

Leiurus abduallahbayrami Türü Akrep Venomunun Proteomik Analizi

Volkan Ulutaş

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Nisan 2017



Proteomic Analyses of *Leiurus abduallahbayrami* Scorpion Venom

Volkan Ulutaş

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

April 2017

Leiurus abduallahbayrami Türü Akrep Venomunun Proteomik Analizi

Volkan Ulutaş

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmelięi Uyarınca

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı'nda

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Figen Çalışkan

Nisan 2017

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Volkan Ulutaş' ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Leiurus abduhbayrami* Türü Akrep Venomunun Proteomik Analizi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Figen Çalışkan

İkinci Danışman : —

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye : Prof. Dr. Süleyman AYDIN

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 “Leiurus abduhbayrami Türü Akrep Venomunun Proteomik Analizi ” 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. 21/04/2017

Volkan Ulutaş

İmza

ÖZET

Leiurus abduallahbayrami Güneydoğu Anadolu bölgesinde yayılış gösteren ve halk sağlığı açısından önemli bir akrep türüdür. Bu çalışma Türkiye için endemik bir değeri olan *Leiurus abduallahbayrami*' nin sahip olduğu venom içeriğinin aydınlatılmasına odaklanmıştır.

Akreplerden ham venom elektostimülasyon tekniği kullanılarak elde edilmiştir. Ham venomun kromatografik olarak ayrımı Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi' nde (HPLC) gerçekleştirilmiş ve en az 42 farklı fraksiyon elde edilmiştir. 33, 01 alıkonma zamanına sahip letal ve majör bileşenlerden olan peptid belirlenmiş ve çalışmalara bu peptid ile devam edilmiştir. Peptidin moleküler ağırlığı kütle spektrometresi (MS) ile 6809,55 Da. olarak bulunmuştur. Protein sekanslama çalışmaları Edman degradasyonu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Asp-N endopeptidaz enzimi ile yıkılarak sekanslanan saf peptidin 64 aminoasit uzunluğuna sahip, 4 disülfid bağı ile paketlenmiş olduğu belirlenmiştir. Tüm dizilim VRDGYIAKPENCVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGH CGFKLGHGIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK olarak bulunmuştur. BLAST benzerlik analizi ile peptid dizilimine en yakın dizilim %98' lik oranla *Leiurus quinquestriatus habreus*' tan saflaştırılan Lqh6 peptidi olarak bulunmuştur. Yapısal özelliklerinden yola çıkılarak elektrofizyolojik çalışmalar Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 ve Nav1.7 kanalları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Peptidin özellikle Nav1.1 Nav1.3 ve Nav1.4 kanalları olmak üzere çalışılan tüm Na⁺ kanalları üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir.

Bu tez çalışması ile *Leiurus abduallahbayrami* nedeni ile oluşan zehirlenmelerdeki semptomların aydınlatılması ve mekanizmasının açıklanabilmesi için 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip toksik peptidin birincil yapısı aydınlatılmış, elektrofizyolojik teknikler ile etkin olduğu iyon kanalı belirlenmiş ve bilgilerimize göre *Leiurus abduallahbayrami* türünden ilk saflaştırılan peptid olması nedeni ile **Lab1** olarak adlandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Leiurus abduallahbayrami*, akrep, toksin, kütle spektrometresi, aminoasit sekanslama, elektrofizyoloji

SUMMARY

Leiurus abduallahbayrami is a kind of scorpion spreading in the Southeastern part of Turkey and important for public health. This study focused on illuminating the venom content of *Leiurus abduallahbayrami*, an endemic value for Turkey.

Crude venom was obtained by electrostimulation technique from scorpions. Chromatographic separation of crude venom was performed on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and at least 42 different fractions were obtained. The peptide has 33,01 RT, lethal and major was determined. Studies were continued with this peptide. The molecular weight of the peptide was determined by mass spectrometry (MS) to 6809.55 Da. Protein sequencing studies were performed by Edman degradation method. It was determined that the pure peptide sequenced by digestion with Asp-N endopeptidase enzyme has a length of 64 amino acids and packaged with 4 disulfide bonds. All sequences were found as VRDGYIAKPENCVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGFIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK. By BLAST similarity analysis, the closest sequence to peptide sequence was found as 98% of Lqh6 peptide purified from *Leiurus quinquestriatus habreus*. From the structural characteristics, electrophysiological studies were carried out on the channels Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 and Nav1.7. Peptide was found effective on all type of Na⁺ channel types. Particularly effective on Nav1.1 Nav1.3 and Nav1.4 channels.

