik derin dondurucuya konulmuştur.

### **SCP-2 Geninin Karakterizasyonu ve Ekspresyon Analizleri**

#### **Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi**

SCP-2 geninin moleküler karakterizasyonu amacıyla 50 adet dişi *An. sacharovi* örneğinden 7'si kullanılmıştır. Ayrıca her gelişim dönemi için oluşturulmuş üç replikasyondan birisi moleküler karakterizasyon çalışmasına dahil edilmiş ve böylece toplam 14 izolata ait total RNA'lar sekans analizleri için kullanılmıştır. Ekspresyon analizleri için insektaryumda yetiştirilen tüm gelişim dönemlerine ait örnekler kullanılmıştır. Sahadan toplanan ergin dişilerden bireysel total RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) ile gerçekleştirilmiş, insektaryum hattından ise ilgili gelişim dönemlerine ait belirtilen sayıda örneği içeren havuzlar oluşturulmuş ve total RNA izolasyonuna alınmıştır. Total RNA izolatlarından cDNA elde etmek için iScript cDNA Sentez Kiti (Bio-Rad) protokolü uygulanmıştır. Ekstrakte edilen RNA'ların miktarı, NanoDrop spektrometresi kullanılarak analiz edilmiş ve reaksiyon başına

100 ng RNA ilave edilmiştir. cDNA sentezi, ticari kit protokolüne göre termal döngü 25 °C'de 5 dk, 46 °C'de 20 dk, 95 °C'de 1 dk ve 4 °C'de soğutma olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Termal döngü protokolünün tamamlanmasından sonra örneklere ait elde edilen cDNA'lar kullanılabileceği kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. SCP-2 geninin *An. sacharovi* dişi nesillerinin tükrük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusu gibi organlarında ekspresyon düzeylerinin araştırılması amacıyla insektaryum hattından elde edilen toplam 30 ergin dişiye ait ilgili dokular steril olarak diseke edilmiş ve her doku 10'arlı olarak tüplere yerleştirilmiş ve üç replikasyonun oluşumu sağlanmıştır.

### **SCP-2 geninin amplifikasyonu ve sekanslanması**

Elde edilen cDNA kalıplarında SCP-2 gen bölgesinin amplifiye edilmesi için diğer bazı *Anopheles* ve *Culex* türlerine ait ilgili gen sekansları üzerinde optimum özellikte primer dizaynı gerçekleştirilmiş ve sonrasında SCP-2 geninin 216 bp kısmını çoğaltan SCP76F (5'-GTGCAGCAGATSTACAAGTTC-3') ve SCP-291R (5'-CTCAACCTGTCCCTCCACRT CSAG-3') primerleri sentezletilmiştir. PCR reaksiyonları 25 µL final konsantrasyonda hazır kullanımlık Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (12,5 µL) (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM her bir primer (1,3 µL) ve 10-20 ng kalıp cDNA (2 µL) olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler C1000 Touch thermalcyclus cihazına (BioRad) yerleştirilerek, termal profil 95 °C'de 2 dk; 35 siklus 95 °C'de 30 sn, 57 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 1 dk; 72 °C'de 10 dk olarak ayarlanmış ve amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin her birinden 5 µL alınıp 130 V'de 30 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. PCR analizleri sonrası, SCP-2 gen bölgesi ampikonları uygun konsantrasyonda hazırlanarak PCR primerleri ile birlikte MacroGen Europe firmasında çift yönlü olarak sekanslatılmıştır.

### **Nükleotid ve amino asit sekanslarının karakterizasyonu**

Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 2022.1.1 yazılımı (<https://www.geneious.com>) ile forward ve reverse dizilimler DeNovo Assamble kullanılarak contig analizi yapılmış ve ilgili gen için final konsensus dizilimler ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut diğer sivrisinek ve yakın taksonlara ait SCP-2 sekanslarıyla Geneious yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid ve aminoasit farklılıkları ortaya çıkarılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturulmasında maximum likelihood (ML) analizi uygulanmıştır. Sekans evrimi için en uygun değişim modeli jModelTest v.0.1.1'de (32) belirlenmiştir. En düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) skoru gösteren GTR+I modeli filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmıştır. ML analizi Geneious yazılımı üzerinden PhyML plugini kullanılarak yapılmıştır. ML analizleriyle oluşturulan ağacın güvenilirliği 1,000 tekrarlı Bootstrap testi ile gerçekleştirilmiştir. İzolatlara ait amino asit dizilimleri; protein yapısı yönünden analiz edilmiştir. SCP-2 proteinin transmembran bölgelerindeki amino asit dizilimlerinin sinyal peptid analizleri ve dizilimlerdeki tahmini antijenik peptidlerin varlığı Geneious yazılımı üzerinden EMBOSS Protein Analysis 1.0 plugin yazılımı kullanılarak yapılmıştır. *An. sacharovi* SCP-2 proteininin transmembran sarmallarının yapısı



aynı yazılım üzerinden Transmembrane Prediction Tool 0.9 ile araştırılmıştır. İzoelektrik nokta ve proteinin tahmini moleküler ağırlığı ExPASy programı ile hesaplanmıştır.

