

Mesobuthus gibbosus Akrep Venomundan Potasyum İyon Kanalına Etkin Toksin
Saflaştırılması

Gamze Dalbudak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Ocak 2018

Purification Effective Toxin of Potassium Ion Channel From Scorpion *Mesobuthus*
gibbosus

Gamze Dalbudak

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

January 2018

Mesobuthus gibbosus Akrep Venomundan Potasyum İyon Kanalına Etkin Toksin
Saflaştırılması

Gamze Dalbudak

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Figen Çalışkan

Ocak 2018

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Gamze Dalbudak'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Mesobuthus gibbosus* Akrep Venomundan Potasyum İyon Kanalına Etkin Toksin Saflaştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman :Doç. Dr. Figen Çalışkan

İkinci Danışman : —

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye :Prof. Dr. Adnan Ayhancı

Üye :Doç. Dr. Figen Çalışkan

Üye :Doç. Dr. Emel Ergene

Üye :Doç. Dr. İlknur Dağ

Üye :Yrd. Doç. Dr. Ferhan Korkmaz

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Figen Çalışkan danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Mesobuthus gibbosus* Akrep Venomundan Potasyum İyon Kanalına Etkin Toksin Saflaştırılması” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 9.01.2018

Gamze Dalbudak

ÖZET

Mesobuthus gibbosus, Balkanlar ve Anadolu’da endemik bir akrep türü olarak bilinmektedir. *Mesobuthus gibbosus*’a ait peptid toksinler akrep zehirlenmelerinde medikal bir öneme sahiptir. Bu çalışma; *Mesobuthus gibbosus* venomunda bulunan potasyum kanalına etkili peptid toksinlerin izolasyonu, yapı ve proteomik analiz çalışmaları üzerine odaklanmıştır.

Bu amaç ile *Mesobuthus gibbosus*’a ait ham venom Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi’nde (HPLC) bileşenlerine ayrıştırılmıştır. Elde edilen saf peptidin Kütle Spektrometre analiz sonucuna göre 3269,15 Da. molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Saf peptid bileşeninin PPSQ-Edman Degradasyon metodu uygulaması ile 3 disülfid köprüsü içeren ve toplam 29 amino asit dizilimine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen dizilimin, BLAST analiz sonucuna göre *Mesobuthus eupeus* akrep türüne ait alfa potasyum kanal bloker dizilimi ile 2 farklı amino asit içerdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada birincil yapısı belirlenen saf peptidin, fonksiyonlarının aydınlatılması ile biyomedikal araştırmalarda ve ilaç tedavi uygulamalarında yeni ve alternatif bir molekülün geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: *Mesobuthus gibbosus*, akrep toksini, potasyum kanalı.

SUMMARY

Mesobuthus gibbosus known as a type of endemic scorpion to the Balkans and Anatolia regions. The peptide toxins of *Mesobuthus gibbosus* have been described as medically relevant in the scorpion envenomations. This study was focused on the isolation, structure and proteomic analysis of the peptide toxins of *Mesobuthus gibbosus* which, some of them, may have influence in the potassium channel.

For this purpose, the components of *Mesobuthus gibbosus* crude venom were separated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). According to the result of the mass spectrometry analysis, the molecular weight of the pure peptide has been identified to 3269,15 Da. The pure peptide was determined with total sequence of 29 amino acids, including 3 disulfide bridges discovered with the PPSQ-Edman Degradation method. The sequence was compared with a potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus*, using the BLAST. According to BLAST analysis, the differences between both peptide sequencers were only two amino acids.

In this study has expected to provide the development of the alternative molecule for biomedical research and drug treatment applications of the pure peptide which determined the primary structure.

Keywords: *Mesobuthus gibbosus*, scorpion toxin, potassium channel

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince danışmanım olan gerek bilimsel gerek sosyal yaşamımda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak hayatıma yön veren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN'a sonsuz teşekkürler.

Deneysel çalışmalarım sırasında kullandığım akrelerin toplanması ve bakımında değerli katkıları olan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan ÇALIŞKAN'a; Yüksek lisans eğitimimin 2. yılında Mevlana Değişim Programı kapsamında gittiğim Ulusal Meksika Otonom Üniversitesi (UNAM), Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Tıp ve Biyoproses Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Lourival D. Possani POSTAY'a laboratuvar ekibinden; benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşan Sayın Dr. Fernando ZAMUDIO'ya, Sayın Fredy CORONAS'a ve Sayın Timoteo OLAMENDİ'ye; tanıştığım günden beri desteklerini hep hissettiğim değerli arkadaşlarım Biyolog Sebahat OLUÇAY ve Uzman Moleküler Biyolog Volkan ULUTAŞ'a; eğitim hayatım boyunca ve bugüne kadar aldığım her kararda desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen değerli ailem, annem Ayşegül DALBUDAK'a, babam Tuncer DALBUDAK'a, abim ve eşi Gökçe-Aslı DALBUDAK'a, hayatıma sevinç katan ailemizin en küçük üyesi Doruk DALBUDAK'a ve en az onun kadar varlığı ile beni mutlu eden Pedro MARTIN REYES'e; bu süreçte yanımda olan adını sayamadığım diğer bütün değerli arkadaşlarıma saygı ve sevgiyle sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Akrep Anatomisi ve Yaşam Alanları	4
2.2. Dünya Akrep Faunası	5
2.3. Türkiye Akrep Faunası	6
2.4. <i>Mesobuthus gibbosus</i> Türünün Türkiye’deki Dağılımı	6
2.5. Akrep Venomları ve Halk Sağlığı	7
2.6. Akrep Venomunda Bulunan Peptid Toksinler ve Etki Mekanizmaları	9
2.6.1. Sodyum kanalına etkili akrep toksinleri	10
2.6.2. Potasyum kanalına etkili akrep toksinleri	10
2.6.3. Kalsiyum kanalına etkili akrep toksinleri	12
2.6.4. Klor kanalına etkili akrep toksinleri	13
2.6.5. Disülfid köprüsü içermeyen akrep toksinleri	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Kullanılan cihazlar	14

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	15
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Akreplerin bakımı	16
3.2.2. Akrep venomlarının eldesi ve hazırlanması	17
3.2.3. Venom peptidlerinin eldesi ve protein miktarının belirlenmesi	17
3.2.4. Ham venomun HPLC’de saflaştırılması ve peptidlerin eldesi	17
3.2.5. Kütle spektrometresi ile molekül ağırlığının belirlenmesi	18
3.2.6. İndirgenme ve alkalizasyon çalışmaları.....	18
3.2.7. Peptid amino asit diziliminin belirlenmesi	18
3.2.8. Peptid diziliminin biyoinformatik veri tabanlarında karşılaştırılması	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
4.1. Ham Venomun Eldesi ve Sonuçlar	20
4.2. Ham Venomun HPLC’de Saflaştırma Sonuçları	20
4.3. Kütle Spektrometresi ile Molekül Ağırlığının Belirlenme Sonuçları	22
4.4. İndirgenme ve Alkilasyon Çalışmaları Sonuçları	28
4.5. İndirgenme ve Alkilasyon sonrası Peptid Dizi Belirleme Çalışma Sonuçları	29
4.6. Filogenetik Analiz.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	31
KAYNAKLAR DİZİNİ	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Temel akrep morfolojisi.....	4
2.2. <i>Mesobuthus gibbosus</i> akrebinin Türkiye'deki dağılımı.....	6
2.3. Skorpionizimden etkilenen ülkelerin zehirlenme ve ölüm sayıları.....	9
3.1. a. <i>Mesobuthus gibbosus</i> akrep türüne ait görüntü b. <i>Tenebrio molitor</i> larvasına ait görüntü.....	16
4.1. <i>Mesobuthus gibbosus</i> ham venom kromatogramı.....	20
4.2. a) 17,05 dak. b) 17,53 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu	23
4.3. a) 19,10 dak. b) 22,30 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu	24
4.4. a) 28,10 dak. b) 32,50 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu	25
4.5. a) 35,61 dak. b) 36,50 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu	26
4.6. a) 42,20 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu	27
4.7. Alkilasyon ve indirgeme çalışmaları sonrası gerçekleştirilen kromatografik ayırım	28
4.8. 20,68 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu.....	29
4.9. Elde edilen peptidin BLAST sonucu benzer peptidler ile karşılaştırma sonuçları.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Akrep sokması sonucu oluşan enflamasyon tedavisinde kullanılan antivenomlar	8
4.1. <i>Mesobuthus gibbosus</i> türü akrebin ham venomundan elde edilen fraksiyonlar	21
4.2. Seçilen fraksiyonların moleküler ağırlık sonuçları	22



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler **Açıklama**

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
κ	Kappa
δ	Delta
λ	Lamda
ε	Epsilon

Kisaltmalar **Açıklama**

HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
V	Volt
Da	Dalton
vd	Ve diğerleri
cDNA	tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
dak.	Dakika
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
A	Absorbans
kV	Kilowatt
M	Molar
pH	Hidrojenin gücü
nm	Nanometre
mm	Milimetre
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
KTx	Potasyum kanal toksinleri
ERG	Ether-à-go-go ailesi kanalı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Aminoasit Kısaltmaları**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
A	Alanin
R	Arjinin
N	Asparajin
D	Aspartik Asit
C	Sistein
E	Glutamik Asit
Q	Glutamin
G	Glisin
H	Histidin
I	Izolösin
L	Lösin
K	Lizin
M	Metiyonin
F	Fenilalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Tireonin
W	Triptofan
Y	Tirozin
V	Valin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akrepler, “yaşayan fosiller” olarak orta silüriyen döneminden (450 milyon yıl önce) günümüze kadar gelen karasal eklembacaklılardır (Lourenço, 2016; Martin-Eauclaire vd., 2016). Savunma ve avlanma için kullandıkları venomları, biyolojik açıdan aktif peptid bileşenler içermektedir. Bu peptidler insanlarda sempatik uyarım ile katekolaminler üzerindeki aktivasyonu sonucu; arteriyel hipertansiyon, taşikardi, bilinç kaybı, pulmoner ödem, kalp yetmezliği gibi ölüm ile sonuçlanabilen bir dizi fizyolojik olaylar meydana getirmektedir (Isbister ve Bawaskar, 2014).

Proteomik çalışmalar sonucu venom peptid karışımlarının, hücreler, dokular ve organizmalar üzerinde nörotoksik ve sitotoksik etkiler dışında; antimikrobiyal, antiviral antimalaryal, immünsüpresif ve antikanser aktivite de gösterdikleri bilinmektedir (Luna-Ramirez, 2016). Ayrıca; iyon kanallarına olan özgün bağlanma yetenekleri ile kanal faaliyetlerini istenen şekilde modüle etmede alternatif ligandlar olarak kullanılmaktadır. *M. gibbosus*’a (*M.gibbosus*) ait ham venom *in vitro* sitotoksik ve jelatinolitik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir. Venomun sitotoksik etkileri, 5RP7 (H-ras ile aktive fare fibroblastları), ve A549’un (insan adenokarsinomik hücreleri) hücre hatlarına uygulanması ile hücre çoğalmasında önemli ölçüde azalma olduğu rapor edilmiştir (Incesu vd., 2005). *Buthus martensii* türüne ait venom bileşeni, malignant glioma kültür hücrelerinde iyon kanallarını etkileyerek apoptosizi uyaran potansiyel ligandlar içermektedir (Wang ve Ji, 2005). Akrep venomlarında bulunan farklı peptidlerin yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılması medikal araştırmalarda ve iyiletimde yeni moleküler araçların geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Türkiye’de akrep çeşitliliğinin çok olmasına karşın venomlarının yapı aydınlatma çalışmaları çok azdır. Bugüne kadar ülkemiz akreplerinden; *Androctonus crassicauda* türü akrep venomunun biyokimyasal karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar ile Acra1’den Acra8’e kadar adlandırılan 8 peptid, *Buthacus macrocentrus* türü akrep venomundan Bu1 ve *M.gibbosus* türü akrebin transkriptomik çalışmaları ile MegKTx1, MegKTx2 ve MegKTx3 peptidleri izole edilmiştir (Caliskan, 2006; Caliskan, 2012).

Bu çalışmanın amacı, Balkanlar ve Anadolu’da geniş bir yayılışa sahip olan *M.gibbosus*’a ait toksik bileşen içeriğinin aydınlatılmasıdır. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı’nda var olan *M.gibbosus* türü akreplerden elektriksel sağım yöntemi ile ham venom elde edilmiştir. Ham venomun peptid bileşenlerinin belirlenmesi için kromatografik çalışmalar yapılmıştır. Kromatografi çalışmaları sonucu 19,10 dakika alıkonma süresine sahip peptid bileşenin moleküler ağırlığı belirlenmiştir. Moleküler ağırlığı belirlenen saf peptidin birincil yapısı aydınlatılmıştır. Çalışmalarımız sonucu *M.gibbosus* akrebine ait peptid bileşeni saf olarak elde edilmiştir. Biyoinformatik çalışmalar ile peptidin potasyum kanalına özgün bir dizilimine sahip olduğu belirlenmiştir. Akrep toksin peptidlerin iyon kanallarına spesifik bağlanan moleküller olması nedeni ile bu peptidin iyon kanalları araştırmalarında alternatif bir molekül olarak yer alması beklenmektedir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Akrep venomlarının kompleks yapılı sıvı karışımları; mukus, inorganik tuzlar, düşük molekül ağırlıklı organik moleküller, enzimler, nükleotidler, aminler, sitotoksik ve nörotoksik peptidler içermektedir. Akrep toksin peptidleri farklı organizmalara karşı gösterdikleri etkinliklere göre; memelilere etkin toksinler, böceklere etkin toksinler ve kabuklulara etkin toksinler olarak sınıflandırılmaktadır. Moleküler büyüklüklerine göre sınıflandırıldıklarında uzun zincirli toksinler ve kısa zincirli toksinler olarak ayrılmaktadır. Etki mekanizmasına göre sınıflandırıldıklarında ise nörotoksik veya sitotoksik etkili toksinler olarak ayrılmaktadır. Ayrıca akrep toksinleri disülfid köprüsü içeren ve disülfid köprüsü içermeyen peptidler olarakda sınıflandırılmaktadır. Bu bileşenlerin aydınlatılması – omik teknolojileri içerisinde yer alan transkriptomik ve proteomik çalışmalar ile sağlanmaktadır (Abdel-Rahman vd., 2015).