In this thesis study, the primary structure of toxic peptide with a retention time of 33.01 minutes was elucidated in order to clarify the mechanism and the illumination of the symptoms, electrophysiological techniques are effective in determining ion channels of poisoning caused by *Leiurus abduallahbayrami*. For our information, it is called Lab1 with the reason that it is the first purified peptide from *Leiurus abduallahbayrami*.

Keywords: *Leiurus abduallahbayrami*, scorpion, toxin, amino acid sequencing, mass spectrometry, electrophysiology

TEŞEKKÜR

Danışmanlığımı üstlenerek Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı'nda çalışmaya başladığım ilk günden bugüne bilgi ve deneyimlerini hiç esirgemeyen, yalnız bir öğretmen değil aynı zamanda da bir yol gösterici olan, bilimsel çalışmalarım kadar hayatıma da yön veren çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN'a sonsuz teşekkürler.

Akreplerin toplanma ve bakım aşamasındaki değerli katkılarından ayrıca gerek akademik gerekse sosyal hayatımda her türlü desteği veren hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Hakan ÇALIŞKAN'a (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü); danışman hocamın iş arkadaşı alanında sonsuz bir bilgi ve deneyim birikimine sahip olup bu birikimlerini ve laboratuvarının tüm imkanlarını bana sunan Ulusal Meksika Otonom Üniversitesi [UNAM], Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Tıp ve Biyoproses Bölümü'nden değerli hocam Sayın Prof. Dr. Lourival Domingues Possani POSTAY'a, ekibinden; biyokimyasal çalışmalarına ve yorumlarına yardımcı olan Sayın Fredy Coronas VALDERAMMA'ya, Sayın Fernando Zamudio ZÚÑIGA'ya, elektrofizyoloji çalışmalarına yardımcı olan Sayın Rita Restano-CASSULINI'ye paylaştıkları bilgi ve deneyimlerden; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı Yüksek Lisans öğrencileri olan Biyolog Sebahat OLUÇAY ve Biyolog Gamze DALBUDAK'a sadece bir çalışma arkadaşı değil bir dost olmalarından; yaşamdan keyif almamın en büyük sebeplerinden biri olan ve güler yüzünü hiçbir zaman kaybetmemesinden dolayı Uzman Moleküler Biyolog Aylin DAL'a; hayatım boyunca hiçbir özveriden kaçınmadan sadece benim mutluluğumu düşünen, her kararına destek veren, maddi manevi her durumda arkamda olan, desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiren annem Dr. Zuhul ULUTAŞ'a, babam Dr. Haluk ULUTAŞ'a ve kardeşim Bora ULUTAŞ'a;

Vergilerini düzenli olarak vererek araştırmaların ve bilimsel çalışmaların gerçekleşmesine olanak sağlayan fonu yaratan Türk Halkı'na teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1.Akrep Fauna Çalışmaları.....	4
2.1.1. <i>Leiurus abduhbayrami</i> türü ve Türkiye’ deki dağılımı.....	5
2.2.Akrep Venomları ve Peptid Toksinler	5
2.2.1. Sodyum kanallarına etkili peptid toksinler	6
2.2.2. Potasyum kanallarına etkili peptid toksinler.....	6
2.2.3. Kalsiyum kanallarına etkili peptid toksinler.....	7
2.2.4. Klor kanallarına etkili peptid toksinler.....	8
2.3.Akrep Venomlarının Sahip Olduğu Diğer Farmakolojik Potansiyelleri	8
2.4.Akrep Venomlarından Saflaştırılan Peptidlerin Halk Sağlığı Açısından Önemi	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	12
3.1.2. Kullanılan çözeltiler.....	13
3.1.3. Kullanılan cihazlar.....	14
3.2.Yöntem.....	15
3.2.1. Akreplerin toplanması ve bakımı	15
3.2.2. Ham venom eldesi.....	17
3.2.3. Peptid karışımının eldesi ve peptid miktarının belirlenmesi	17