### SCP-2 Geninin Ekspresyon Analizleri

#### İstatistiksel Analiz

SCP-2 geninin *An. sacharovi*'nin farklı gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyon analizleri kantitatif reverse transkripsiyon-gerçek zamanlı-PCR ile gerçekleştirilmiştir. SCP-2 geninin, *An. sacharovi* laboratuvar hatlarından elde edilen larva (1,2,3,4 instar larvalar), pupa ve ergin dönemleriyle ergin dişilerin tükürük bezi, orta bağırsak ve abdomen karkasları gibi dokularında transkripsiyonel düzeylerinin belirlenmesi için analizler gerçekleştirilmiştir. SCP-2 proteinini kodlayan hedef gen bölgesinin bütün olarak amplifikasyonu amacıyla sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak karakterize edilen gen bölgesi sekanslarından sybergreen tabanlı qPCR için genetik yazılımlarla optimum spesifik primer dizaynı yapılmıştır. Dizayn edilen SCP-2 gen bölgesi için AsacSCP-2sybrF (5'-TTCCGCATCCAGCAGAAC-3') ve AsacSCP-2sybrR (5'-CGAACATGATCTCATCGTCCAT-3') primerleri qPCR analizleri için standardize edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Sisteminde (BioRad) sybergreen tabanlı olarak gerçekleştirilip her örnek üç tekrar çalışılmıştır. Floresans okumaları her siklustan sonra 62 °C'de alınarak, PCR ürünlerinin identikliğinin konfirmasyonu için melting curve analizleri gerçekleştirilmiştir. mRNA düzeyleri, Aktin (AdrtACTF2- 5'-TCTGACCGACTACCTGAT-3' ve AdrtACTR2 5'-CATCTCTGCTCGAAGTC-3') ve Ribozomal S17 (S17F-5'-GGGTCGTGTACGTACCAAGACG-3' ve S17R2 5'-CATAGTTATCGCGACGCTCACG-3') referans genleri eş zamanlı kullanılarak komperatif  $\Delta\Delta Ct$  metodu ile normalize edilmiştir (33,34). Normalize edilmiş mRNA düzeyleri, jenerasyon bazında farklı gelişim evreleri ile ergin dişilerden izole edilen dokular arasında Student's t-test ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

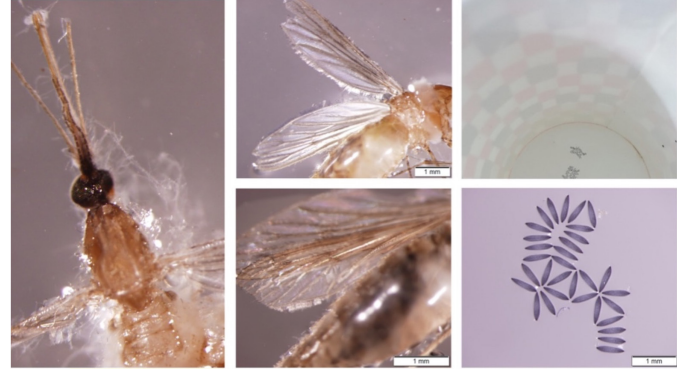
## BULGULAR

### *Anopheles sacharovi* Saha Örnekleri ve Morfolojik İdentifikasyon

Sahadan toplanan 283 adet dişi *Anopheles* örneklerinden 50 sivrisinek yumurtlatma prosesine alınmıştır. Yumurtlayan *Anopheles* dişi nesiller stero-mikroskop altında incelenmiş ve *An. maculipennis* grubunun diğer türlerinden (*An. maculipennis* s.s., *An. melanoon*, *An. messeae*) kanat lekelerinin daha az belirgin olması, scutumun soluk kahverenginde olması, scutumda soluk doğrusal bir şeritin bulunmaması ve kanat ucu saçaklarının tek düze siyah olması gibi morfolojik karakterleri ile *An. sacharovi* olarak teşhis edilmiştir (Şekil 1). Ayrıca her bir dişi için elde edilen yumurtalar morfolojik olarak incelenmiş ve yumurtaların desenlenme biçimleri ve yumurta yüzgeçlerinin bulunma yerleri ve biçimleri ile *An. sacharovi* teşhisi doğrulanmıştır. Yumurtaların bu özellikleri, elde edilen tüm yumurtaların *An. sacharovi* dişilerine ait olduğunu göstermiştir (Şekil 1).

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

Morfolojik identifikasyonla *An. sacharovi* olarak teşhis edilen ve yumurtaları insektaryumda gelişmeye alınan toplam 50 adet dişi örneğin ayrılan bacaklarından elde edilen genomik DNA izolatlarının *An. sacharovi* spesifik ITS-2 PCR analizleri sonucu



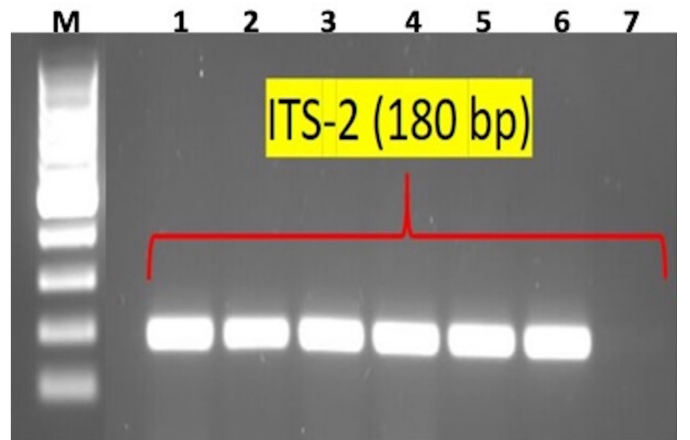
Şekil 1. *Anopheles sacharovi* ergin dişi ve yumurtaları (orijinal)

agaroz jel üzerinde hedef büyüklükte (180 bp) ampliconlar belirlenmiştir (Şekil 2). Sekans analizi için tüm izolatları ait ampliconların PCR primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanması sonucu izolatları ait forward ve reverse kromotogramlar Geneious 2020.1.1 yazılımında *de novo* assemble ile işlenerek kalite skoru yüksek konsensus dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen tüm nükleotid sekansların birbirine %100 benzer olduğu görülmüştür. Yapılan blast analizi sonucunda izolatları ait ITS-2 nükleotid sekansının GenBank veritabanında kayıtlı diğer *An. sacharovi* sekanslarıyla yüksek düzeyde benzer olduğu belirlenmiş ve böylece çalışmaya dahil edilen toplam 50 dişi *An. sacharovi* neslinin tür konfirmasyonları gerçekleştirilmiştir.