Proteomik çalışmalarda akrep venom peptidleri, HPLC ile peptid bileşenlerine ayrıştırılmakta; kütle spektrometresi (MALDI-TOF/MS ve ESI) teknikleri ile moleküler ağırlıkları belirlenmekte; SDS-PAGE kromatografi teknikleri ile akrep venomu içerisindeki toplam molekül sayısı saptanmakta; Edman degradasyon metodu ile venom peptid bileşenlerinin amino asit dizimleri çıkarılarak peptid hakkında bilgi sağlanmaktadır.

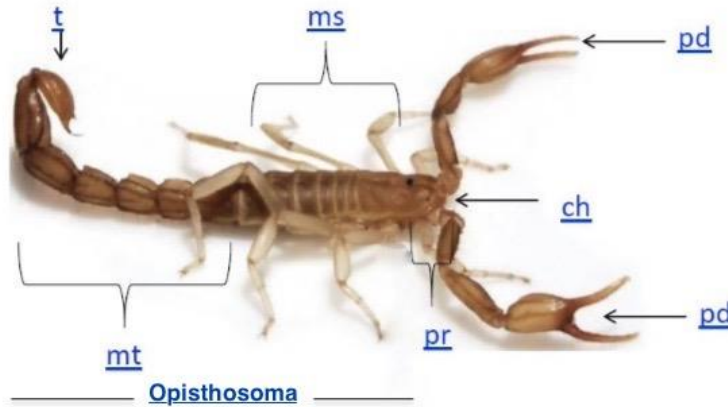
Transkriptomik çalışmalar ile akrep zehir bezlerinden elde edilen mRNA’lardan cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ile rekombinant ve sentetik peptid üretimi sağlanmaktadır (Abdel-Rahman, 2013). Literatürde *M.gibbosus* türü akrep venomundan transkriptomik çalışmalar ile MgibC1, MgibC6, MgibC8, MgibC9, Mgib253 antimikrobiyal etkinliği olduğu düşünülen hipotetik peptidlerin dizisi elde edilmiştir (Diego-Garcia vd., 2013).

2.1. Akrep Anatomisi ve Yaşam Alanları

Akrepler, 13 ile 220 mm arasında çeşitlilik gösteren boyutları ile dünya üzerinde tropikal ve subtropikal başta olmak üzere birçok farklı coğrafi koşullarda yaşamlarını sürdürmektedirler.

Bu canlılar, hayvanlar âleminin Arthropoda şubesi, Chelicerata altşubesi, Arachnida sınıfı ve Scorpionidea takımında yer almaktadır (Demirsoy, 1997).

Akrep vücudu prosoma (sefalotoraks) ve opisthosoma (abdomen) olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Opisthosoma, prosoma ile bağlı olan 5 segmentli mesosoma ve telson ile biten 7 segmentli metasoma kısımlarına ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Prosomada 6 çift üye bulunur. Bunların ilk çifti keliserlerdir. İkinci çifti bütün üyelerin en büyüğü olan pedipalplerdir. Geriye kalan dört üye çifti yürüme bacaklarını oluşturmaktadır. Prosomanın sırt yüzü “karapaks” ile örtülü olup iki medial göz ve iki ila beş çift yanıl göz taşımaktadır. Mesosom segmentleri sırt kısmı “tergit” karın kısmı “sternit” adı verilen kitin plaklar içermektedir. Bu plaklar dış etkenlere karşı zırh görevi üstlenmektedir (Weber vd., 2012).



Şekil 2.1. Temel akrep morfolojisi; pd (pedipalp), ch (keliser), pr (prosoma), ms (mesosoma), mt (metasoma), t (telson) (Weber vd., 2012).

Akrepler çöl, savan, meralar, ılıman ve tropik ormanlar, yağmur ormanları gibi geniş habitatlarda yayılım göstermektedirler. Vaejoide familyasına ait türlerden bazıları, 3.000 metrenin üzerindeki ağaçlarda kurak ve yarı kurak yaşam alanlarında bulunmaktadır. Bothriuridae familyasına ait türler küçük yuvalar, taşlar, çatlaklar ve 40 cm derinliğe sahip kendinden yapıllı yuvalarda yaşamlarını sürdürmektedir.

Typhlochactidae familyasındaki çoğu türün yaşam alanı mağaralardır. Bu familyada görülen bazı türler yerin yaklaşık 720-916 metre derinliklerinde yaşamlarını sürdürmektedir (Anonim, 2017).

2.2. Dünyada Akrep Faunası

Dünyada akrep faunası, 17 familyaya ait 214 cins altında 2539 tür ile temsil edilmektedir. Bothriuridae familyası 17 cins, 154 tür ile Güney Ameria, Afrika, Asya ve Avustralya'da yayılım göstermektedir. Akrep ailesinin en büyüğü olan Buthidae familyası 91 cins ve 1114 tür ile Antarktika ve Yeni Zelanda hariç dünyanın dört bir yanında yayılım göstermektedir. Caraboctonidae familyası 4 cins 198 tür ile Kuzey ve Güney Amerika'da (Bolivya, Şili, Ekvador, Galapagos Adaları, Meksika, Peru, A.B.D) yayılım göstermektedir. Chactidae familyası Kuzey Amerika, Orta ve Güney Amerika'da 15 cins ve 202 tür ile yayılım göstermektedir. Chaerilidae familyası 1 cins ve 42 tür içermektedir. Bu küçük familya Asya'da Güney ve Güneydoğu bölgelerinde yayılım göstermektedir. Euscorpiidae familyası 12 cins, 137 tür ile Orta ve Güney Avrupa'da yaygın olup Afrika (Akdeniz kıyılarında), Kuzey Amerika (Meksika), Orta Amerika (Guatemala), Güney Amerika (Brezilya, Peru, Venezuela), Asya (batı, orta, güney ve güneydoğu)'da yayılım göstermektedir. Hemiscorpiidae familyası, 1 cins, 16 tür içeriği ile Asya'da (doğu ve ortadoğu) yayılım göstermektedir. Madagaskar'a endemik olan Heteroscorpionidae familyasını 1 cins, 6 tür ile temsil etmektedir. Hormuridae familyası 11 cins, 85 tür ile Kuzey Asya ve Avustralya'da yayılım göstermektedir. 4 cins ve 14 tür ile temsil edilen Iuridae familyası Asya (Türkiye, Irak, Suriye) ve Yunanistan'da yayılım göstermektedir. Pseudochactidae familyası Orta Asya'da (Tacikistan, Özbekistan) 3 cins ve 6 tür ile temsil edilmektedir. Scorpionidae familyası, Afrika, Asya, Avustralya, Kuzey Amerika, Orta ve Kuzey Amerika'da 21 cins ve 311 tür ile yayılım göstermektedir. Superstitioniidae familyası 1 cins ve 1 tür ile ABD'nin Kuzeybatısı'nda yayılım göstermektedir. Troglotayosicidae familyası 2 cins ve 6 tür ile Avrupa'da (İspanya ve Fransa), Ekvador ve Kolombiya'da yayılım göstermektedir. Doğu Meksika'ya endemik olan Typhlochactidae familyası 4 cins ve 11 tür ile temsil edilmektedir. Urodacidae familyası 2 cins ve 24 tür ile Avustralya'da yayılım göstermektedir. Vaejovidae familyası Kuzey Amerika (Kanada, ABD) ve Orta Amerika'da (Guatemala) 24 cins ve 212 tür ile yayılım göstermektedir (Anonim, 2017).

2.3. Türkiye Akrep Faunası

Türkiye akrep faunası, Buthidae, Iuridae, Scorpionidae ve Euscorpiidae olmak üzere dört familyaya ait 39 tür ile temsil edilmektedir. Buthidae ailesinin ölümle sonuçlanan zehirlenmelerde birinci sırada olduğu rapor edilmiştir. Türkiye'de bu familyada 7 cinse ait 12 tür bulunur: *A. crassicauda*, *B. macrocentrus*, *Compsobuthus matthiesseni*, *C. schmiedeknechti*, *Hottentotta saulcyi*, *L. abduhbayrami*, *M. eupeus*, *M. phillipsii*, *M. nigrocinctus*, *M. gibbosus*, *M. caucasicus* ve *Orthochirus zagrosensis* (Yağmur vd., 2009, 2012). Bunun yanı sıra memelilerde düşük toksisite gösteren, Iuridae familyası 4 cinse ait 9 türden oluşur: *Calchas birulai*, *C. kraswigi*, *C. anlasi*, *C. nordmanni*, *Neocalchas gruberi*, *Protoiurus asiaticus*, *P. kadleci*, *P. kraepelini* ve *Iurus kinzelbachii* (Soleglad vd., 2012). Euscorpiidae ailesi, bir cins içinde 17 tür tarafından temsil edilmektedir: *Euscorpius avcii*, *E. aladaglarsensis*, *E. alanyaensis*, *E. arikani*, *E. eskisehirensis*, *E. gocmeni*, *E. hakani*, *E. honazicus*, *E. koci*, *E. phrygius*, *E. sultanensis*, *E. Tauricus*, *E. uludagensi*, *E. rahsenae*, *E. lecius*, *E. italicus* ve *E. mingrelicus*'a ait altı alttürü daha tanımlanmıştır: *E. m. Mingrelicus*, *E. m. Ciliciensis*, *E. m. Phrygius*, *E. m. Ollivieri*, *E. m. Legrandi* ve *E. m. Uludagensis*'dir. Scorpionidae familyasını ülkemizde temsil eden tek tür ise *Scorpio maurus*'dur (Yağmur vd., 2013; Yağmur vd., 2016).

2.4. *Mesobuthus gibbosus* Türünün Türkiye'deki Dağılımı

Mesobuthus gibbosus, Karadeniz kıyıları dışında Marmara Bölgesi, Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi'nden İç Anadolu Bölgesi'ne kadar oldukça geniş bir habitatda yayılım göstermektedir (Şekil 2.2). *Mesobuthus gibbosus* Türkiye'de ilk kez Schenkel tarafından 1947 yılında Kayseri'de tespit edilmiştir. Boyutları 6 ile 8 cm arasında olup, genellikle kahverengimsi sarı renge sahiptir.



Şekil 2.2. *Mesobuthus gibbosus* akrebinin Türkiye'deki dağılımı (Caliskan, 2015).

2.5. Akrep Venomları ve Halk Sağlığı

Akrep venomlarının biyokimyasal yapısı toksik ve non-toksik peptid bileşenler içermektedir. Non-toksik bileşenler mukopolisakaritler, enzim yapılı hiyalüronidazlar ve fosfolipazlar, proteaz inhibitörleri, serotonin ve histamin gibi biyoaminlerin karışımını içermektedir. *M. gibbosus* venomundan elde edilen letal fraksiyonun SDS-PAGE'de 28,000 Da. Molekül ağırlığına sahip olan peptidin, insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ucar ve Tas, 2003). Toksik bileşenler ise özellikle hücre iyon kanallarına özgü nörotoksik etki göstermektedir. Özellikle Buthidae familyasına ait venom bileşenleri sodyum ve potasyum kanalları üzerinde nörotoksik etki göstermektedir.

İnsanlarda akrep zehirlenmelerinin nedeni akrep venom bileşenlerinin nörotoksik etki göstermesidir. Ayrıca venom içerisindeki enzimatik bileşenler venomun insan vücudunda yayılımını kolaylaştırmaktadır. Enflamasyon belirtileri; akrep türleri, venom bileşimi ve insan biyolojik yapısının akrep venomuna karşı fizyolojik reaksiyonuna göre değişim göstermektedir. Belirtiler, zehir enjekte edildikten birkaç dakika sonra ortaya çıkmakta ve genellikle 5 saat içinde maksimum şiddete ulaşmaktadır. Ağrı, ateş, ödem ve hematom yaygın olarak gözlenmektedir (Laraba- Djebare vd., 2015).

Akrep zehirlenmesi sonrası sistemik belirti ve bulgular gözlemlendiğinde antivenom tedavisi uygulanmaktadır. Dünyada akrep zehirlenmelerinde kullanılan 19 antivenom Çizelge 2.1'de gösterilmektedir (Chippaux, 2012).

Türkiye’de akrep zehirlenmelerinde, *Androctonus crassicauda* akrep türüne ait ham venomun atlara enjeksiyonu ile elde edilen polivalent özelliğe sahip antivenom kullanılmaktadır (Çalışkan vd., 2013).

Çizelge 2.1. Akrep sokması sonucu oluşan enflamasyon tedavisinde kullanılan antivenomlar (Chippaux, 2012).