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.4. Ham venomun yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayrımı ve peptid izolasyonu.....	17
3.2.5. Toksikite çalışmaları	18
3.2.6. Peptid moleküler ağırlık belirleme çalışmaları	18
3.2.7. Alkilasyon ve indirgeme çalışmaları.....	19
3.2.8. Enzimatik yıkım çalışmaları.....	19
3.2.9. Peptid aminoasit dizisi belirleme ve sekans karşılaştırma çalışmaları.....	19
3.2.10. Elektrofizyoloji çalışmaları (Hücre kültürü/ Patch Clamp).....	20
3.2.11. Filogenetik analiz.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Akrelerin Eldesi, Bakımı ve Beslenmesi Sonuçları	22
4.2. Ham Venom Eldesi Sonuçları.....	22
4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Ayrımı ve Peptid İzolasyonu Sonuçları.....	22
4.4. Toksikite Çalışmaları Sonuçları.....	25
4.5. Peptid Moleküler Ağırlık Belirleme Çalışmaları Sonuçları.....	26
4.6. Peptid Aminoasit Dizisi Belirleme Çalışmaları Sonuçları.....	29
4.7. Filogenetik Analiz.....	33
4.8. Elektrofizyoloji Çalışmaları Sonuçları.....	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Scorpionizm' in etkilediği ülkeler ve insidansı.....	11
3.1. <i>Leiurus abduallahbayrami</i> türü akrebin genel ve UV ışık altındaki görüntüsü.....	15
3.2. a. <i>Leiurus abduallahbayrami</i> türü akrebin Türkiye'deki dağılımı	
b. Çalışmalarda kullanılan akreplerin toplandığı bölge.....	16
4.1. <i>Leiurus abduallahbayrami</i> türü akrebin ham venomunun HPLC ile ayırımına ait kromatogram.....	23
4.3. Alkilasyon ve indirgeme çalışmaları sonrası gerçekleştirilen kromatografik ayırım sonucu.....	27
4.4. 33,27 ve 34,28 dakika alıkonma zamanına sahip alkile peptidlerin moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları.....	28
4.5. 33,27 dakika alıkonma zamanlı alkile peptidin moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları.....	29
4.6. Peptidin Asp-N endopeptidaz enzimi ile yıkımı ardından gerçekleştirilen kromatografik ayırma ait kromatogram.....	30
4.7. 23,88 ve 25,26 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonların moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları.....	31
4.8. 31,27 ve 32,83 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonların moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları.....	32
4.9. 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin ilk okumada elde edilen aminoasit dizilimi.....	33
4.10. Lqh6 peptidinin aminoasit dizilimi.....	33
4.11. Teorik kesim sonrası elde edilen parçaların manuel olarak konumlandırılması.....	34
4.12. 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin aminoasit dizilimi.....	35
4.13. Lab1 peptidi ile Lqh6 peptidinin aminoasit karşılaştırması.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. a) Na _v 1.1, b) Na _v 1.2, c) Na _v 1.3, d) Na _v 1.4 kanalları ile gerçekleştirilen elektrofizyoloji çalışmaları sonuçları.....	36
4.15. a) Na _v 1.5, b) Na _v 1.6, c) Na _v 1.7 kanalları ile gerçekleştirilen elektrofizyoloji çalışmaları sonuçları.....	37
4.16. Elektrofizyoloji çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin normalizasyon sonuçları.....	38
5.1. Lab1 peptidinin Lqh6, Lqh 7 ve Lqh 3 peptidlerinin aminoasit dizilimlerinin benzerlik karşılaştırılması ve oranları.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

4.1. <i>Leiurus abduallahbayrami</i> türü akrebin ham venomundan elde edilen fraksiyonlar.....	24
4.2. 20 µg peptidin intraperitoneal enjeksiyonu sonrası gözlenen semptomlar.....	25
4.3.a) Expasy/ Protein Prospector programında Lqh6' nın Asp-N endopeptidaz enzimi ile teorik kesimi sonuçları.....	35
4.4. Çalışmalarda kullanılan Na ⁺ kanallarının Lab1 peptidi ile muamelesi sonucu elde edilen T_{on} , T_{off} ve K_D değerleri.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
A	Alfa
RT	Alıkonma zamanı (Retention Time)
B	Beta
Glass Fiber Disc	Cam Fiber Disk (Glass Fiber Disc)
RPM	Dakikadaki Dönüş Sayısı (Repeat Per Minute)
Da	Dalton
ESI	Elektrosprey İyonizasyon (Electrospray Ionization)
Δ	Gamma
HEK	İnsan Embriyonik Böbrek (Human Embryonic Kidney)
K	Kalsiyum
K	Kappa
kV	Kilowatt
Cl ⁻	Klor
MS	Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry)
Mg	Miligram
Mm	Milimetre
mM	Milimolar
Ms	Milisaniye
mV	Milivolt
MBC	Minimum Bakterisel Konsantrasyonu
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
M	Molar
UV	Mor Ötesi Işık/Ultraviöle
nM	Nanomolar
KTxs	Potasyum kanal toksinleri
°C	Santrigrat Derece (Celcius)
LC	Sıvı Kromatografi (Liquid Chromatography)
Na	Sodyum