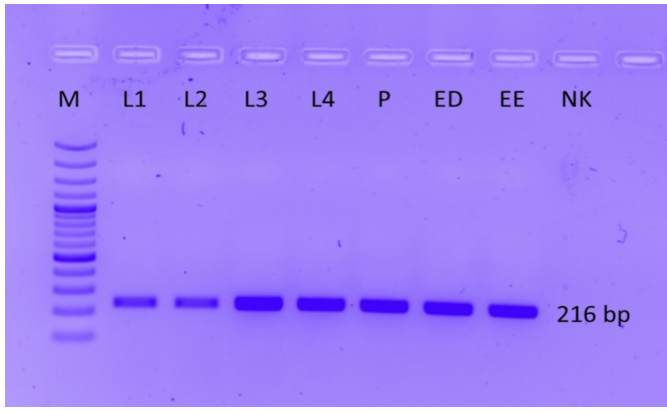
### *An. sacharovi* Nesillerinde SCP-2 Geninin Moleküler Karakterizasyonu

#### SCP-2 geninin amplifikasyon sonuçları

Çalışma kapsamında morfolojik ve moleküler identifikasyonları sağlanan sahadan izole edilmiş ve yumurtaları yetiştirmeye alınmış toplam 7 ergin dişi ile insektaryumda gelişim dönemleri için oluşturulmuş replikasyonlardan seçilen toplam 7 izolata (L1-L4, Pupa, ergin dişi, ergin erkek) ait cDNA'ların SCP-2 gen bölgesi yönünden PCR sonuçları Şekil 3'te verilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda agaroz jel üzerinde tüm izolatları için hedef büyüklükte (216 bp) ampliconlar belirlenmiştir.



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



**Şekil 3.** *An. sacharovi* nesillerine ait izolatların SCP-2 gen bölgesi yönünden PCR sonuçları  
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

### *An. sacharovi* Nesillerinde SCP-2 Geninin Nükleotid ve Amino Asit Sekans Karakterizasyonu Sonuçları

#### Nükleik asit sekans karakterizasyonu ve filogenetik analizi

Karakterizasyonu yapılan 14 izolata ait nükleotid sekanslarının hizalama analizlerinde 12'sinin %100 benzer olduğu, aynı nükleotid dizilimine sahip kalan 2 izolatın ise 183. bazda "T" yerine "C" değişimi gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerle karakterize edilen *An. sacharovi* SCP-2 sekansları sırasıyla TR\_Ansac1\_SCP-2 (GenBank aksesyon: OL957181) ve TR\_Ansac2\_SCP-2 (GenBank aksesyon: OL957182) izolat adlarıyla GenBank veritabanına kayıt edilmiştir. TR\_Ansac1\_SCP-2 ve TR\_Ansac2\_SCP-2 sekansları arasında %0,5 genetik farklılık saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen *An. sacharovi* SCP-2 gen bölgesi sekansları ile GenBank veritabanında kayıtlı *Anopheles*, *Aedes* ve *Culex* soylarındaki diğer bazı türlere ait SCP-2 gen bölgesi sekansları kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta izolatların tür ve soy bazlı olarak kümelenme gösterdiği ve monofiletik yapı sergilediği görülmüştür (Şekil 4). Çalışmamızda karakterize edilen *An. sacharovi* izolatlarının *Anopheles* kümesi içerisinde *An. stephensi* ve *An. funestus*'la birlikte alt küme oluşturduğu ve bu türlerin SCP-2 gen bölgesi sekanslarının birbirine daha yakın olduğu tespit edilmiştir. *Anopheles* soyu içerisinde incelenen türlere ait SCP-2 sekanslarının ortalama genetik farklılığı %10,45 belirlenmiştir.

#### SCP-2 geninin kodladığı proteinin in-silico analiz sonuçları

*Anopheles sacharovi* SCP-2 geninin in-silico analizleri sonucu SCP-2 gen sekansları içerisinde belirlenen tek nükleotid değişiminin amino asit diziliminde farklılığa yol açmadığı görülmüştür. *Anopheles sacharovi* SCP-2 genin 216 bp gen diziliminin kodladığı 72 aa zincirinin ifade ettiği proteinin 7,915 kDa büyüklüğünde olduğu, transmembran bölge içermeyip tamamen sitoplazmik karakterde olduğu belirlenmiştir (Şekil 5). SCP-2 geninin aminoasit zinciri içerisinde 13 ve 18 aa uzunluğunda ve antijenik skorları da sırasıyla 1,089 ve 1,143 olan 2 antijenik bölge bulunduğu görülmüştür. İlgili proteinin izoelektronik noktasının 4,26 olduğu ve pH 7'de aktivasyon değerinin de -4,08 olduğu tespit edilmiştir.

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

#### SCP-2 geninin qPCR amplifikasyon sonuçları

*An. sacharovi* SCP-2 geninin ekspresyon analizleri için dizayn edilen qPCR primerleri ile normalizasyon genleri Aktin ve ribozomal S17 için primerlerin hem gelişim dönemleri hem de dokulardan izole edilen total RNA izolatlarında etkin olarak çalıştığı ve spesifik melt pik gösterdikleri görülmüştür (Şekil 6).

#### Gelişim dönemlerinde SCP-2 geninin ekspresyon analizi

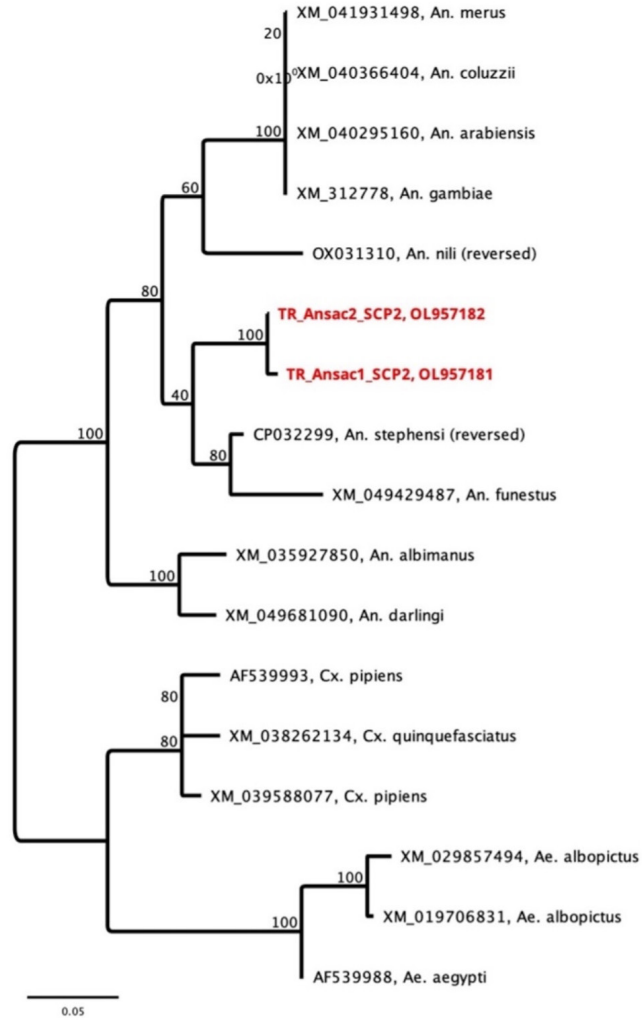
SCP-2 geninin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ekspresyon düzeyleri Şekil 7'de gösterilmiştir. qPCR'de ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2'nin en yüksek ergin erkeklerde ifade olduğu bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Tüm gelişim dönemleri arasındaki SCP-2 ekspresyon kat değişimi arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.