Ürün Adı	Üretici	Ülke	Akrepler
Suero Antialacrán	BIRMEX	Meksika	<i>Centruroides spp.</i>
Suero antiescorpiónico	Centro de Biotecnología de la Universidad central de Venezuela	Venezuela	<i>Tityus spp.</i>
Le sérum antiscorpionique (monovalent)	Institut Pasteur d’Algerie	Cezayir	<i>Androctonus australis, Buthus occitanus, Androctonus crassicauda</i>
Scorpion antivenom	Institut Pasteur du Maroc	Fas	<i>Buthus occitanus, Androctonus mauritanicus</i>
Le sérum antiscorpionique	Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi	Türkiye	<i>Androctonus crassicauda, Leiurus quinquestriatus</i>
Alacramyn	Instituto Bioclon	Meksika	<i>Centruroides spp.</i>
Soro antiaracnido	Instituto Butantan	Brezilya	<i>Tityus spp.</i>
Soro antiescorpiónico	Instituto Butantan	Brezilya	<i>Tityus bahiensis, Tityus serrulatus</i>
Soro antiescorpiónico	Instituto Vital Brazil	Brezilya	<i>Buthus occitanus</i>
Polyvalent Scorpion Antivenom	National Antivenom and Vaccine Production Center	Suudi Arabistan	<i>Leiurus quinquestriatus, Androctonus crassicauda, Buthus arenicola, Buthus mimax, Buthus occitanus, Androctonus amoreuxi</i>
Le sérum antiscorpionique	Pasteur Tunis	Kuzey Afrika	<i>Androctonus australis, Buthus occitanus</i>
Polyvalent Scorpion Antivenom	Razi Vaccine and Serum Research Institute	İran	<i>Androctonus crassicauda, Hemiscorpius lepturus, Hottentotta saulcyi, Hottentotta schach, Mesobuthus eupeus, Odontobuthus doriae</i>
Scorpifav	Sanofi Pasteur	Kuzey Afrika ve Orta Doğu	<i>Androctonus australis, Leiurus quinquestriatus, Buthus occitanus</i>
SAIMR Scorpion Antivenom	South African Vaccine Producer	Güney Afrika	<i>Parabuthus transvaalicu</i>
Scorpion antivenom Twyford	Twyford Pharmaceuticals	Kuzey Afrika	<i>Androctonus australis, Leiurus quinquestriatus, Buthus occitanus</i>
Purified Polyvalent anti-scorpion serum	VACSERA	Mısır	<i>Leiurus quinquestriatus, Scorpio maurus, Androctonus crassicauda, Buthus occitanus</i>
Scorpion Venom Antiserum	Vins Bioproducts Ltd.	Hindistan	<i>Leiurus quinquestriatus, Androctonus amoreuxi</i>
Soro Antiescorpionico (FUNED)	Fundação Ezequiel Dias	Brezilya	<i>Tityus serrulatus</i>
Anti-scorpion Venom Serum	Haffkine Bio-Pharmaceutical Corporation Ltd.	Hindistan	<i>Buthus tamulus</i>

Akrepler tarafından insan zehirlenme vakaları, dünyada Kuzey Afrika, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika ve bir dereceye kadar Hindistan'ı içine alan ülkeler üzerinde etkilidir (Rodrigo, 2017). Bu vakaların tahmini sayısı 1,2 milyon olup 3250'si ölüm ile sonuçlanmaktadır (Chippaux ve Goyffon, 2008; Chippaux, 2012).



Şekil 2.3. Skorpionizimden etkilenen ülkelerin zehirlenme ve ölüm sayıları (Chippaux, 2012).

Buthidae familyasında bulunan 50'ye yakın akrep türü insan ölümlerine neden olmaktadır (Lorenço, 2016). Ülkemizde Buthidae familyasına mensup akrepler tarafından insan zehirlenme vakaları yaz aylarında Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaygındır. Sarı ve siyah akrepler olarak bilinen *Leiurus quinquestriatus* ve *Androctonus crassicauda*'ya ait zehirlenmeler, özellikle yaz aylarında ve geceleri kırsal bölgelerde görülmektedir (Bawaskar, 1999).

2.6. Akrep Venomunda Bulunan Peptid Toksinler ve Etki Mekanizmaları

Akrep venom içeriği geniş moleküler ağırlıklı yaklaşık 100-700 farklı peptid bileşenli heterojen bir karışımdır. (Rodriguez de la Vega ve Possani 2005; Abdel-Rahman vd., 2014). Akrep venom peptidleri disülfid köprüsü içeren akrep toksinleri (DBPs) ve disülfid köprüsü içermeyen akrep toksinleri (NDBPs) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

Disülfid köprüsü içeren peptid toksinler hücre membran yapısında bulunan iyon kanal reseptörleri üzerine gösterdikleri fonksiyonlarına göre; Sodyum (Na^+) kanal toksinleri, Potasyum (K^+) kanal toksinleri, Klor (Cl^-) kanal toksinleri ve Kalsiyum (Ca^{+2}) kanal toksinleri olmak üzere 4 farklı sınıfa ayrılmaktadır (Rodriguez de la Vega ve Possani, 2005; Smith ve Alewood, 2014; Ortiz vd., 2014).

2.6.1. Sodyum kanalına etkili akrep toksinleri

Sodyum kanalına etkili akrep toksinleri, 60-76 amino asit uzunluğuna sahip dört disülfid köprüsü içermektedir (Possani vd., 1999). Kanal üzerindeki fizyolojik etkileri ve bağlanma özellikleri temel alınarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Alfa toksinleri (α -NaScTxs) kanalın hücre dışı yüzeyinde ki etkin reseptöre bağlanarak aktivasyon işlemini engellemektedir. Böcekler üzerindeki biyolojik aktivitelerine göre α -toksinleri klasik, böceklerle karşı etkili ve α -benzeri peptidler olmak üzere 3 alt gruba ayrılmaktadır (Gordon vd. 2003). Beta toksinleri (β -NaScTxs) ise kanal aktivasyon eşiğini negatif zar potansiyeline dönüştürmede sorumludur. Bu tip toksinler genellikle memelilere spesifik nörotoksik etki taşımaktadır (Couraud, vd., 1982; Meves, 1986; Bosmans, 2007).

Na^+ kanal etkili ilk peptid dizilimi Kuzey Afrika'da yayılım gösteren *Androctonus australis* akrebinden saflaştırılmıştır (Bougis vd. 1989). Na^+ kanal etkili toksin peptidler akrep zehir bezlerinden transkriptom analizi ile, cDNA klonlarının sıralanmasıyla elde edilmiştir (Quintero-Hernández vd., 2011). Özgün araştırmalarda cDNA'dan elde edilen Na^+ kanal toksin dizi örnekleri, Türk Akrebi *Buthacus macrocentrus*'dan izole edilen Bu1 ve *Androctonus crassicauda* akrep zehri bileşeninden izole edilen Acra 4 toksinleridir (Caliskan, 2012; Caliskan, 2013).

2.6.2. Potasyum kanalına etkili akrep toksinleri

Günümüz araştırmalarında potasyum kanal faaliyetlerini istenen şekilde modüle etmek için kullanılabilen ligandların bulunabilirliğine büyük ölçüde önem verilmektedir. Potasyum kanal ligandlarının belki de en çok çeşitlendirilmiş kaynağı akrep zehir bileşenlerinde bulunmaktadır. 2016 yılı Uniport veritabanına göre akrep potasyum kanal

toksini 293 (KTxs), Kalium veritabanına görebu sayı 174 olarak rapor edilmiştir (Kuzmenkov vd., 2016).

Birincil aminoasit dizileri ve sistein eşleştirmelerine göre akrep potasyum kanal toksinleri; α -KTx, β -KTx, γ -KTx, κ -KTx, δ -KTx, λ -KTx, ϵ -KTx olmak üzere 7 aileye ayrılmaktadır (Rodríguez de la Vega ve Possani, 2004; Cremonez vd., 2016). Bu toksinler, Kv1, Kv3, Kv4, Kv7, Kv11 ve KCa kanalları ve alt türleri ile etkileşime girmektedir.

Toksinlerin, potasyum kanalına bağlanması ile ilgili ilk çalışmalar akrep *Leiurus quinquestriatus*'un venom bileşeni charybdotoxin (ChTX) kullanılarak; sıçanın beyin synaptosomal zarlarına uygulanmıştır (Miller vd., 1985; Vazquez vd., 1990). Diğer çalışmalar charybdotoxin (ChTx), agitoxin (AgTx) ve kaliotoxin (KITX) peptidleri ile yapılmıştır. Bu toksinlerin, potasyum kanal akımını bloke ettiği rapor edilmiştir. Blokaj, kanal ile etkileşime giren bir Lizin ve hidrofobik amino asit özelliği gösteren Tirozin ve Fenilalanin içermektedir (Giangiacomo vd., 1992; Goldstein and Miller, 1993; Srinivasan vd., 2002).

α -KTx ailesi peptidleri, üç veya dört disülfid bağı ile stabilize edilen, Cs- α/β katlanma sergilemektedir (Rodríguez de la Vega and Possani, 2004; Mouhat vd., 2004). Bu katlanmaya sahip 31 farklı α -KTx alt ailesi ve 191 peptid tanımlanmıştır (Chen vd., 2012; Zhen vd., 2012; Diego-Garcia vd., 2013; Quintero-Hernandez vd., 2013). Akrep venom toksin bileşenlerinden alfa potasyum kanal etkili birçok peptid izole edilmiştir. *Mesobuthus martensii* akrebinden izole edilen iki peptid BmKcug1 ve BmKcug2, α -KTx1.14 ve α -KTx1.15 etkili (Zeng, 2006), *Mesobuthus gibbosus* türü akrebinden izole edilen MegKTx1, MegKTx2 ve MegKTx3 peptidleri ise α -KTx3.15, α -KTx9.11, α -KTx16.7 etkili olduğu rapor edilmiştir (Caliskan vd., 2013).

β -KTxs peptitleri 50-75 amino asit dizilimi içermektedir. Akrep peptitlerinin bu ailesi, böcek defensinleri gibi sitolitik etki ve antimikrobiyal aktiviteye sahip Cs- α/β motifli katlanma içermektedir. Bu özelliklere sahip *Tityus stigmurus* ve *Tityus serrulatus* akreplerinden sırasıyla BmTXK β ve TsTX-K β peptid toksinler izole edilmiştir (Diego-García vd., 2007).

γ -KTx yapısal katlanmalarında Cs- α/β motifi içermektedir. Bu aileye ait peptid toksinler Ether-à-go-go ailesi (ERG) kanallarını hedef almaktadır. ERG, çeşitli kanser hücre döngüsü ve tümör hücrelerinin çoğalma süreçlerinde görev almaktadır. ERG kanal bloke edici akrep toksin peptidler; Centruroides ve Mesobuthus cinsi akrep zehirlerinden izole edilen ErgTx1, CeErgTx4, CllErg1 ve BeKm1 peptidleridir (Yu ve diğerleri, 2014).

κ -KTx ait peptid toksinler CS- $\alpha\alpha$ motif katlanmasını içermektedir. *Heterometrus fulvipes* (k-Hefutoksin 1 ve 2), *Heterometrus spinifer* (k-KTx1.3, HeTx203, HeTx204), *Ophrestiamadagas cariensis* (OmTx1, 2, 3 ve 4) ve *Opisthacanthu cayaporum* (Ocy C8 ve Ocy C9) akrep venomlarından izole edilmiştir (Camargos vd., 2011; Chen vd., 2012).

δ -KTx ailesi Serin proteaz inhibitörü ve potasyum kanalına özgün peptidler içermektedir (Chen vd., 2013). Bu peptidler Kunitz tip toksinler olarak adlandırılmaktadır. Yapısal katlanması α -heliks ile çevrelenmiş, çift sarmallı bir antiparalel β -tabakası içermektedir. Kunitz alanları, proteazların fonksiyonunu inhibe eden proteinlerin aktif alanlarındanır. *Hadrurus gertschi* akrebinden izole edilen Hg1 bu özelliklere sahiptir (Chen vd., 2012).

Mesobuthus eupeus akrep venomundan izole edilen, λ -MeuTX-1, λ -MeuTX-2, λ -MeuTX-2a ve λ -MeuTX2b (Kuzmenkov vd., 2015) peptidleri λ -KTx ailesinde yer almaktadır. λ -MeuTX-1 inhibitör Sistein knot (ICK) içeren 37 amino asit diziliimli bir peptidtir.

ε -KTx ailesine mensup peptidlerden *Tityus serrulatus* akrep venomundan izole edilen Ts11, Ts12 ve Ts13 peptidleri yapısında α/β motif etkileşimi olmadığı rapor edilmiştir (Cremonez vd., 2016).

2.6.3. Kalsiyum kanalına etkili akrep toksinleri

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları, beyin, kalp ve kasdaki uyarılabilir hücrelerde depolarizasyona bağlı kalsiyum girişinin ana kaynağıdır (Zamponi vd., 2015). Bunlar, dokularda tanımlanan farklı türdeki kalsiyum akımlarına karşılık gelen üç ana sınıfa (Cav1, Cav2 ve Cav3) ayrılmıştır (Simms ve Zamponi, 2014).

Kalsiyum kanalı inhibitörleri, hipertansiyon ve epilepsi gibi hastalıkları tedavi etmede kullanıldığı için terapötik anlamda önemlidir (Zamponi, 2016). *Parabuthus transvaalicus*'tan izole edilen Kurtoxin 63 amino asit içeren bir peptittir. Kurtoxin T-tipi kalsiyum kanal ailesinin $\alpha 1G$ alt birimi üzerine etki göstererek çalışmaktadır (Chuang vd., 1998).