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar****Açıklama**

NaScTxS	Sodyum kanal toksinleri
Vd	Ve diğerleri
V	Volt
Charged Coupled Divice	Yüklenme İliştirilmiş Araç (Charged Coupled Divice)

Aminoasit Kısaltmaları**Kısaltmalar****Açıklama**

A	Alanin
R	Arjinin
N	Asparajin
D	Aspartik Asit
C	Sistein
Q	Glutamin
E	Glutamik Asit
G	Glisin
H	Histidin
I	İzolösin
L	Lösin
K	Lizin
M	Metiyonin
W	Fenilalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Treonin
W	Triptofan
Y	Tirozin
V	Valin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akrepler doğal yaşam ortamlarına son derece etkin bir şekilde uyum sağlayarak 430 milyon yıldır Dünya’ da yaşamlarını sürdüren avcı hayvanlardır (Martin-Eauclaire vd., 2016, Ortiz vd., 2015). Akrep venomları (hayvan kaynaklı toksinler) çok farklı etkinliklerdeki nörotoksik ve sitotoksik moleküllerdir. Enzimlerin, reseptörlerin ve özellikle iyon kanallarının aktivitelerinde değişimlere neden oldukları bilinmektedir. Merkezi ve periferik sinir sistemini, kardiyovasküler, nöromusküler ve gastrointestinal sistemin, kan koagülasyonunun ve homeostazın düzenini değiştiren moleküllerdir. Ayrıca hedeflerine olan yüksek derecedeki özgünlükleri nedeniyle hem ilaç geliştirme alanında prototip ve farmakolojik araç olarak hem de günümüzde tıp alanında kullanılmaktadır. Son yıllardaki kullanılan yeni biyoteknolojik görüntüleme sistemleri ile birlikte kullanım alanları giderek artmaktadır (Cohen-Inbar vd., 2016).

Günümüze kadar akrep toksinleri hakkındaki birçok çalışma venomların direkt ya da dolaylı etkilerini yok etmek amacı ile anti-venom geliştirilmesine odaklanmıştır. Ancak, son yıllarda venom peptidlerin iyiletim amaçlı potansiyelleri üzerine yapılan araştırmaların sayısı giderek artmaktadır. Yeni geliştirilen biyoteknolojik araç ve yöntemlerin kullanılması ile birlikte “omik” bilimlerin en yeni üyelerinden olan “venomik” kapsamındaki çalışmalar doğal ürün temelli ilaç keşiflerinde umut verici sonuçlar vermektedir.

Akrep zehirlenmeleri nedeni ile oluşan toksisitenin mekanizma araştırmaları yeni geliştirilen teknolojiler ile birlikte ham venomdan elde edilen fraksiyonlar ya da toksin peptidler kullanılarak *in vitro*, *ex-vivo* ve *in vivo* olarak gerçekleştirilmektedir.

Venom peptidlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması biyoteknolojik süreçlerdeki mümkün olan kullanım alanlarını ortaya çıkartmakta ve doğal biyoaktif bileşenler olarak venom toksinlerin gelecek vaat eden moleküller olduğunu ortaya koymaktadır. Ülkemiz yüksek bir biyoçeşitliliğe sahip olduğu kadar venom çeşitliliğine de sahiptir. Buna rağmen ne yazık ki ülkemizde hayvan venomlarının iyiletim amaçlı kullanılmasına katkı sağlayacak araştırmaların sayısı yok denecek kadar azdır.