#### Ergin dişi dokularında SCP-2 geninin ekspresyon analizi

SCP-2 geninin *An. sacharovi* ergin dişi tükrük bezi, orta bağırsak (midgut) ve yağ (fat body) dokularındaki ekspresyon düzeyleri Şekil 8'de gösterilmiştir. qPCR'de ekspresyon analizleri sonucunda SCP-2'nin en yüksek fatbody'de ifade olduğu bunu sırasıyla midgut ve tükrük bezinin izlediği belirlenmiştir. Ergin dişi dokuları arasındaki SCP-2 ekspresyon kat değişimi istatistiksel olarak önemli ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.

### TARTIŞMA

SCP-2, her birinin sterol-bağlayıcı alan taşıdığı SCP-2, SCP-x, SCP-like-2, SCP-like-3, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase tip IV, ve stomatin'i içeren SCP-2 gen ailesinin bir üyesidir (35). SCP-2 geninin insan kromozom bandı 1p32.3'de yerleştiği ve 18 exon ve 123 amino asitten oluştuğu belirlenmiştir (36). SCP-x ve SCP-2'yi bir genin kodladığı ve SCP-x'in diğer bir transkripsiyon bölgesinden geldiği bilinmektedir. Her bir mRNA ortak bir C-terminus yapısı gösteren bir prekürsör 15 kDa pro-SCP-2 proteinini ve tüm-uzunlukta 58 kDa SCP-x proteinine transkribe olur. 58-kDa SCP-x kısmi post-translasyonel modifikasyon geçirir ve takiben tam fonksiyonel 13 kDa SCP-2 ve 46-kDa proteine ayrılır (37). Açıkça, 15-kDa pro-SCP-2'nin aktivitesi yoktur ve tamamen post-translasyonel olarak işlenmesiyle bir 2-kDa peptid ve bir matür 13-kDa SCP-2 oluşur (15). Günümüze kadar omurgalı SCP-2 genlerinin birçok özelliği ortaya çıkarılmış olup, SCP-2'nin inanlar, kurbağalar, zebra balıkları, köpekler, tavuk ve fareler arasında evrimesl olarak yüksek düzeyde korunmuş olduğu belirtilmektedir (36). Omurgalılarda SCP-2'nin sterol metabolizması ve steroid biyosentezinin önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir (37,38). Ayrıca omurgalılarda SCP-2'nin kolesterol, doymuş asitler ve doymuş acyl CoA'a bağlandığı da tespit edilmiştir (37,39). Ayrıca SCP-2'nin mitokondride kolesterolün steroidlere dönüştürülmesini mitokondri içine girişi artırarak hızlandırdığı belirlenmiştir (40,41). Buna ilaveten SCP-2'nin mikrozom ve plazma membranı arasında sterol döngüsünü artırdığı (42), ve kolesterol veya steroid biyosentezine dahil olan dokularda yüksek düzeyde SCP-2 ekspresyonu olduğu ortaya çıkarılmıştır (37,43).



**Şekil 4.** Çalışmada karakterize edilen *An. sacharovi* izolatları (kırmızı kalın karakter) ile *Anopheles*, *Culex* ve *Aedes* soylarındaki diğer bazı türlerin SCP-2 gen sekanslarına göre filogenetik ilişkisi. Nodeların önündeki rakamlar 1000 bootstrap desteğini göstermektedir. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini ifade etmektedir