2.6.4. Klor kanalına etkili akrep toksinleri

Cl^- kanallarına etkili toksin peptidlerin karakterizasyonu ve farmakolojik çalışmalarının sayısı oldukça azdır. Bu kanal üzerine etkin akrep toksin peptidler 35-38 aminoasit uzunluğuna sahiptir ve 4 disülfid köprüsü içermektedir (Tygat, 1998). Günümüze kadar tanımlanan klor kanalına etkin peptidler ve benzer peptidler; I1, Ammp2, I3, I4, I5, I5A, IBs, chlorotoxin, Lqh-8/6, PBITx1, BmKCT, Bs-8 ve Bs14'tür. Bu peptitler arasında önemli bir yere sahip olan *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (*Lqq*) akrebinin ham venomundan saflaştırılan 36 aminoasit uzunluğundaki "chlorotoxin" *Lqq* akrebinden izole edilmiştir. Bu toksin peptidi böceklerde paralitik etki göstermektedir (Debin vd.,1993). Ayrıca sıçan epiteline ve embriyonik sıçan beyinde bulunan Cl^- kanallarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Debin ve Strichartz, 1991).

2.6.5. Disülfid köprüsü içermeyen akrep toksinleri

Disülfid köprüsü içermeyen akrep toksinleri 13-56 amino asit dizilimi içermektedir (Almaaytah ve Albalas, 2014). Bu özellikteki toksin peptidlerin çoğu bakterilere, mayalara, mantarlara ve virüslere karşı geniş spektrumda aktiviteye sahip antimikrobiyal etki göstermektedir (Zang, 2016). *Hadrurus aztecus*'tan izole edilmiş 41 amino asitlik bir peptid olan Hadruin, düşük mikromolar konsantrasyonlarda (10-50 μM) antimikrobiyal aktivite gösteren bir toksin peptittir (Torres-Larios, vd., 2000). Mikropin-M1 peptidi modifiye edilmiş bir antimikrobiyal etkili peptittir. Bu peptidin antibiyotik dirençli patojenlere karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Li, vd., 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Deneysel çalışmalar süresince, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Venom Araştırma Laboratuvarı ve Meksika Ulusal Otonom Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler İlaç ve Biyoproses Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında bulunan cihazlar kullanılmıştır.

1. Elektrostimulator (Maksimum Kapasite, 50 V, 10 Hz)
2. Buzdolabı: TORREY FRE 4 °C (WBOO261785)
3. Santrifüj: Hettich Micro 200R
4. Santrifüj: Eppendorf Centrifuge 5418 R
5. Vakum Kurutucu: Labconco Centri Vap Concentrator
6. Vakum Kurutucu: Savant Speed Vac SC210 A Speed Vac Concentrator
7. Spektrofotometre: ND-100 (E750)
8. Hassas Terazî: METTLER TOLEDO CH-8606
9. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC): SHIMADZU Prominence series (SPD-M20A DAD)
10. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC): Waters 625 chromatographer, model 996 Waters, Milford, MA, USA. (Photodiode arraydetector)
11. HPLC kolonları: Grace VYDAC, Protein & Peptid C 18 Analitic Coloumn 4,6x 250 mm.
12. Kütle Spektrometresi: Thermofinnigan Surveyor MS Pump Surveyor MS pompalı LC-MS sistemi, LCQ-IT Thermo Electron/Finnigan, San Jose-CA, USA
13. Protein Dizilim Belirleyici: BECKMAN LF 3000 Protein Sequencer
14. Sıvı Azot Tankı: MVE Model MVE_{XC} 47/11-6

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Asetik asit (Riedel-de Haën 27225)
%37 Asetonitril (Wako 014-13831)
Asetonitril (J.T. Baker HPLC gradient grade 8143)
Etil Asetat (Wako 054-04981)
Trifloroasetikasit (J.T. Baker9470-01)
Poly Brene Membran (Sigma-Aldrich 107689)
Guanidine hydrochloride (Sigma-Aldrich G7294)
Dithiothreitol (Sigma-Aldrich 43819)
Iyodoasetat (Sigma-Aldrich I1149)
Tris-HCl (Sigma-Aldrich 88438)
%25 Trifloroasetik asit (Wako 201-10781)
%12 Trimetilamin (Wako 207-10761)
Heptan (Wako 084-05501)
%5 Fenil izotiyosiyanat n-heptan (Sigma-Aldrich P1034)
Tris-HCl (Sigma-Aldrich 88438)
Klorobutan (Sigma-Aldrich 414255)

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

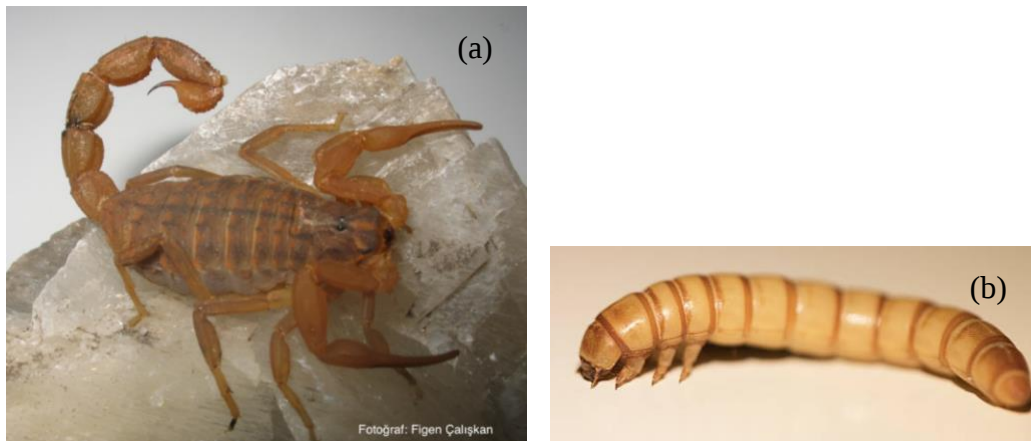
- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Ters- faz kromatografisinde kullanılan çözeltiler:
 - Tampon A çözeltisi: %0,12 derişimli trifloroasetik asitin (TFA) sudaki çözeltisi kullanılmış ve çözelti 600 µl TFA'nın 500 ml deiyonize su içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.
 - Tampon B çözeltisi: %0,10 derişimli trifloroasetik asitin (TFA) asetonitril içerisindeki çözeltisi kullanılmış ve çözelti 500 µl TFA' nın 500 ml asetonitril içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.
- Kütle spektrometresi (LC-MS-ESI)'nde kullanılan çözeltiler:
 - %50 asetonitril içeren %0,1 (v/v)'lik asetik asit HPLC ayırımından elde edilen örneklerin dilüe edilmesi için hazırlanmıştır.

- İndirgenme- alkalizasyon işleminde kullanılan çözeltiler:
Buffer: 6 M'lık guanidine hidroklorür solüsyonu, 5 ml 200 mM'lık pH:8.60'da Tris-HCl ve 1mg/ml olacak şekilde 10 ml EDTA karıştırılarak hazırlanmıştır. 1µg iyodoasetat daha sonra karışıma eklenmiştir.
- Protein Sekanslama (PPSQ) çalışmalarında kullanılan çözeltiler:
SHIMADZU PPSQ 31-A protein sekanslama cihazının üretici firmasının çözeltiler kısmında bulunan yönergesine göre %37 asetonitril, 1- klorobutan, etil asetat, heptane, %5 fenil izotiyosiyanat n-heptan, %25 trifloroasetik asit ve %12 trimetilamin solüsyonları hazır olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Akrelerin bakımı

Çalışmalarda kullanılan ham venom *M. Gibbosus* akrep türüne aittir (Şekil 5.1). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Venom Araştırma Laboratuvarı'nda var olan akreler, oksijen ihtiyacını sağlamak için 3mm çaplı delinmiş olan plastik kutular içinde muhafaza edilmiştir. Kutular içinde periyodik olarak değiştirilen su kapları ile akreler haftada bir *Tenebrio molitor* larvaları ile beslenmiştir (Çalışkan vd., 2006) (Şekil 4.1). Laboratuvarda bulunan diğer akreler tür isimleri ile sınıflandırılmıştır (Santibáñez-López vd., 2016).



Şekil 3.1. a) *Mesobuthus gibbosus* akrep türüne ait görüntü b) *Tenebrio molitor* larva görüntüsü (Anonim, 2017).

3.2.2. Akrep venomlarının eldesi ve hazırlanması

Akreplerden ham venom eldesi elektriksel sağım yöntemi kullanılarak sağlanmıştır. İki elektrot yardımıyla akrep kuyruğuna 20 volt'luk elektrik akımı uygulanmasına dayanan yöntemle elde edilen akrep venomları, mikrosantrifüj tüplerde toplanmıştır. Toplanan ham akrep venomu deiyonize suda çözülerek, 15 dak. süre ile 4 °C'de 14000 rpm'de santrifüjlenmiştir (Santibáñez-López vd., 2017). Peptid toksinlerin bulunduğu süpernatant kısım yeni bir tüpe aktarılmış ve vakum kurutucuda kurutulmuştur. Toplanan kuru ham venomlar -20 °C'de ağızları parafilmle sarılı bir şekilde saklanmıştır (Calışkan vd., 2006; Valdez-Velazquez vd., 2013, Valdez-Velazquez vd., 2016). Bu çalışma ayda bir kez tekrarlanmıştır.

3.2.3. Venom peptidlerinin protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen peptidlerin miktarları ölçüme uygun olduğu durumda hassas terazi yada spektrofotometre kullanılmıştır. Venom konsantrasyonunun belirlenmesi için; ham venom 100 µl distilesuda çözülerek Thermo Nano Drop spektrofotometre cihazına 3 µl yüklenerek A_{280nm}'de ölçümler yapılmıştır (Götze ve Saborowski, 2011).

3.2.4. Ham venomun HPLC'de saflaştırılması ve peptidlerin eldesi

Ham venom, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmıştır. Ham venom saflaştırma işlemi için C18 ters-faz analitik protein peptid kolonu tercih edilmiştir. Ayrımlar sırasında hareketli faz doğrusal gradient olarak uygulanmış ve hareketli faz olarak A ve B ile tanımlanan iki farklı çözelti kullanılmıştır. Tampon A çözeltisi; %0.12 derişimli trifluoroasetik asitin sudaki çözeltisi, Tampon B; %0.10 derişimli trifluoroasetik asitin asetonitril içindeki çözeltisidir. Çalışmalarda hareketli fazın akış hızı 1 dakikada 1 ml olacak şekilde ayarlanmış ve 60 dakika süresince 230 nm dalga boyunda absorbans izlenerek ayırım gerçekleştirilmiştir (Valdez-Velazquez vd., 2016). HPLC'de fraksiyonlar çalışma başlangıcında her bir tüp içerisine 1 dakikalık elüsyon gelecek şekilde, etkin dakikaların belirlenmesinden sonra, kolondaki alıkonma sürelerine göre ayrı eppendorf tüpler içerisine manuel olarak toplanarak kurutulmuş ve etiketlenerek -20 °C'de saklanmıştır (Calışkan vd., 2006, Calışkan vd., 2013).

3.2.5. Kütle spektrometresi ile molekül ağırlığının belirlenmesi

Kütle spektrometresi nötr moleküllerin çeşitli kaynaklar ile iyonlaştırılması ve yüklenmiş iyonların elektriksel yada manyetik alandan geçerken kütle/yük oranlarına göre ayrılma esasına dayanmaktadır. Bu çalışma yöntemine göre; HPLC'den toplanan fraksiyonlar %1 asetik asit içeren 50/50 asetonitril/su çözeltisinde, yaklaşık olarak 0,5–1,0 µg protein içerecek şekilde seyreltildikten sonra 2µl olarak kütle spektrometresine yüklenmiştir. NanoESI kaynağı 1.60 kV, kapiller sıcaklık 180 °C olarak ayarlanmıştır (Rodríguez-Raveloa vd., 2014). Tüm spektrumlar, pozitif iyon modunda elde edilmiştir. Veri toplama Xcalibur yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. İndirgenme ve Alkilasyon Çalışmaları

Peptid içeriğinde bulunan sisten amino asitlerinin oluşturduğu disülfid bağlarını indirmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışma ile tüp içerisinde bulunan saf peptid üzerine daha önceden hazırlanmış pH'sı 6,8 olan Tris- HCl, 6M'lık Guanidio- HCl ve 1mg/ml EDTA içeriğine sahip buffer çözeltisinden 100 µl ve 1 mg denatüre edici ajan olan DTT eklenmiştir. Tüp içerisinde bulunan oksijen, nitrojen gazı uygulanarak uzaklaştırılmıştır. Tüp daha sonra ısıtmalı blok üzerinde 55°C'de, 40 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha önce kullanılan buffer çözeltisinden 20 µl alınarak temiz bir tüp içerisine aktarılmıştır. Buffer içerisine 1 µg iyodoasetat eklenmiştir. Hazırlanan yeni karışım peptid içeriğine sahip tüpe aktarılmıştır. İnkübasyonun gerçekleşmesi için tüp alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra peptidin kromatografik ayrımı yapılmıştır.

3.2.7. Peptid amino asit diziliminin belirlenmesi

Peptidlerin amino asit dizilimlerinin belirlenmesi Edman degradasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fenil izotiyosiyanat (PITC) molekülü, peptidin N- terminal ucunda ki α-amino grubu ile reaksiyona girerek serbest kalan birinci amino asiti aniltiazolinon (ATZ) formuna dönüştürmektedir.