Bu tez çalışmasının amacı Türkiye'ye endemik, Gaziantep ili ve çevresinde dağılıma sahip olan *Leiurus abduhbayrami* türü akrebin sahip olduğu venom içeriğinin aydınlatılmasıdır. Bu amaçla; akrepler araziden toplanarak, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı'na getirilmiş ve bakımları yapılmıştır. Elde edilen ham venom kromatografik teknikler ile ayrıştırılmış, içlerinden 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip toksik peptidin birincil yapısı aydınlatılmıştır. Elektrofizyolojik teknikler ile etkin olduğu iyon kanalı belirlenmiş ve bilgilerimize göre *Leiurus abduhbayrami* türünden ilk saflaştırılan peptid olması nedeni ile **Lab1** olarak adlandırılmıştır. *Leiurus abduhbayrami* nedeni ile oluşan zehirlenmelerdeki semptomların aydınlatılması ve mekanizmasının açıklanması için ham venomun sahip olduğu bileşenlerin araştırılması son derece önemlidir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Akrep venomları; peptidlerin temel rol oynadığı çeşitli farmakolojik ve fizyolojik özelliklere sahip biyoaktif bileşenlerin kompleks karışımlarıdır (Caliskan vd., 2013). Bu kompleks sıvı karışım; peptidlerden, enzimlerden, mukoproteinlerden, serbest aminoasitlerden, nükleotidlerden, lipidlerden, aminlerden, heterosiklik komponentlerden, inorganik tuzlardan, hormonlardan, enzim inhibitörlerinden ve halen tanımlanmayı bekleyen birçok molekülden oluşmaktadır (Ortiz vd., 2015, Abdel-Rahman vd., 2008).

Her bir peptidin özgül amaçlar için venom içerisinde bulunduğu ve özgün ihtiyaçlara göre görev aldıkları düşünülmektedir. Ancak çok fazla sayıda olduğu bilinen peptidler konusundaki bilgiler hala sınırlı sayıdadır. Akreplerin 430 milyon yıldır Dünya’da yaşadıkları ve günümüzde 2324 türü olduğu bilinmesine karşın sadece yaklaşık 80 farklı türün venomlarından peptid ve proteinler izole edilmiş ayrıca yapıları aydınlatılarak literatüre kazandırılmıştır (Martin-Eauclaire vd., 2016, Rein, 2012). Akrep türlerinin 100.000’den fazla polipeptid sayısına sahip olduğu ön görülmektedir. Proteomik analizlerin tek bir akrep venomunda 100’den fazla peptid bileşenin bulunabileceğini göstermesine rağmen son 30 yıldır venom tanımlama çalışmaları ile günümüze kadar yaklaşık 1000 farklı akrep venom peptidi tanımlanabilmiştir.

Akrep peptid toksinleri birçok farklı kritere göre sınıflandırılmaktadır. Güncel sınıflandırma türü temel olarak disülfid köprüsü içeren ve içermeyen peptidler şeklindedir. Bu sınıflandırmaya ek olarak moleküler büyüklüklerine göre uzun zincirli toksinler ve kısa zincirli toksinler olarak da iki sınıfa ayrılmaktadır. Farklı organizma çeşitlerindeki etkinliklerine göre ise memelilere, böceklerle ve kabuklulara özgün toksinler olarak sınıflandırılmaktadır. Etki mekanizmalarına göre sınıflandırıldıklarında ise nörotoksik ya da sitotoksik olarak ayrılmaktadırlar. Disülfid köprüsü içeren peptidler iyon kanallarına tanımlı olan farmakolojik fonksiyonlarına göre; Na⁺ kanal toksinleri, K⁺ kanal toksinleri, Cl⁻ kanal toksinleri ve Ca²⁺ kanal toksinleri olmak üzere dört farklı sınıf olarak gruplandırılmaktadır (Possani vd., 2001). Yapılan çalışmalar ile disülfid köprüsü içermeyen fakat iyon kanallarına etkili peptidlerin varlığı da gösterilmiştir (Zhijian vd., 2006).