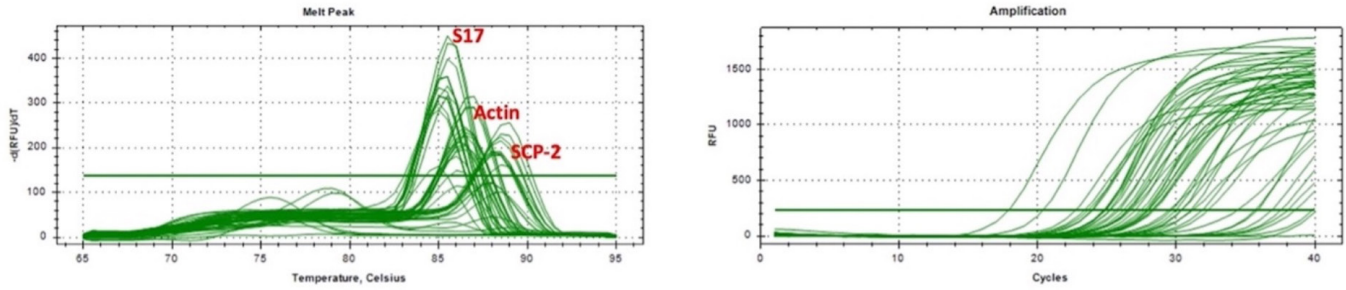


**Şekil 5.** *Anopheles sacharovi* SCP-2 amino asit sekansı ve in-silico özellikleri

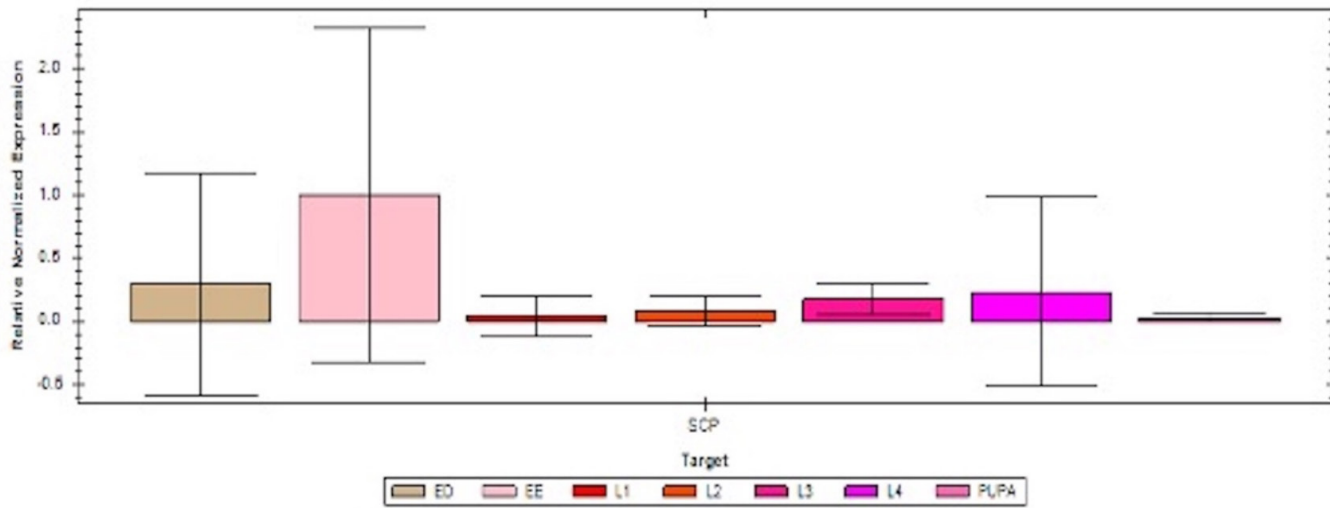
İnsketler kolesterol biyosentez yolağında önemli olan enzimlerden yoksundur ve bu sebeple kolesterolün hücre ve dokularda sentezi için uygun canlılar değildir (44). Bu faktör, insektlerin vücut yapıları ve büyüme hormonları gibi önemli biyobileşenler için zorunlu olan kolesterolün dış kaynaklardan sağlanmasını zorunlu kılmaktadır (45). Günümüze kadar *Anopheles*, *Aedes* ve *Culex* soylarındaki çeşitli sivrisinek türleri

üzerinde SCP-2 genin metabolik yolları ve çeşitli SCP-2 inhibitörü maddelerin sivrisinek gelişim parametreleri üzerine etkisi temelinde sivrisinek kontrolü için yenilikçi yaklaşımlarla araştırmaların yapıldığı görülmektedir (46). Ancak SCP-2 geninin farklı sivrisinek türlerinde moleküler yapısı ve gelişim dönemleri ile çeşitli vücut dokularındaki ifade düzeyleri üzerine araştırma açığı bulunduğu dikkati çekmiştir. Günümüze kadar Gen

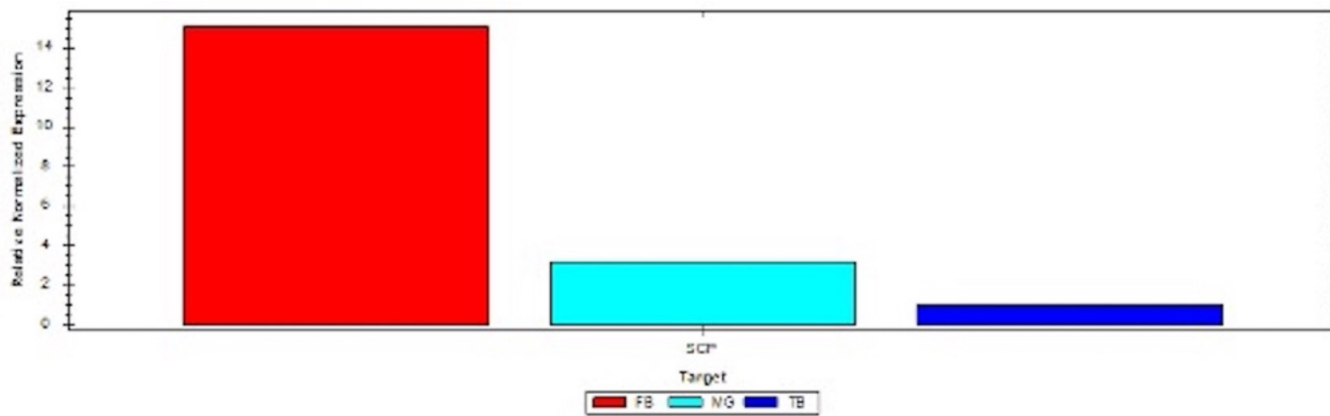




**Şekil 6.** SCP-2 geninin qPCR ekspresyon analizinde belirlenen amplifikasyon grafikleri ve SCP-2 ve normalizasyon genlerinin melt pik grafikleri  
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu



**Şekil 7.** SCP-2'nin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (ED: Ergin dişi; EE: Ergin erkek)



**Şekil 8.** SCP-2'nin *An. sacharovi* gelişim dönemlerindeki ifade düzeyleri (FB: Fat body, MG: Midgut, TB: Tükürük bezi)

veritabanı incelendiğinde SCP-2 geninin çeşitli *Anopheles* türleri ile *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* ve *Ae. albopictus* türlerinin genom ve/veya transkriptom çalışmalarında anotasyonlandığı görülmektedir. Diğer yandan GenBank veritabanında direkt SCP-2 geni üzerine odaklanan *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* ve *An. quadrimaculatus* türleri için gen sekansları bulunmakta olup bunlardan yalnızca *Ae. aegypti* üzerine bir çalışmanın yayımlandığı görülmektedir (19). Mevcut bu veriler dikkate alındığında çeşitli sivrisinek türlerinde SCP-2 geninin açık okuma çerçevesinin yaklaşık 335 bp uzunlukta olduğu ve 110 aa