ATZ formu, etil asetat ve klorobütan çözücülerini ile peptitten uzaklaştırılmakta ve analiz için daha kararlı bir yapı olan feniltiyohidantoin (PTH) formuna dönüştürmektedir.

PTH içereikli her bir amino asit, ters fazlı C-18 kolonunda 270 nm dalga boyunda analizleri yapılmaktadır. Bu yönteme dayanarak; örnekler 1 µg/µl konsantrasyona sahip deiyonize su ile çözülmüş ve 4 µl örnek brevene membran üzerine eklenmiştir. Örneğin membran üzerine tamamen difüze olması için yaklaşık 1 saat beklenmiştir. Örnek içereikli membran protein sekanslama cihazına yerleştirilmiştir. Daha önceden sisteme konfigüre edilmiş amino asit dizilimleri ile analizi gerçekleştirilen peptidlerin karşılaştırılması bilgisayar yazılım programı ile kayıt altına alınmıştır. Kayıt altına alınan veriler manuel olarak analiz edilmiştir.

3.2.8. Peptid Diziliminin biyoinformatik veri tabanlarında karşılaştırılması

Elde edilen etkin peptitin birincil yapısı NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanında protein BLAST aracı kullanılarak diğer akrep peptidleri ile karşılaştırılmıştır. Protein BLAST ile elde edilen dizilimler Clustal W (Multiple Sequence Alignment) programı ile amino asit dizileri alt alta gelecek şekilde düzenlenmiştir.

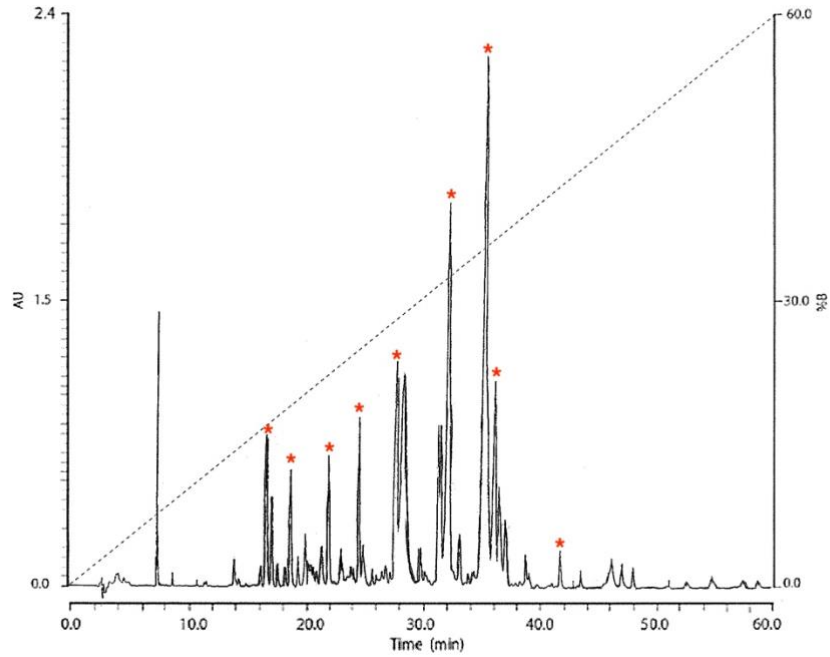
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ham Venom Eldesi ve Sonuçlar

Çalışmalar süresince, *M. gibbosus* türü akreplerden ayda bir kez elektriksel sağım yöntemi ile ham venom elde edilmiştir. Her bir akrebin sağım sonucu elde edilen 1-2 damla venom içeriği Thermo Nano Drop spektrofotometre cihazında 280 nm absorbans altında yaklaşık 0,3-0,7 mg aralığında peptid miktarı içerdiği belirlenmiştir. Elde edilen ham venom 3.2.1’de belirtilen yöntemler uygulanarak kurutulmuştur.

4.2. Ham Venomun HPLC’de Saflaştırma Sonuçları

M. gibbosus akrebinden elde edilen kurutulmuş ham venom hassas terazide 2 mg ölçülüp tampon A içerisinde çözülerek HPLC’de iki kez birer mg olarak yürütülmüştür. Ham venom ters-faz sistemi kullanılarak peptid bileşenlerine ayrıştırılmıştır. Şekil 4.1’de *M. gibbosus* ham venomundan elde edilen kromatografik profil gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Mesobuthus gibbosus* ham venom kromatogramı

Kromatografik ayırım sonucunda en az 41 farklı fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar alıkonma sürelerine göre Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *Mesobuthus gibbosus* türü akrebin ham venomundan elde edilen fraksiyonlar HPLC’deki alıkonma sürelerine göre gösterilmiştir.

Fraksiyon No	Alıkonma Zamanı (Dak.)	Fraksiyon No	Alıkonma Zamanı (Dak.)
1	7,71	22	32,53
2	9,09	23	33,63
3	11,19	24	35,61
4	14,34	25	35,97
5	17,05	26	36,53
6	17,53	27	36,92
7	18,05	28	37,49
8	19,10	29	39,25
9	19,77	30	39,53
10	20,39	31	42,18
11	22,36	32	43,35
12	23,47	33	43,98
13	24,32	34	46,58
14	24,55	35	47,45
15	24,97	36	48,39
16	25,33	37	51,48
17	28,17	38	52,90
18	28,67	39	55,08
19	28,86	40	57,72
20	31,74	41	59,00
21	31,94		

Alıkonma sürelerine göre toplanan fraksiyonlardan, akrep toksinlerinin potasyum kanalına tanımlı olanları 15 ile 30. dakikalar arasında, sodyum kanallarına tanımlı olanların ise 30 ile 40. dakikalar arasında gelmesi nedeniyle bu dakikalar arasındaki majör fraksiyonlar kütle spektrometresinde moleküler ağırlıklarını belirlemek üzere seçilmiştir. Bu kapsamda 17,05 dak. (19,1 µg); 17,53 dak. (10 µg); 19,10 dak. (14 µg); 22,36 dak. (18,5 µg); 28,17 dak. (42 µg); 32,53 dak. (103 µg); 35,61 dak. (142,7 µg); 36,53 dak. (47,5 µg) ve 42,18 dak. (5,06 µg) alıkonma süreli 9 fraksiyon molekül ağırlıkları belirlenmek üzere kütle spektrometresine ayrı ayrı yüklenmiştir.

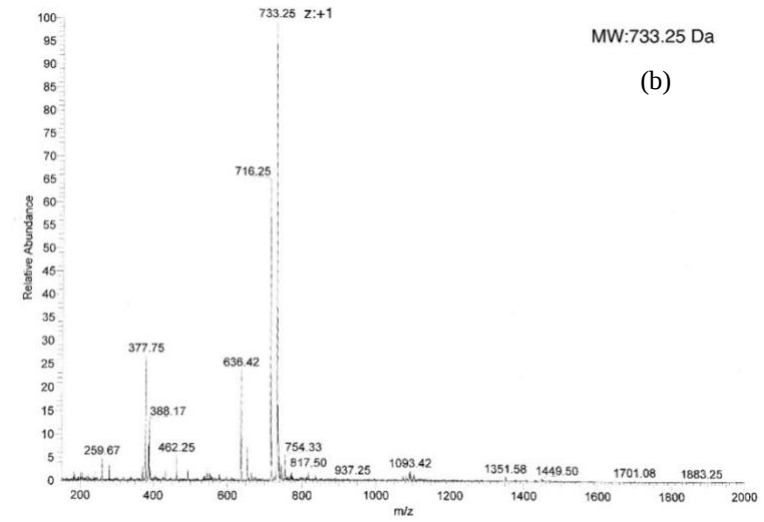
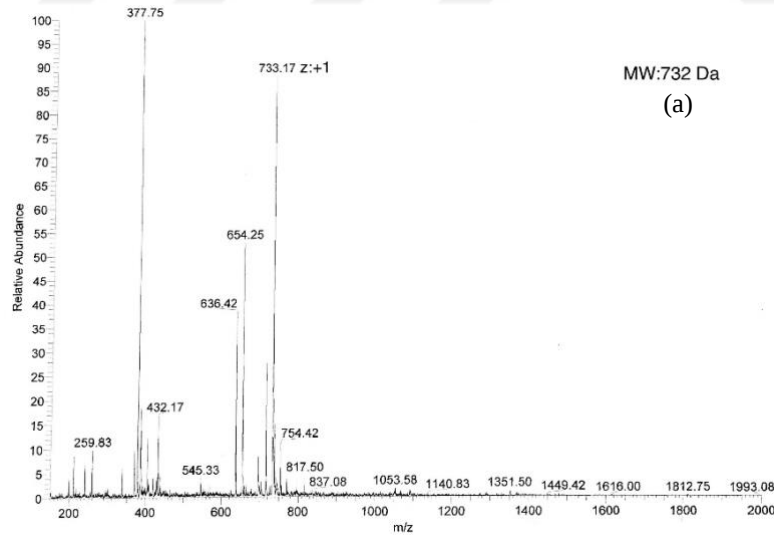
4.3. Kütle Spektrometresi ile Molekül Ağırlığının Belirlenme Sonuçları

Çalışmada kullanılan LC-MS-ESI cihazının çalışma prensibine göre analiz edilen seçili 9 fraksiyonun molekül ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

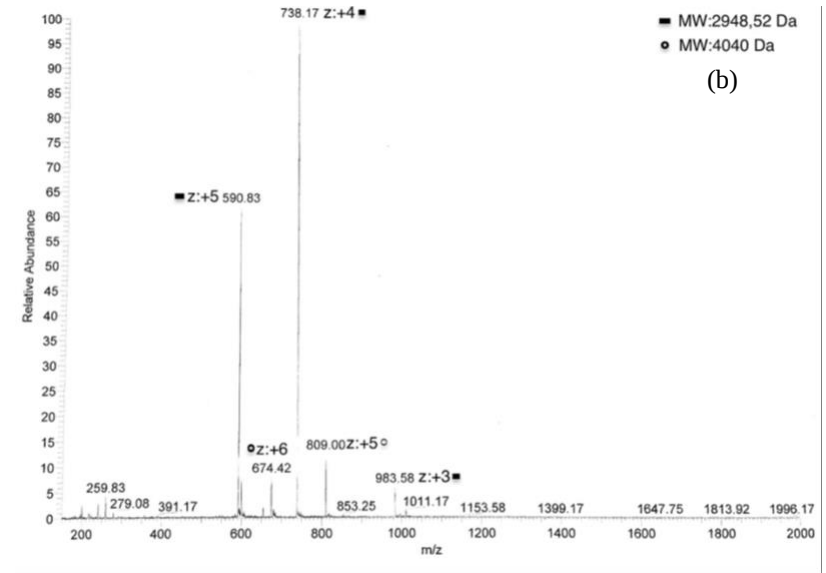
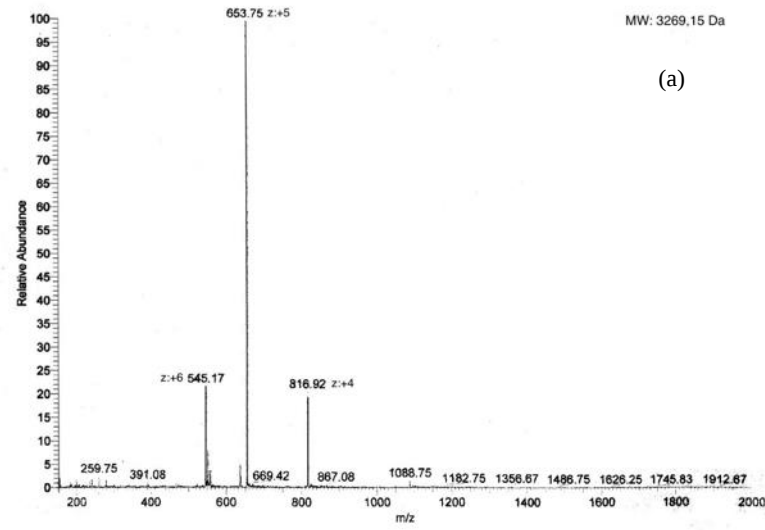
Çizelge 4.2. Seçilen fraksiyonların moleküler ağırlık sonuçları

Alan (%)	Alıkonma Zamanı (Dak.)	Moleküler Ağırlık (Da)
2.31	17.05	733,17
1.21	17.50	733,25
1.71	19.10	3269,15
2.24	22.36	2948,52; 4040
4.01	28.17	943,60; 3476; 7278,30
12.41	32.53	7062,73
17.20	35.61	6943; 7683,51
5.72	36.53	22079
0.61	42.18	44106