2.1. Akrep Fauna Çalışmaları

Akrelerin Dünya' da Antarktika kıtası dışında kalan tüm coğrafyalara dağıldıkları bilinmektedir. Günümüze kadar tanımlanmış 16 familya, 210 cins ve 2324 türü bulunmaktadır (www.ub.ntnu.no/scorpion-files). Akrelerde; Bothriuridae familyası 16 cins ve 151 tür, Buthidae familyası 90 cins 1105 tür, Caraboctonidae familyası 4 cins 32 tür, Chactidae familyası 15 cins 198 tür, Chaerilidae familyası 1 cins 42 tür, Euscorpiidae familyası 11 cins 134 tür, Hemiscorpiidae familyası 1 cins 15 tür, Heteroscorpionidae familyası 1 cins 6 tür, Hormuridae familyası 11 cins 83 tür, Iuridae familyası 4 cins 14 tür, Pseudochactidae familyası 3 cins 6 tür, Scorpionidae familyası 21 cins 309 tür, Superstitioniidae familyası 1 cins 1 tür, Troglotayosicidae familyası 2 cins 5 tür, Typhlochactidae familyası 4 cins 11 tür, Urodacidae familyası 1 cins 19 tür ve Vaejovidae familyası 24 cins 211 tür olarak sınıflandırılmıştır.

Türkiye akrep faunasının Buthidae, Iuridae, Scorpionidae ve Euscorpiidae olmak üzere 4 familyaya ait 39 tür içerdiği bilinmektedir. Buthidae familyası insanlarda zehirlenmelere ve ölümlere neden olarak halk sağlığını önemli ölçüde etkilediği için halk sağlığı açısından önemlidir. Bu familya 12 tür içerir: *Androctonus crassicauda*, *Buthacus macrocentrus*, *Compsobuthus matthiesseni*, *Compsobuthus schmiedeknechti*, *Hottentotta saulcyi*, *Leiurus abduhbayrami*, *Mesobuthus eupeus*, *Mesobuthus phillipsii*, *Mesobuthus nigrocinctus*, *Mesobuthus gibbosus*, *Mesobuthus caucasicus* ve *Orthochirus zagrosensis* (Yağmur vd., 2009). Iuridae familyası 9 tür içerir: *Calchas birulai*, *Calchas kosswigi*, *Calchas anlasi*, *Calchas nordmanni*, *Neocalchas gruberi*, *Protoiurus asiaticus*, *Protoiurus kadleci*, *Protoiurus kraepelini* ve *Iurus kinzelbachi* (Solegdad vd., 2013). Euscorpiidae familyası ise 17 tür içerir: *Euscorpius avcii*, *Euscorpius rahsenae*, *Euscorpius mingrelicus* ve *Euscorpius italicus*. *Euscorpius aladaglarsensis*, *Euscorpius alanyaensis*, *Euscorpius arikani*, *Euscorpius eskisehirensis*, *Euscorpius gocmeni*, *Euscorpius hakani*, *Euscorpius honazicus*, *Euscorpius koci*, *Euscorpius lycius*, *Euscorpius phrygius*, *Euscorpius sultanensis*, *Euscorpius tauricus* ve *Euscorpius uludagensis* (Yağmur vd., 2016). *Scorpio maurus*, ise Scorpionidae familyasının ülkemizde bulunan tek türüdür.

2.1.1. *Leiurus abduallahbayrami* türü ve Türkiye’ deki dağılımı

Leiurus abduallahbayrami türü akrep Türkiye’ ye endemik bir türdür ve yoğun olarak Güneydoğu Anadolu bölgesinde Gaziantep, Adıyaman, Kilis, Şanlıurfa, Mardin illeri ve çevresinde dağılım göstermektedir. *Leiurus abduallahbayrami* türü 2009 yılına kadar *Leiurus quinquestriatus* türü olarak bilinmekteydi. Yapılan çalışmalar ile *Leiurus abduallahbayrami*’ nin tür bazında farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Bu tarihten itibaren Araknoloji dünyasına yaptığı katkılardan dolayı Prof. Dr. Abdullah Bayram’ a ithafen *Leiurus abduallahbayrami* adı verilmiş ve yeni bir tür olarak literatüre kazandırılmıştır (Yagmur vd. 2009).

2.2. Akrep Venomları ve Peptid Toksinler

Akrep venomlarının içeriğindeki peptid yapılarının biyolojik etkinlikte görev alan temel bileşikler olduğu bilinmektedir. Yapılan yapı ve fonksiyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler aracılığı ile en iyi bilinen peptidler uzun zincirli özellikle Na⁺ ve K⁺ kanallarına etkili peptidlerdir. Bu peptidler yüksek özgünlük ile bağlandıkları reseptörlerinin yapısal ve farmakolojik özelliklerinin tanımlanmasında rol oynayan bileşenlerdir. Venomların gastrointestinal sistemde işlev bozukluklarına yol açmak, hücre zar stabilizasyonunu tamamen ya da kısmen bozmak, merkezi ve periferik sinir sistemini bloke etmek, düz ya da çizgili kas aktivitesini değiştirmek gibi çok farklı fizyolojik etkilerde rol oynadığı bilinmektedir (Plessis vd., 2008).