uzunluğunda bir proteini kodladığı görülmektedir. Çalışmamızda Maculipennis grubun en önemli üyelerinden biri olan ve *P. vivax* için en etkin vektörlerden birisi olan *An. sacharovi* için SCP-2 geni ilk kez karakterize edilmiştir. Yukarıda bahsi geçen mevcut sivrisinek SCP-2 gen sekansları üzerinde yürüttüğümüz primer dizaynı çalışmalarında SCP-2 gen bölgesi ORF sekansını bütün olarak çoğaltan veya kapsayan bir fragmentin cDNA kalıbı içerisinde çoğaltılması mümkün olmamıştır. Ancak ilgili dizimler içerisinde gerçekleştirilen analizlerde diğer *Anopheles* türleri ve diğer soylardan türlere ait gen sekansları arasında

gerçekleştirilen analizlerle korunmuş bölgeler tespit edilmiş ve bu yönüyle de SCP-2 geninin değişken bölgeleri de içeren 216 bp fragmenti etkin olarak çoğaltılmıştır. SCP-2 gen bölgesi ORF sekansı çeşitli sivrisinek türlerinde 110 aa uzunluğunda ve 12.3 kDa büyüklüğünde bir proteini ifade etmekte olup çalışmamızda çoğaltığımız gen fragmenti bunun içerisinde 76 aa uzunluğunda ve yaklaşık 8 kDa büyüklüğünde bir proteini ifade ettiği in silico analizlerle gösterilmiştir. Sivrisineklerde SCP-2 ORF amino asit sekanslarının antijenite analizlerinde 5 antijenik bölge içerdiği, karakterize ettiğimiz *An. sacharovi* parsiyel amino asit sekansında diğer türlerin sekans bölgeleriyle de örtüşen 2 antijenik bölgenin bulunduğu görülmüştür. Ayrıca *An. sacharovi* SCP-2 amino asit sekansının ifade ettiği proteinin diğer sivrisinek türlerinde olduğu gibi transmembran bölge içermediği ve stoplazmik karakterde olduğu dikkati çekmiştir. Krebs ve Lan (19), karakterize ettikleri *Ae. aegypti* SCP-2 amino asit sekansının filogenetik analizinde, SCP-2'nin rat SCP-2'sine %30, memeli SCP-2'sinin sterol-transfer domainine %46 benzerlik gösterdiğini, ayrıca insan genomunda SCP-2-like geni (XM\_115847.1) ile %50, *An. gambiae* (EAA08376) ile %79 ve üç *Drosophila* geni CG11151 (AE003493) ile de %25-38 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar (19), SCP-2 gen sekansının *Ae. aegypti* nesilleri içerisinde yüksek düzeyde korunmuş olduğunu göstermişlerdir. Benzer olarak çalışmamızda sahadan izole edilmiş olan ergin dişi nesiller ve bunlardan elde edilen jenerasyonlardan alınan örnekleri içeren toplam 14 izolata ait SCP-2 nükleotid sekanslarının yüksek düzeyde korunmuş olduğu, yalnızca 2 izolatta 183. bazda tek nükleotid değişimi olduğu ancak bu değişiminde amino asit sekansında farklılığa yol açmadığı ve tüm zıolatların homolog amino asit dizilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada karakterize edilmiş olan *An. sacharovi* SCP-2 nükleotid sekansları ile GenBank veritabanında mevcut sınırlı sayıda diğer sivrisinek türlerine ait SCP-2 sekanslarının filogenetik analizinde SCP-2 sekanslarının tür ve soy bazlı olarak izolatları monofiletik kümelere yerleştirdiği görülmüştür. Bu sonuç SCP-2 geninin sivrisinek türleri içerisinde korunmuş yapı sergilediğine dair destekleyici kanıt sağlamıştır. Bunun yanında SCP-2'nin *Anopheles* türleri arasında %10,45 oranında genetik farklılık gösterdiği, bu farklılığın *Culex* türleri ile yaklaşık %23,0 *Aedes* türleri ile ise yaklaşık %29'a yükseldiği dikkati çekmiştir. Ayrıca SCP-2 gen bölgesi filogenetik analiz sonuçları *An. sacharovi*'nin *Anopheles* türleri içerisinde *An. stephensi*'ye genetik olarak daha yakın olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada ekspresyon analizlerinde SCP-2'nin *An. sacharovi*'nin tüm gelişim dönemleri ve ergin dişilerin tükrük bezi, orta bağırsak ve yağ dokusunda farklı düzeylerde ifade olduğu gösterilmiştir. Omurgalıların aksine insekt hücreleri kolesterolü, lipoproteinlerin reseptör aracılı endositozu yoluyla orta bağırsak ve yağ doku arasında transfer edemez (47). Hidrofobik yapısı sebebiyle kolesterol, hazır olarak hücre membranının dış yüzeyi içine doğru dağılır ve SCP-2 gibi proteinler ilgili molekülleri membrandan ayırır ve depolanacakları bölgeye ve metabolik yollarına teslim eder (48). *Ae. aegypti* SCP-2 proteini üzerine yapılan bir araştırmada (21), SCP-2'nin orta bağırsak epitelinde sitozol içinde lokalize olduğu ve overekspresyon sonucunda kolesterol seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir. Buna ilaveten, *Ae. aegypti* SCP-2 ekspresyonunun larval beslenme döneminde orta bağırsakta yüksek seviyede olduğu gösterilmiş (19), ve SCP-2'nin kolesterolün dönüştürülmesi için orta bağırsakta pyhtosterollerin işlenmesine dahil