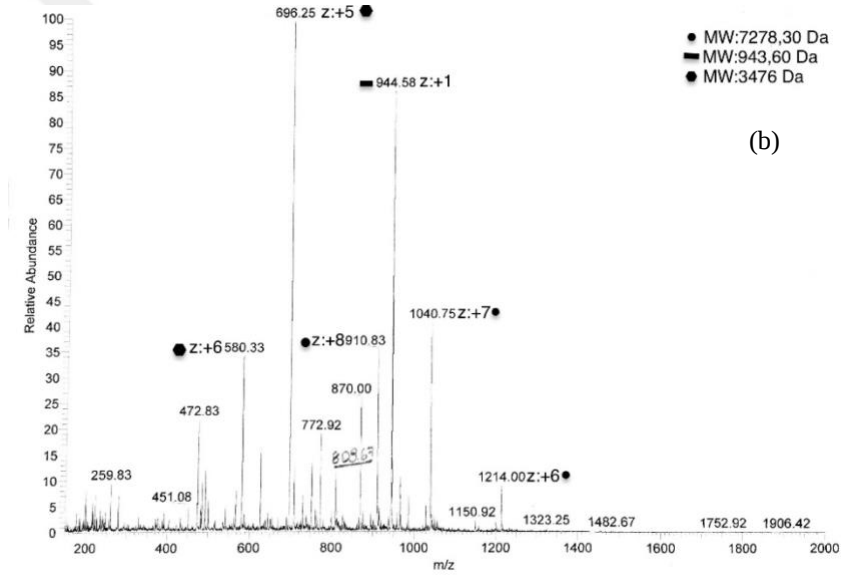
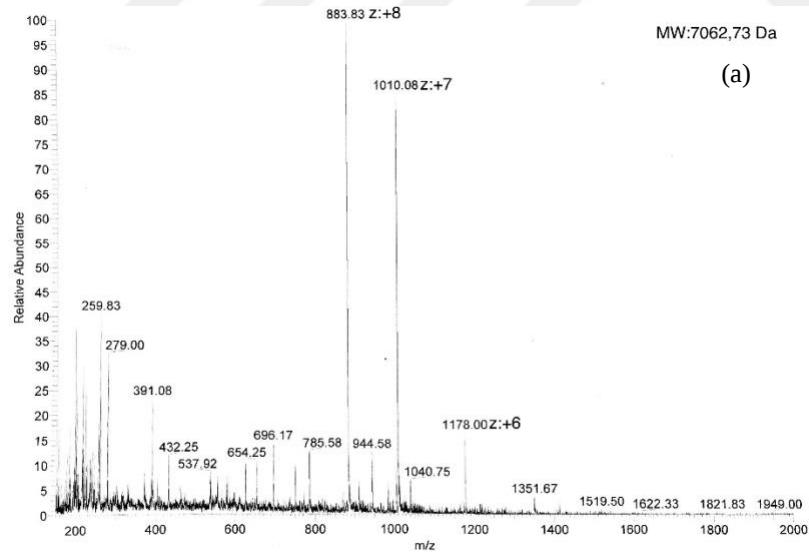
Çizelge 4.2 ile verilen moleküler ağırlığı belirlenmiş her bir peptidin kütle spektrometresinde alınan spektrumları aşağıda sırasıyla gösterilmiştir.



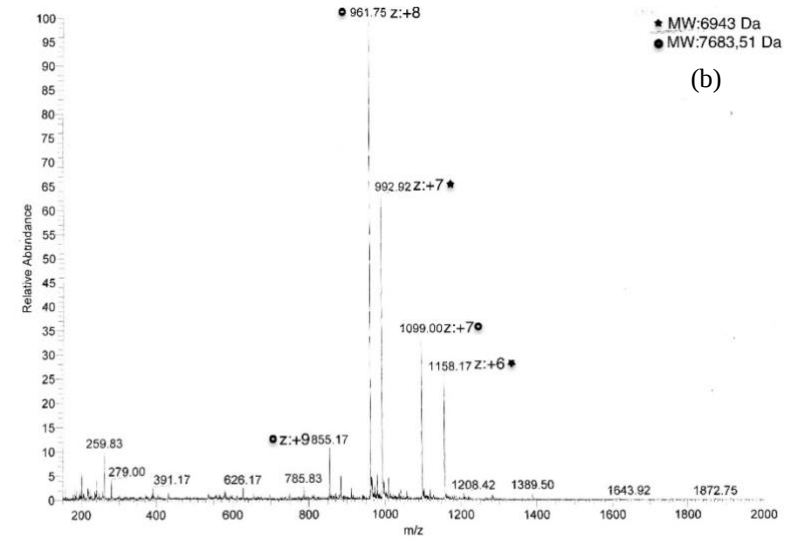
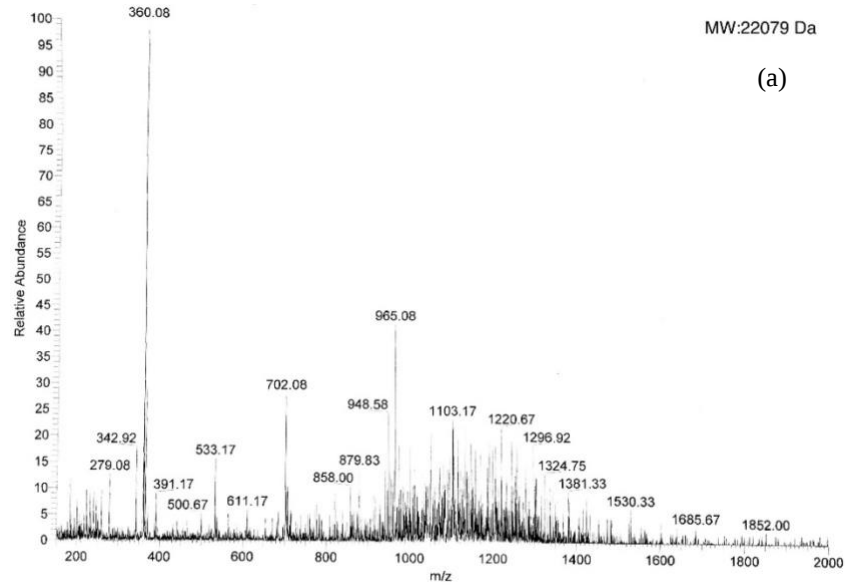
Şekil 4.2. a) 17,05 dak. b) 17,53 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu



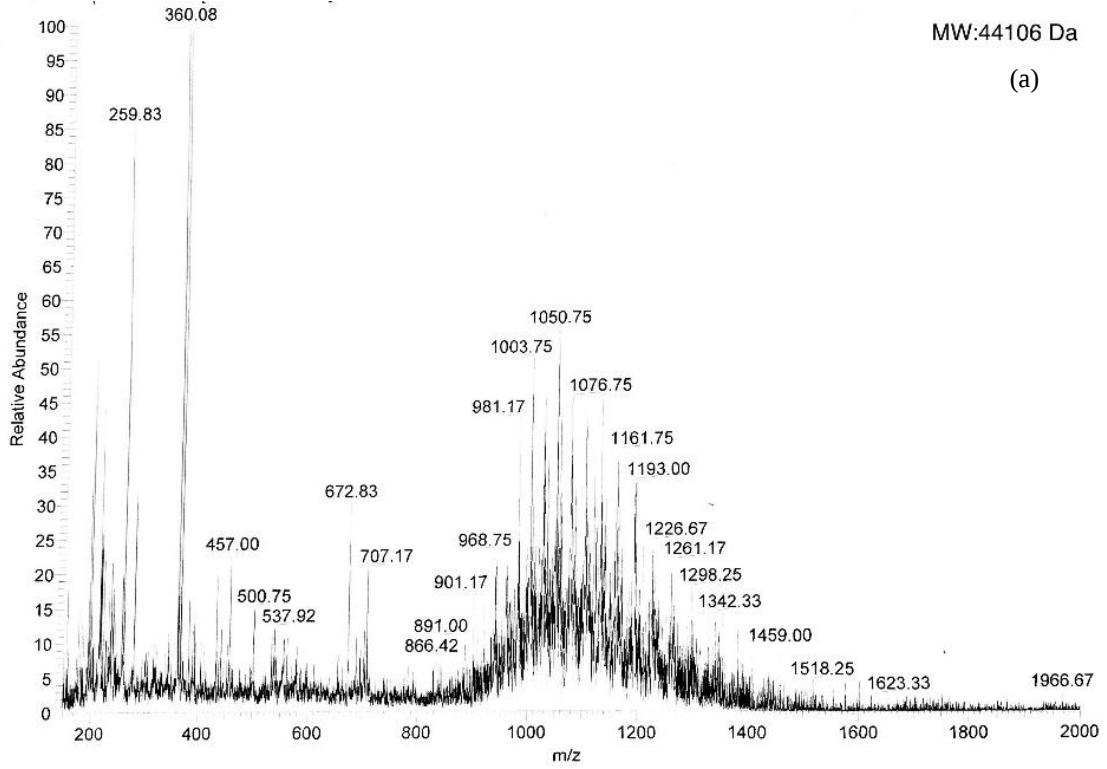
Şekil 4.3. a) 19,10 dak. b) 22,30 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu



Şekil 4.4. a) 28,10 dak. b) 32,50 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu



Şekil 4.5. a) 35,61 dak. b) 36,50 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu



Şekil 4.6. a) 42,20 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu

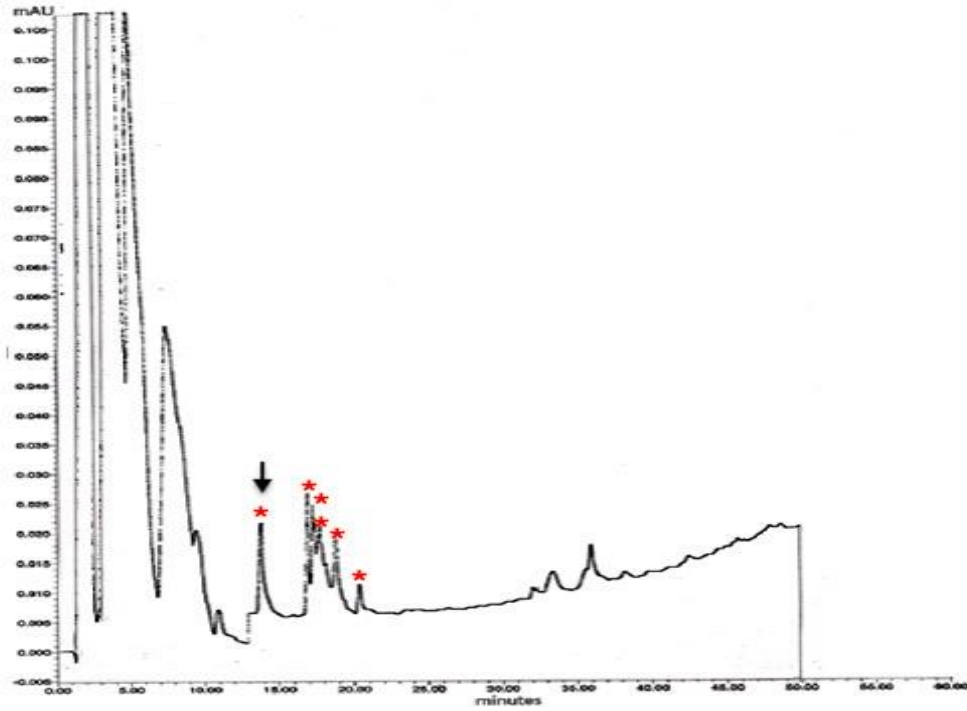
HPLC Kromatogram ve kütle spektrometresi sonuçlarına göre seçilen diğer peptidler ile karşılaştırıldığında, daha saf olduğu görülen 19,10 dakika alıkonma süreli peptid birincil yapısının belirlenmesi için öncelikli olarak seçilmiştir. Kütle spektrumu verilerine göre; molekül ağırlığı 3269,15 Da. olarak belirlenen peptid birincil yapısının belirlenmesi için protein sekansına alınmıştır. Protein sekans sonuçlarına göre 19,10 dakika alıkonma süreli peptidin dizilimi;



olarak bulunmuştur. Sonuçlar da X olarak belirtilen ve herhangi bir amino asite karşılık gelmeyen boşlukların disülfid köprüleri ile bağlı olan sistein amino asiti olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, saf peptid indirgeme ve alkilasyon çalışmalarına alınmıştır.

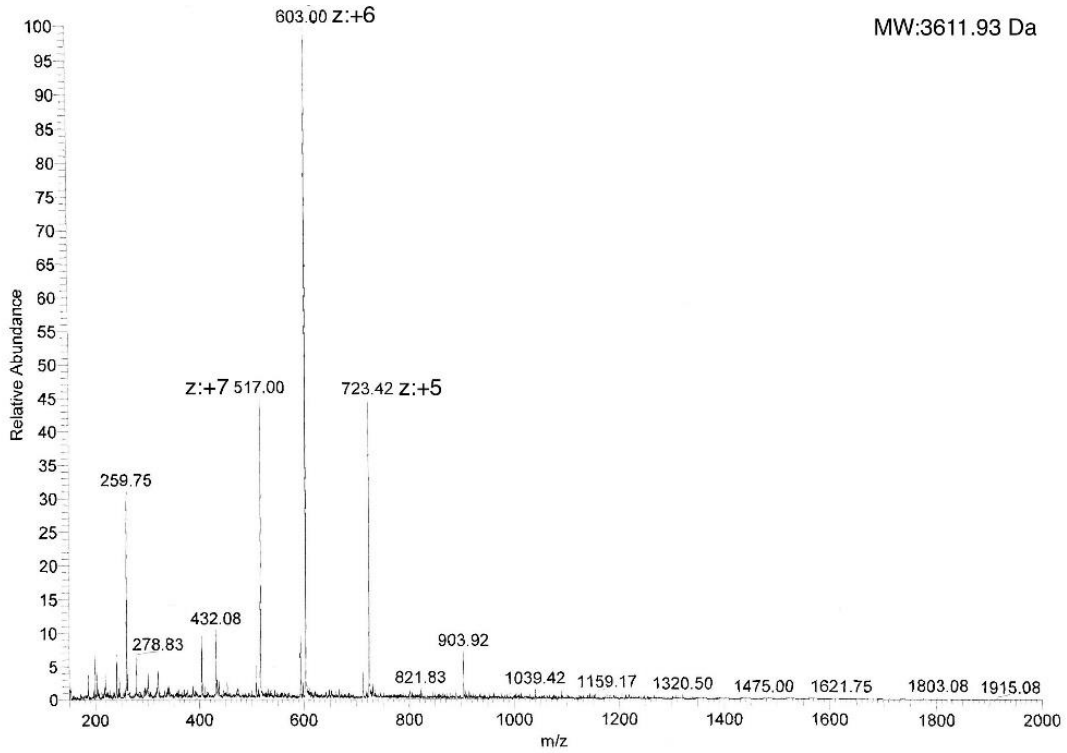
4.4. İndirgenme ve Alkilasyon Çalışmaları Sonuçları

Saf olarak elde edilen 19,10 dakika alıkonma süreli peptid için bölüm 3.2.6'da belirtilen yöntem uygulanarak indirgeme ve alkilasyon çalışmaları yapılmıştır. Alkilasyon işlemi sırasında kullanılan kimyasallardan peptidi arındırarak saf olarak elde etmek için karışım tekrar HPLC'ye alınmıştır. Sonuçlar Şekil 4.7 ile aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 4.7. Alkilasyon ve indirgeme çalışmaları sonrası gerçekleştirilen kromatografik ayırım sonucu

Alkilasyon işlemi sonrası elde edilen HPLC fraksiyonları kütle spektrometresine tekrar alınmıştır. HPLC'den 20,68 dakika alıkonma süresiyle gelen peptidin Kütle spektrometresi sonuçlarına göre 3611,93 Da. olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 20,68 dak. alıkonma zamanı olan fraksiyonun kütle spektrumu

Peptidin indirgenmemiş halinin 3269,15 Da. olması nedeniyle aradaki farkın 342,78 Da. olduğu belirlenmiştir. Bu fark disülfid bağlarının indirgenmesinde kullanılan iyodoasetamid molekül ağırlığı olduğu bilinmektedir. İndirgenmiş molekül tekrar Edman reaksiyonu için protein sekansına alınmıştır.