Tanımlanmış akrep venom peptidlerinin birçoğu 20–75 aminoasit uzunluğundadır. Hakkında daha az bilgi bulunan uzun yapılı proteinler (enzimatik yapıda olanlar) 120–370 aminoasit uzunluğundadır. Akrep venomlarının içeriğinde yer alan fakat özgül reseptörleri henüz tanımlanamamış olan birçok orphan (yetim) peptid de bulunmaktadır (Diego-Garcia vd., 2014).

Günümüze kadar 80’den fazla akrep türünden, çeşitli kanallar üzerinde etkili olan akrep toksinlerin yaklaşık 600 kadarının birincil yapısı ortaya çıkartılmıştır (Quintero-Hernández vd., 2013).

2.2.1. Sodyum kanallarına etkili akrep toksinleri

Sodyum kanalına etkili akrep toksinleri uzun zincirli peptidlerdir. Bu peptidler 60-76 aminoasit uzunluğuna sahip ve 4 disülfid köprüsünden oluşan, 6500-8500 Da. moleküler ağırlığa sahip peptidlerdir (Quintero- Hernández vd., 2013). Sahip oldukları $\beta\alpha\beta$ üç boyutlu yapısı yüksek oranda korunmuştur (Mouhat vd., 2004). Çekirdek üç disülfid köprüsü tarafından paketlenmiş durumdadır. Dördüncü disülfid köprüsü ise peptidin paketlenmesini sağlamaktadır. Çok fazla sayıda sınıflandırma biçimi ifade edilmiştir. En yaygın sınıflandırma sodyum geçişi mekanizmasına ve bağlanma şekillerine göre yapılanlardır. Sodyum geçişi mekanizmasına göre iki etki belirlenmiştir. Birincisi kanalın inaktivasyonunu yavaşlatırken diğeri ise aktivasyonu hızlandırmaktadır. Memeliler için spesifik nörotoksinler; α -tip nörotoksinler ve β -tip nörotoksinlerdir. Bunlardan α -tip nörotoksinler Na^+ kanallarının aktivasyonunu etkilemezken kanalın inaktivasyonunu yavaşlatır ve Na^+ kanal reseptörüne 3. bölgeden bağlanarak aksiyon potansiyelini uzatır. β -tip nörotoksinler Na^+ kanal reseptörüne 4. bölgeden bağlanarak kanal aktivasyonunu etkiler (Gordon vd., 1998). Bağlanma şekillerine göre ise Na^+ kanal reseptörüne 3. ve 4. bölgeden bağlanmak üzere iki farklı yapıda bağlanma özelliği gösteren toksinler olarak sınıflandırılmaktadır. Toksin α tip benzeri aktivite gösteriyor ise klasik, böceklere karşı etkili ve α - benzeri peptidler olmak üzere 3 alt gruba ayrılmaktadır.(Quintero- Hernández vd., 2013) Böceklere karşı etkili toksinler farklı yapı ve işlevlere göre uyarıcı böceklere karşı etkili toksinler ve depresan böceklere karşı etkili toksinler olarak da 2 grup altında sınıflandırılabilirler.

2.2.2. Potasyum kanallarına etkili akrep toksinleri

Potasyum kanallarına etkili akrep toksinler 20-75 aminoasit uzunluğuna sahip ve 3 ya da 4 disülfid köprüsünden oluşan peptidlerdir. NTX (noxiustoxin) akrep venomlarında belirlenen ilk K^+ kanal toksinidir (Possani, vd., 1982). Günümüze kadar UniProt veri tabanında K^+ kanalına etkili akrep toksinlerinin 275 kadarının birincil yapısı ve bunların fizyolojik özellikleri belirlenmiştir. Moleküler boyut göz önünde bulundurularak, sisteinlerin yeri ve bunların primer yapılarının benzerliğine göre K^+ kanal akrep toksinleri 4 familyaya ayrılmaktadır: α -KTx, β -KTx, γ -KTx ve κ -KTx (Diego-Garcia vd., 2013, Nirthanan, vd., 2005). α -KTx'ler en büyük familyadır, kısa zincirli K^+ kanal akrep toksin