olduğu belirtilmiştir (35). Nitekim araştırmamızda ergin dişi dokularında gerçekleştirdiğimiz ekspresyon analizlerinde *Ae. aegypti*'de araştırmacıların (19) elde ettikleri bulgulara paralel olarak orta bağırsakta SCP-2 ekspresyonu yüksek belirlenmiş ve tükrük bezine oranla yaklaşık üç kat daha yüksek düzeyde ifade olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan çalışmamızda ergin dişi dokularından en yüksek ifade düzeyi yağ dokusunda (fat body) belirlenmiş, SCP-2'nin tükrük bezi ve orta bağırsaktaki ifade düzeyinden sırasıyla yaklaşık 15 ve 5 kat daha yüksek ifade olduğu görülmüştür. Bu sonuç ergin dişilerde SCP-2'nin yağ dokusunda kolesterol metabolizmasının regülasyonunda önemli bir fonksiyona sahip olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Diğer yandan Krebs ve Lan (19), Northern ve dot blotting analizleri ile gerçekleştirdikleri ekspresyon analizlerinde 4. dönem *Ae. aegypti* larvalarında orta bağırsağa göre fat body de içeren vücut duvarında SCP-2'nin ifade düzeyini oldukça düşük belirlemişlerdir. Bu sonuç da göz önüne alındığında sivrisineklerin gelişim dönemleri boyunca kolesterol metabolizmasının regülasyonunda bağırsak epiteli dışındaki organ ve dokularda da SCP-2'nin önemli bir fonksiyona sahip olabileceği hipotez edilebilir. Çalışmamızda ayrıca *An. sacharovi*'nin tüm gelişim dönemlerinde SCP-2'nin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiş olup en yüksek ifade düzeyi ergin erkeklerde olduğu bunu sırasıyla ergin dişi, L4, L3, L2, L1 ve pupa dönemlerinin izlediği belirlenmiştir. Krebs ve Lan (19), *Ae. aegypti* üzerinde gerçekleştirdikleri SCP-2 ekspresyon analizlerinde metodoloji ve yöntem farklı olmakla birlikte çalışmamızda elde edilen sonuca paralel olarak 4. dönem larvadan pupaya geçiten sonra SCP-2 ifade düzeyinin oldukça düştüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar (19), pupadan çıkan ilk gün dişi ve erkeklerde SCP-2'nin eşit düzeyde eksprese olduğunu ancak 7. günde yalnızca dişilerde saptanabilir düzeyde transkripsiyon gözlemlediklerini belirtmişler, protein düzeyinin ise her iki cinsiyet için de saptanabilir olduğunu kaydetmişlerdir. Çalışmamızda SCP-2 ekspresyonu gen düzeyinde spesifik qPCR analizleri ile gerçekleştirilmiş olup insektaryumda yetiştirilen ve %10 şekerli su ile beslemeleri sağlanan ergin erkeklerde dişilere oranla yaklaşık 3,5 kat daha yüksek ifade düzeyi saptanmıştır. Bu sonuç ergin erkek bireylerin kolesterol metabolizmasında SCP-2 aracılı regülasyonun çok daha yüksek olabileceğine dair kanıtlar ortaya çıkarmış olmakla birlikte bu hipotezin ilgili transkripsiyon ve protein sentez yolları üzerine detaylı çalışmalarla aydınlatılması gerektiği düşünülmüştür.

## SONUÇ

Bu çalışma ile vektör potansiyeli yüksek olan *An. sacharovi* için kolesterolün hidrofilik ortama taşınmasında ve metabolize olmasında en önemli proteinlerden birisi olan ve bu yönüyle de özellikle yeni biyoteknolojik ilaç yaklaşımları için önemli bir hedef olarak nitelenen SCP-2'yi eksprese eden gen bölgesi ilk kez karakterize edilmiş ve ilgili sivrisineğin gelişim evreleri ve dokularındaki ekspresyonel farklılıklar ortaya konulmuştur. Çalışma ile SCP-2'nin farklı sivrisinek türlerinde genetik yapısı ve çeşitliliği üzerine mevcut bilgi birikimine katkı sağlanmış ve özellikle *Anopheles* soyu içerisinde korunmuş yapısı ile SCP-2'nin bu soy içerisindeki türlere karşı geliştirilecek yenilikçi mücadele yaklaşımlarında hedef bir protein olarak kullanılabilmesine dair destekleyici kanıtlar sağlanmıştır.



**\*Etik**

**Etik Kurul Onayı:** Sivrisinek materyali kullanıldığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

**Hasta Onayı:** Sivrisinek materyali kullanıldığı için hasta onayı alınmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

**\* Yazarlık Katkıları**

Konsept: S.A., Ö.D., A.Y., Dizayn: S.A., Ö.D., A.Y., Veri Toplama veya İşleme: S.A., Ö.D., A.Y., Analiz veya Yorumlama: S.A., Ö.D., A.Y., Literatür Arama: S.A., Yazan: S.A., Ö.D., A.Y.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar arasında bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Finansal Destek:** Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2021-11456 no'lu proje ile desteklenmiştir.