4.5. İndirgenme ve Alkilasyon sonrası Peptid Dizi Belirleme Çalışma Sonuçları

İndirgenme ve alkilasyon çalışmaları sonrası HPLC'den elde edilen 20,68 dakika alıkonma süreli peptidin kütle spektrometre sonucuna göre 3611,93 Da. moleküler ağırlığa sahip peptid protein sekansına yüklenmiştir. Edman reaksiyonu ile belirlenen ilk 12 aminoasit dizilimi VSCEDCPEHCAT olarak bulunmuştur.

Çalışma sonuçlarına göre saf peptidin indirgenmiş ve indirgenmemiş durumlarının molekül ağırlık farkı 342,74 Da. olarak bulunmuştur. Alkilasyonda kullanılan iyodoasetamidin molekül ağırlığı 57 Da. olması nedeniyle 342,74 sayısı 57'ye bölünmüştür. Sonuç 6 olarak bulunmuştur.

Bu sayı peptide 6 tane iyodoasetamid molekülün bağlandığını dolayısıyla peptidin 6 sistein amino asiti içerdiğini göstermektedir.

Tüm bu veriler ışığında saf peptidin içerdiği 6 sistein ile 3 disülfid köprüsüyle paketlenmiş 29 amino asit uzunluğunda bir peptid olduğu ve diziliminin VSCEDCPEHCATKEQRAKCDNNKCVCEPK olduğu bulunmuştur.

4.6. Filogenetik Analiz

Edman reaksiyonu sonrasında elde edilen birincil yapıdaki peptidin diğer akrep peptidleri ile benzerlik analizi NCBI'da BLAST aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Peptidin benzerlik analiz sonucuna göre en yakın dizilim *Mesobuthus eupeus*'dan izole edilmiş MeuKTx-1 peptidi ile %93 benzerlik oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Diğer yakın peptid dizimleri ise *Buthus martensii karsh*'dan BmP01 peptidi %85 benzerlik oranı; *Androctonus mauritanicus*'dan AmP01 peptidi %83 benzerlik oranı; *Leiurus quinquestriatus hebraeus*'dan LPIII peptidi %79 benzerlik oranı göstermektedir.

	Skor
Peptid	VSCEDCPEHCATKEQRAKCDNNKCVCEPK
MeuKTx-1	VSCEDCPEHCATKDQRAKCDNDKCVCEPK %93
BmP01	ATCEDCPEHCATQNARAKCDNDKCVCEPK %85
AmP01	VSCEDCPEHCSTQKAQAKCDNDKCVCEPK %83
LPIII	VSCEDCPDHCSTQKARAKCDNDKCVCEPK %79

Şekil 4.9. Elde edilen peptidin BLAST sonucu benzer peptidler ile karşılaştırma sonuçları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akreplerin 450 milyon yıllık yaşam sırları avlanma ve savunmada kullandıkları aktif venom bileşenleridir (Lourenco, 2016). Günümüze kadar Dünya’da 2539 akrep türü tanımlanmıştır ve bu türler 19 familya altında toplanmıştır. Buthidae familyasında bulunan yaklaşık 50 tür akrep insan zehirlenmelerinden sorumludur. Ülkemizde bulunan Buthidae familyasına ait *L.quinquestriatus*, *A. crassicauda*, *M. eupeus* ve *M.gibbosus* akrepleri halk sağlığı açısından önemli türlerdir. (Caliskan vd., 2013). Venom içerisindeki aktif bileşenler, iyon kanalları üzerine etki göstererek insanlarda akrep zehirlenmelerine neden olmaktadır. Aynı zamanda iyon kanallarına spesifik bağlanabilme yetenekleri, onları iyon kanal kaynaklı hastalıkların teşhisinde kullanılabilecek potansiyel bir molekül olmalarını sağlamaktadır.

Ülkemiz akrep faunası içerisinde yer alan *M.gibbosus*, Marmara Bölgesi, Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgesi’nden İç Anadolu Bölgesi’ne kadar geniş yayılım göstermektedir. Bu çalışma ile halk sağlığı açısından önemli olan bu türün venomunda bulunan peptid bileşenleri araştırılmıştır. Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı’nda var olan akrepler ile yapılmıştır. Ham venom ayda bir kez elektrostimülasyon yöntemi uygulanarak elde edilmiştir. Ham venom konsantrasyonu NanoDrop spektrometresi ile belirlenmiştir. Ham venom HPLC’de ayrıştırılmıştır (Şekil 4.1). HPLC sonucu elde edilen 41 fraksiyondan majör olan dokuz fraksiyon kütle spektrometresinde moleküler ağırlıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.2). HPLC ve kütle spektrometresi sonuçlarına göre seçilen peptidler karşılaştırıldığında daha saf olduğu belirlenen 19,10 dakika alıkonma süreli peptid seçilmiştir. Bu peptidin moleküler ağırlığı 3269,15 Da. olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). Peptidin amino asit diziliminin belirlenmesinden önce disülfid bağlarının indirgenmesi için alkilasyon işlemi uygulanmıştır. Alkalizasyon işlemi sonrası elde edilen HPLC fraksiyonları kütle spektrometresine tekrar alınmıştır (Şekil 4.7). HPLC’den 20,68 dakika alıkonma süresiyle gelen peptidin kütle spektrometre sonuçlarına göre 3611,93 Da. olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Alkilasyon işlemi sonrası molekül ağırlıkları arasında oluşan 342,74 Da. Farklılığın sebebi alkilasyon işleminde kullanılan iyodoasetamid molekülünden kaynaklanmaktadır.

Bu farkı iyodoasetamidin molekül ağırlığına bölümünden elde edilen sonuç, peptid içeriğindeki altı sistein amino asit sayısını belirtmektedir. Belirlenen sistein amino asit sayısı akrep toksin sınıflandırmalarında önemli olan 3 disülfid köprüsü ile paketlenmiş olduğunu göstermektedir. Protein sekansır ile saf peptidin birincil yapısı belirlenmiştir.

Peptidin protein sekansır sonuçlarına göre 29 amino asit içeren VSCEDCPEHCATKEQRAKCDNNKCVCEPK dizilimi elde edilmiştir. Elde edilen bu dizilim NCBI'da BLAST aracı ile yapılan benzerlik analizinin sonucuna göre en yakın peptidin VSCEDCPEHCATKDQRAKCDNDKCVCEPK dizilimine sahip *Mesobuthus eupeus* akrebine ait olduğu belirlenmiştir. *Mesobuthus eupeus*'dan izole edilen MeuKTX-1 peptidi ile %93 oranında benzerliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Elde edilen amino asit dizilimine yakın olan diğer peptidler ise *Buthus martensii* Karsh'dan izole edilen BmPO1, *Androctonus mauritanicus*'dan izole edilen AmPO1 ve *Leiurus quinquestriatus hebraeus* izole edilen LpIII peptidlerdir (Şekil 4.9).

Çalışmadan elde edilen peptidin MeuKTx-1 dizilimi ile karşılaştırılması sonucu 14. ve 22. pozisyonlarda farklı 2 amino asit tespit edilmiştir. MeuKTx-1 14. pozisyonundaki polar ve asidik Aspartik asit (D) yerine elde edilen peptidte polar ve asidik özelliğe sahip Glutamik asit (E), 22. pozisyonda ise polar ve asidik Aspartik asit (D) yerine nötral ve polar özellikte Asparajin (N) amino asidi konumlanmıştır. Amino asitlerin farklı konumlanması peptidin iyon kanallarına bağlanma sürecinde düşük yada yüksek afinite göstermesi için önemlidir (Rodriguez de la Vega, vd., 2003; Jouirou, vd., 2004).

Literatürde *Mesobuthus gibbosus* venomuna ait biyokimyasal çalışmalarda Kv1.1-1.6 kanallarına etkili α -KTx ailesine üye Meg KTx-1, Meg KTx-2 ve MegKTx-3 peptidleri rapor edilmiştir (Diego-García, vd.,2013). Çalışmalarımız sonucu birincil dizilimi elde edilen peptidinin günümüze kadar tanımlanmış olan *M.gibbosus*'a ait peptidlerle benzerlik göstermediği belirlenmiştir. Bu nedenle peptidin alıkonma süresine bağlı olarak Meg 19,1 olarak isimlendirilmiştir. Meg 19,1'e en yakın dizilime sahip *M. eupeus*'dan izole edilen MeuKTx-1 peptidinin Kv1.1 kanalına etkin bir α toksin peptidi olduğu rapor edilmiştir (Kuzmenkov, 2015). Akrep α toksin peptidleri genellikle Kv1 ve Kv4 voltaj kapılı potasyum kanallarına bağlanarak kanal aktivasyonunu bloke etmektedir.

Kv1'in alt familyasında bulunan Kv1.1 kanalları genellikle sinir sistemi, kalp, iskelet kası gibi biyolojik açıdan önemli yerlerde eksprese olmaktadır. Bu kanalların patolojik durumlarında epilepsi hastalığı ve ataksi belirtisi gözlenmektedir. Ayrıca tümör hücreleri, proliferasyonunu Kv1.1 kanalları üzerinden yaptığı bilinmektedir (Ouadid-Ahidouch, vd., 2000). Çalışmalarımız sonucu elde edilen peptidin %93 benzerlikle MeuKTx-1 peptidine benzer dizilime sahip olması, ayrıca diğer benzer dizilimdeki peptidler BmP01, AmP01 ve LPIII'ünde potasyum kanalına etkin peptidler olması nedeni ile Meg 19,1'de potasyum kanalına etkin olabileceği ön görülmektedir.