**KAYNAKLAR**

- Sedaghat MM, Linton YM, Nicolescu G, Smith L, Koliopoulos G, Zounos AK, et al. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. *Syst Entomol* 2003; 28: 241-56.
- Akner MM, Çağlar SS, Birecik, Beyşehir ve Çankırı bölgelerinde *Anopheles maculipennis* grup türlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanarak araştırılması. *Türkiye Parazit Derg* 2010; 34: 50-4.
- Alten B, Çağlar S, Özer N. Malaria and its vectors in Turkey. *European Mosquito Bulletin* 2000; 27-33.
- Günay F. Türkiye sivrisinek faunası üzerine DNA barkodlama yöntemiyle moleküler analizler. Hacettepe Univ. 2015.
- Simsek FM, Ulger C, Akner MM, Tuncay SS, Kiremit F, Bardakci F. Molecular identification and distribution of *Anopheles maculipennis* complex in the Mediterranean region of Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 2011; 39: 258-65.
- Jaenson TG, Lokki J, Saura A. *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and malaria in northern Europe, with special reference to Sweden. *J Med Entomol* 1986; 23: 68-75.
- Kasap H. Comparison of experimental infectivity and development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles sacharovi* and *An. superpictus* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 111-7.
- Romi R. *Anopheles labranchiae*, an important malaria vector in Italy, and other potential malaria vectors in Southern Europe. *European Mosquito Bulletin* 1999; 4: 8-10.
- Romi R, Sabatinelli G, Majori G. Could malaria reappear in Italy? *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 915-9.
- Abdel-Malek A. The Anopheline Mosquitoes of Northern Syria. *Bulletin de la Societe Entomologique d'Egypte* 1958; 42: 519-35.
- Berberian D. The Species of Anopheline Mosquitoes found in Syria and Lebanon. Their Habits, Distribution and Eradication. *J Palest Arab Med Assoc* 1946; 1: 120-46.
- Christophers S. A Summary of Recent Observations upon the Anopheles of the Middle East. *Indian J Med Res* 1920; 7.
- Zahar A. Review of the ecology of malaria vectors in the WHO Eastern Mediterranean Region. *Bull WHO* 1974; 50: 427.
- Ramsdale C, Snow K. Distribution of the genus *Anopheles* in Europe. *European Mosquito Bulletin* 2000; 1-26.
- Focks DA, Brenner RJ, Hayes J, Daniels E. Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 11-8.
- Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Publica* 1998; 4: 243-51.
- Kim MS, Wessely V, Lan Q. Identification of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors. *J Lipid Res* 2005; 46: 650-7.
- Jing X, Behmer ST. Insect sterol nutrition: physiological mechanisms, ecology, and applications. *Annu Rev Entomol* 2020; 65: 251-71.
- Krebs K, Lan Q. Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 2003; 12: 51-60.
- Blitzer E, Vyazunova I, Lan Q. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 2005; 14: 301-7.
- Lan Q, Massey RJ. Subcellular localization of the mosquito sterol carrier protein-2 and sterol carrier protein-x. *J Lipid Res* 2004; 45: 1468-74.
- Dyer DH, Vyazunova I, Lorch JM, Forest KT, Lan Q. Characterization of the yellow fever mosquito sterol carrier protein-2 like 3 gene and ligand-bound protein structure. *Mol Cell Biochem* 2009; 326: 67-77.
- WHO. World Health Organization Publications. *Int J Epidemiol* 1975; 4: 231.
- Schaffner E, Angel G, Geoffroy B, Hervy J, Rhaïem A, Brunhes J. The Mosquitoes of Europe. CD-ROM 2011.
- Sevgili E, Simsek FM. Distribution pattern and molecular identification of *Anopheles maculipennis* complex in eight river basins of Anatolia, Turkey. *North West J Zool* 2012; 8: 223-31.
- Kronefeld M, Werner D, Kampen H. PCR identification and distribution of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae) in Germany. *Parasitol Res* 2014; 113: 2079-86.
- Proft J, Maier WA, Kampen H. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol Res* 1999; 85: 837-43.
- Kasap H, Alptekin D, Kasap M, Güzel AI, Lüleyap U. Artificial bloodfeeding of *Anopheles sacharovi* on a membrane apparatus. *J Am Mosq Control Assoc* 2003; 19: 367-70.
- Kasap M, Kasap H. Laboratory colonization of *Anopheles sacharovi*, the principal vector of human malaria in Turkey. *Mosq News* 1983; 43: 498-9.
- CDC, 2022. Available from: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/anopheles.html> Accessed: 22.07.2022.
- Dzaki N, Ramli KN, Azlan A, Ishak IH, Azzam G. Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. *Sci Rep* 2017; 7: 43618.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25: 1253-6.
- Liew JW, Fong MY, Lau YL. Quantitative real-time PCR analysis of *Anopheles dirus* *TEP1* and *NOS* during *Plasmodium berghei* infection, using three reference genes. *PeerJ* 2017; 5: e3577.
- Nirmala X, Marinotti O, James AA. The accumulation of specific mRNAs following multiple blood meals in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 2005; 14: 95-103.
- Radek JT, Dyer DH, Lan Q. Effects of mutations in *Aedes aegypti* sterol carrier protein-2 on the biological function of the protein. *Biochemistry* 2010; 49: 7532-41.
- Xu C, Li H, Tang CK. Sterol carrier protein 2 in lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, molecular biology, and potential clinical implications. *Metabolism* 2022; 131: 155180.
- Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, et al. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res* 2001; 40: 498-563.
- Pfeifer SM, Sakuragi N, Ryan A, Johnson AL, Deeley RG, Billheimer JT, et al. Chicken sterol carrier protein 2/sterol carrier protein x: cDNA cloning reveals evolutionary conservation of structure and regulated expression. *Arch Biochem Biophys* 1993; 304: 287-93.

39. Stolowich NJ, Petrescu AD, Huang H, Martin GG, Scott AI, Schroeder F. Sterol carrier protein-2: structure reveals function. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 193-212.
40. van Noort M, Rommerts FF, van Amerongen A, Wirtz KW. Intracellular redistribution of SCP2 in Leydig cells after hormonal stimulation may contribute to increased pregnenolone production. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 60-5.
41. Xu TS, Bowman EP, Glass DB, Lambeth JD. Stimulation of adrenal mitochondrial cholesterol side-chain cleavage by GTP, steroidogenesis activator polypeptide (SAP), and sterol carrier protein2. GTP and SAP act synergistically. *J Biol Chem* 1991; 266: 6801-7.
42. Baum CL, Reschly EJ, Gayen AK, Groh ME, Schadick K. Sterol carrier protein-2 overexpression enhances sterol cycling and inhibits cholesterol ester synthesis and high density lipoprotein cholesterol secretion. *J Biol Chem* 1997; 272: 6490-8.
43. Baum CL, Kansal S, Davidson NO. Regulation of sterol carrier protein-2 gene expression in rat liver and small intestine. *J Lipid Res* 1993; 34: 729-39.
44. Grieneisen ML. Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem Mol Biol* 1994; 24: 115-32.
45. Bellés X, Martín D, Piulachs MD. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol* 2005; 50: 181-99.
46. Perera H, Wijerathna T. Sterol carrier protein inhibition-based control of mosquito vectors: Current knowledge and future perspectives. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2019; 2019: 7240356.
47. Yun HK, Jouni ZE, Wells MA. Characterization of cholesterol transport from midgut to fat body in *Manduca sexta* larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 2002; 32: 1151-8.
48. Stremmel W, Pohl J, Ring A, Herrmann T. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids* 2001; 36: 981-9.