Çalışmalarımıza madde miktarlarını arttırmak için saf peptidin yeniden izolasyonu ile devam edilecektir. Elde edilen peptid ile potasyum kanalları üzerindeki etki elektrofizyolojik çalışmalar ile araştırılacaktır. Elde edilen sonuçlar ile peptidin tanımlı olduğu kanal belirlenecek ve farmakolojik çalışmalarda, iyon kanal araştırmalarında kullanılacak potansiyel bir molekülün elde edilmesi beklenmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Rahman, M., Harrison, P.L., Strong, P.N., 2014, Snapshots of scorpion venomics, *Journal of Arid Environments*, 1-7p.
- Abdel-Rahman, M.A, Harrison, P.L, Strong, P.N., 2015, Snapshots of scorpion venomics, *Journal of Arid Environments*, 112, 170-76p.
- Abdel-Rahman, M.A, Quintero-Hernandez, V., Possani, L.D., 2013, Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae), *Toxicon*, 74, 193-207p.
- Adiguzel, S., 2010, In vivo and in vitro effects of scorpion venoms in Turkey: a mini-review, *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 2010, 16, 198-211p.
- Almaaytah, A., Albalas, Q., 2014, Scorpion venom peptides with no disulfide bridges, *Peptides*, 51, 35-45p.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., David J.L., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402p.
- Anonim, 2017, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), <http://www.ub.ntnu.no/scorpion-files>, erişim tarihi 3.01.2018.
- Bawaskar, H.S., Bawaskar, P.H., 1999 Management of scorpion sting, *Heart*, 82, 253-256p.
- Bougis, P.E., Rochat, H., Smith, L., 1989, Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II., *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 19259-65p.
- Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M., Trang, T., Salter, M.W., Zamponi, G.W., 2014, Calcium permeable ion channels in pain signaling, *Physiological Reviews*, 94, 81-140p.
- Caliskan, F., 2015, Scorpion Venoms, 327-349p, <https://link.springer.com/referencework/10.107%2F978-94-007-6404-0> erişim tarihi: 4.01.2018.
- Caliskan, F., Garcia, B., Coronas, F., Batista, C.V., Zamudio, F., Possani, L.D., 2006, Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: Peptides and genes, *Toxicon*, 48, 12-22p.
- Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Batista, C.V., Zamudio, F.Z., Coronas, F.I., Possani, L.D., 2012, Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: general characterization of the venom and description of Bu1, a potent mammalian Na⁺ channel α -toxin, *Toxicon*, 59, 408–415p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Camargos, T.S., Restano-Cassulini, R., Possani, L.D., Peigneur, S., Tytgat, J., Schwartz, C.A., Alves, E.C., Freitas, S.M., Schwartz, E.F., 2011, The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*, *Peptides*, 32, 1509–1517p.
- Chen, R., Chung, S.H., 2012, Binding modes and functional surface of anti- mammalian scorpion a-toxins to sodium channels, *Biochemistry*, 51, 7775–7782p.
- Chen, Z., Luo, F., Feng, J., Yang, W., Zeng, D., Zhao, R., Cao, Z., Liu, M., Li, W., Jiang, L., Wu, Y., 2013, Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins, *PLoS One*, 8, doi:10.1371/journal.pone.0060201.
- Chen, Z.Y., Hu, Y.T., Yang, W.S., He, Y.W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R.M., Ding, J.P., Li, W.X., Wu, Y.L., 2012, Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion kunitz-type potassium channel toxin family, *The Journal of biological chemistry*, 287, 13813-13821p.
- Chippaux, J.P., 2012, Emerging options for the management of scorpion stings, *Drug Design Development and Therapy*, 6, 165–173p.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008, Epidemiology of scorpionism: a global appraisal, *Acta Tropica*, 107, 71-9p.
- Chuang, R.S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., Swartz, K.J., 1998, Inhibition of T- type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin, *Nature Neuroscience*, 1, 668-674p.
- Couraud, F., Jover, E., Dubois, J.M., Rochat, H., 1982, Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel, *Toxicon* 20, 9–16p.
- Cremonese, C.M., Maiti, M., Peigneur, S., Cassoli, J.S., Dutra, A.A., Waelkens, E., Lescrinier, E., Herdewijn, P., de Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., Arantes, E.C., Tytgat, J., 2016, Structural and functional elucidation of peptide Ts11 shows evidence of a novel subfamily of scorpion venom toxins, *Toxins*, 8, 1-14p.
- Debin, J.A., Maggio, J.E., Strichartz, G.R., 1993, Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion, *American Journal of Physiology*, 264, 361-9p.
- Debin, J.A., Strichartz, G.R., 1991, Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*, *Toxicon*, 29, 1403-1408p.
- Demirsoy, A., 1997, Yaşamın Temel Kuralları, Meteksan Yayınevi, Cilt II-Kısım I, Ankara, 734-740s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Diego-García, E., Peigneur, S., Debaveye, S., Gheldof, E., Tytgat, J., Caliskan, F., 2013, Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae), *Toxicon*, 61, 72–82p.
- Diego-García, E., Schwartz, E.F., D'Suze, G., Gonzalez, S.A.R., Batista, C.V.F., García, B.I., Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2007, Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain b-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of “orphan” components, *Peptides*, 28, 31-37p.
- Giangiacomo, K.M., Garcia, M.L., McManus, O.B., 1992, Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle, *Biochemistry*, 31, 6719-6727p.
- Goldstein, S.A., Miller, C., 1993, Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K^p channel, *The European Biophysics Journal*, 65, 1613-1619p.
- Gopalakrishnakone, P., 2002, k-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity., *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 30040-30047p.
- Gordon, D., Gurevitz, M., 2003, The selectivity of scorpion toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface, *Toxicon*, 41, 125-8.
- Götze, S., Saborowski, R., 2011, NanoDrop fluorometry adopted for microassays of proteasomal enzyme activities, *Anal Biochemistry*, 15, 203-5p.
- Incesu, Z., Caliskan, F., Zeytinoglu, H., 2005, Cytotoxic and Gelatinolytic Activities of *Mesobuthus Gibbosus* (Brullé, 1832) Venom, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36.
- Isbister, G.K., Bawaskar, H.S., 2014, Scorpion envenomation, *The New England Journal of Medicine*, 371, 457-463p.
- Jouirou, B., Mouhat, S., Andreotti, N., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2004, Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels, *Toxicon* 43, 909-914p.
- Khosravani, H., Zamponi, G.W., 2006, Voltage-gated calcium channels and the idiopathic generalized epilepsies, *Physiological Reviews*, 86, 941-966p.
- Knaus, H.G., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., Slaughter, R.S., 1995, [¹²⁵I] margatoxin, an extraordinarily high affinity ligands for voltage-gated potassium channels in mammalian brain, *Biochemistry*, 34, 13627-13634p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuzmenkov, A.I., Krylov, N.A., Chugunov, A.O., Grishin, E.V., Vassilevski, A.A., 2016, Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom, Database, 1-7p.
- Kuzmenkov, A.I., Vassilevski, A.A., Kudryashova, K.S., Nekrasova, O.V., Peigneur, S., Tygat, J., Feofanov, A.V., Kirpichnikov, M.P., Grishin, E.V., 2015, Variability of Potassium Channel Blockers in Mesobuthus eupeus ScorpionVenom with Focus onKv1.1: an Integrated Transcriptomic and Proteomic Study, Journal of Biological Chemistry, doi:10.1074/jbc.M115.637611.
- Laraba-Djebari, F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., 2015, Scorpion Venoms: Pathogenesis and Biotherapies, Scorpion Venoms, 4, 63-85p.
- Li W., Dai C, Ma Y, Zhao Z, Zhao R, Wang Q, Wu Y, Cao Z., 2008, Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. Antimicrob Agents Chemother, 52, 3967-3972p.
- Lourenço, W.R., 2016, Scorpion incidents, misidentification cases and possible implications for the final interpretation of results, Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, doi: 10.1186/s40409-016-0075-6.
- Luna-Ramírez, K., Jiménez-Vargas, J.M., Possani, L.D., 2016, Scorpine-Like Peptides, Single-Cell Biology, 5, 2p.
- Martin-Eauclaire, M., Pimenta, A., Bougis, P., De Lima, M., 2016, Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus (Lutz and Mello, 1922), Toxicon, doi: /10.1016/j.toxicon.2016.06.016.
- Meves, H., Simard, J.M., Watt, D.D., 1986, Interactions of scorpion toxins with the sodium channel, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 479, 113–132p.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., Phillips, A., 1985, Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle, *Nature*, 313, 316-318p.
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2004, Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels, *The Biochemical Journal*, 378, 717-726p.
- Ortiz, E., Rendon-Anaya, M., Rego, S.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2014, Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1738-1746p.
- Ouadid-Ahidouch, H., Chaussade, F., Roudbaraki, M., Slomianny, C., Dewailly, E., Delcourt, P., Prevarskaya, N., 2000, KV1.1 K^+ Channels Identification in Human Breast Carcinoma Cells: Involvement in Cell Proliferation, 278, 272-277p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999, Scorpion toxins specific for Nachannels, *European Journal of Biochemistry*, 264, 287- 300p.
- Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Shwartz, E.F., Becerril, B., Corzo, G., Possani, L.D., 2011, Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression, *Toxicon*, 58, 644–663p.
- Rodrigo, C., Gnanathanan, A., 2017, Management of scorpion envenoming: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials, *Systematic Reviews*, 6, 74p.,
- Rodriguez de la Vega, R.C., Merino, E., Becerril, B., Possani, L.D., 2003, Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins, *Trends in Pharmacological Sciences*, 5, 222-227p.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2005, Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution, *Toxicon*, 46, 831–44p.
- Rodríguez-Raveloa, R., Restano-Cassulini, R., Z. Zuñiga-Zamudio, F., Coronas, F., Espinosa-López, G., Possani L.D., 2014, A K⁺ channel blocking peptide from the Cuban scorpion *Rhopalurus garridoi*, *Peptides*, doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.010.
- Santibáñez-López, C.E., Cid-Urbe, J.I., Z. Zamudio, F., Batista, C., Ortiz, E., Possani, L.D., 2017, Venom gland transcriptomic and venom proteomic analyses of the scorpion *Megacormus gertschi* Díaz-Najera, 1966 (Scorpiones: Euscorpiidae: Megacorminae), *Toxicon*, doi: 10.1016/j.toxicon.2017.05.002.
- Santibáñez-López, C.E., Jimena, C.U., Cesar, B., Ortiz, E., Possani, L.D., 2016, Venom Gland Transcriptomic and Proteomic Analyses of the Enigmatic Scorpion *Superstitionia donensis* (Scorpiones: Superstitioniidae), with Insights on the Evolution of Its Venom Components, *Toxins*, 8, 367p.
- Sidach, S.S., Mintz, I.M., 2002, Kurtotoxin, a gating modifier of neuronal high and low-threshold Ca channels, *The Journal of Neuroscience*, 22, 2023-2034p.
- Simms, B.A., Zamponi, G.W., 2014, Neuronal voltage gated calcium channels: structure, function and dysfunction, *Neuron*, 82, 24-45p.
- Smith, J., Alewood, P., 2014, Modern venom profiling: mining into scorpion venom biodiversity, *Scorpion Venoms*, 4, 1-15p.
- Soleglad, M.E., Fet, V., Kovarik, F., Yağmur, E.A., 2012, Etudes on Iurids, V. Further Revision of Iurus Thorell, 1876 (Scorpiones: Iuridae), with a description of a new genus and two new species, *Euscorpius*, 143, 1–70p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Srinivasan, K.N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T.K.S., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., San, B.C.C., Ranganathan, S., Bowie, H.J., Kini, R.M., Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., 2000, Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*, *European Journal of Biochemistry*, 267, 5023-5025p.
- Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., Van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1999, A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies, *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 444-447p.
- Tytgat, J., Debont, T., Rostoll, K., Vandenberghe, I., Desmet, J., Verdonck, F., Daenens, P., Van Beeumen, J., van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1998, Purification and partial characterization of a short insect toxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*, *FEBS Letters*, 441, 387-391p.
- Ucar, G., Tas, C., 2003, Cholinesterase Inhibitory Activities of the Scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) Venom Peptides, *FABAD journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 61-70p.
- Valdez-Velazquez, L.L., Quintero-Hernández, V., Romero-Gutierrez, M.T., Coronas, F.I., Possani, L.D., 2013, Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*, *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0066486.
- Valdez-Velazquez, L.L., Romero-Gutierrez, M.T., Delgado-Enciso, I., Dobrovinskaya, O., Melnikov, V., Quintero-Hernandez, V., Ceballos-Magana, S.G., Gaitan-Hinojosa, M.A., Coronas, F., Possani, L.D., vd., 2016, Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities, *Toxicon*, 118, 95-103p.
- Valdivia, H.H., Martin, B.M., Escobar, L., Possani, L.D., 1992, Noxiustoxin and leiurotoxin III, two homologous peptide toxin with bonding properties to synaptosomal membrane K^p channels, *Biochemistry International Journal*, 27, 953-962p.
- Vazquez, J., Feigenbaum, P., King, V.F., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1990, Characterization of high affinity binding sites for Charybdotoxin in synaptic plasma membrane from rat brain, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 15564-15571p.
- Wang, W.X., Ji, Y.H., 2005, Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vitro and inhibits glioma tumor growth in vivo, *The Journal of Neuro-Oncology*, 73, 1-7p.
- Waxman, S.G., Zamponi, G.W., 2014, Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets, *Nature Neuroscience*, 17, 153-163p.

- Webber, M.M., Graham, M.R., Jaeger, J.R., 2012, *Wernerius inyoensis*, an elusive new scorpion from the inyo mountains of California (scorpiones, vaejovidae), *Zookeys*, 177, 1–13p.
- Yagmur, E.A., Koc, H., Kunt, K.B., 2009, Description of a new species of *Leiurus Ehrenberg*, 1828 (Scorpiones: Buthidae) from southeastern Turkey, *Euscorpius*, 85, 1–22p.
- Yagmur, E.A., Koc, H., Tropea, G., Yesilyurt, F., 2013, Scorpion fauna of Hatila Valley National Park (Artvin, Turkey), *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 3, 15–22p.
- Yagmur, E.A., Tropea, G., 2016, Two New Species of *Euscorpius* Thorell, 1876 from Southern Turkey (Scorpiones: Euscorpiidae), *Euscorpius*, 234, 1p.
- Yu, N., Tucker, K.R., Levitan, E.S., Shepard, P.D., Canavier, C.C., 2014, Implications of cellular models of dopamine neurons for schizophrenia, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 123, 53–82p.
- Zamponi, G.W., 2016, Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases, *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 19–34p.
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., Dolphin, A.C., 2015, The physiology, pharmacology and pathology of voltage-gated calcium channels and their therapeutic potential, *Pharmacological Reviews*, 67, 821–870p.
- Zeng, X.C., Luo, F., Li, W.X., 2006, Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides, *Peptides*, 27, 1745–1754p.
- Zhang, X.Y., Zhang P.Y., 2016, Scorpion venoms in gastric cancer, *Oncology Letters*, 12, 3683–3686p.
- Zhen, X.C., Zhang, L., Nie, Y., Luo, X., 2012, Identification and molecular characterization of three new K_p-channel specific toxins from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch revealing intronic number polymorphism and alternative splicing in duplicated genes, *Peptides*, 34, 311–323p.
- Zhu, H.L., Wassall, R.D., Cunnane, T.C., Teramoto, N., 2009, Actions of kurtotoxin on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na⁺ currents, NaV1.6, in murine deferens myocytes, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379, 453–460p.