familiyasındandır ve 26 alt familyaya (α -KTx 1-26) ait 200' den fazla üyesi bulunmaktadır (Diego-Garcia vd., 2013, Olamendi- Portugal, vd., 2005). β -KTx' ler 3 disülfid köprüsü ile bağlanmış 60-65 aminoasit uzunluğundadır ve AaTXKb, BmTXKb, BmTXKb2 ve TsTXKb olmak üzere 4 üyesi vardır (Legros, vd., 1998a) ve bunlardan sadece (TsTXK β) farmakolojik olarak karakterize edilmiştir (Gurrola, vd., 1999). δ -KTx familyasının üyesi olan ErgTx, *Centruroides noxius* venomundan izole edilmiştir, özellikle kas ve sinir hücrelerinin K⁺ kanalları üzerinde bloke edici özelliği olduğu ortaya çıkarılmıştır (Pardo-Lopez, vd., 2002). *Buthus tamulus* türü akrepten izole edilmiş olan Iberiotoxin kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının (K_{CaS}) geçirgenliğini azaltarak meme kanserinin (MCF7) önlenmesinde kullanılabilecek bir molekül olduğu belirlenmiştir (Chaisakul, vd., 2016).

2.2.3. Kalsiyum kanallarına etkili akrep toksinleri

Akrep venomlarından Ca⁺² kanalına spesifik birkaç akrep toksini izole edilmiştir. Bunlar *Pandinus imperator* türü akrepten IpTxA ve IpTxI (Valdivia ve Possani, 1998); ve *Scorpio maurus palmatus* türü akrepten Mca (maurocalcine)' dir (Fajloun, vd., 2000). IpTxA ve Mca bazik aminoasitler yönünden zengin tek zincirli polipeptidler olup, 33 aminoasitten oluşur ve çapraz bağlı 3 disülfid köprü içerirler (Cys3-Cys17, Cys10-Cys21, Cys16-Cys32). IpTxI 104 aminoasitten oluşan, 15 kDa molekül ağırlığına sahip büyük alt birimli bir heterodimerdir ve 27 aminoasit uzunluğunda kovalent bağlı küçük alt birime sahiptir. *Parabuthus transvaalicus* venomundan saflaştırılan Kurtoxin yüksek afiniteli α 1G T-tipi kalsiyum kanalına bağlanır ve voltaj bağımlı kapıların fonksiyonunu değiştirerek kanalı inhibe edebilir. Kurtoxin ayrıca voltaj kapılı Na⁺ kanalları ile de etkileşime girer ve inaktivasyonu yavaşlatır (Chuang, vd., 1998). Ayrıca *Parabuthus transvaalicus* akrebinden izole edilen Kurtoxin I ve II, fare spermatojenik hücrelerinde T-tipi Ca⁺² kanal aktivitesini azaltır ve olgun spermlerde akrozom reaksiyonunu inhibe eder. Aynı zamanda voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSCs) üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir. (Bourinet vd., 2016, Lopez-Gonzalez, vd., 2003).

2.2.4. Klor kanalına etkili akrep toksinleri

Cl⁻ kanalına etkili akrep toksinleri düşük molekül ağırlıklı polipeptidlerdir. Bu peptidler 35-38 aminoasit uzunluğuna sahiptir ve 4 disülfid köprüsü içerirler. Cl⁻ kanalına etkili akrep toksinlerinde sisteinlerin yeri korunmuş haldedir. Bugüne kadar Cl⁻ kanallarına etkili birçok akrep venom toksininin varlığı ortaya konmuştur. Bunlar I1, Ammp2, I3, I4, I5, I5A, IB peptidleri, Chlorotoxin, PBITx1, BmKCT, Bs-8 ve Bs14' tür.

Bunlardan en dikkat çekici olanı *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* akrebinin ham venomundan elde edilerek saflaştırılan 36 aminoasit uzunluğunda 4 sistenin bağı ile sıkıca paketlenmiş halde olan Chlorotoxin' dir. Chlorotoxin fare epitelindeki Cl⁻ kanallarını bloke edebilir ve özellikle glia hücrelerinde patolojik değişikliklerle Cl⁻ kanallarına bağlanarak neden olmaktadır (Zhijian, vd., 2006, Tytgat, vd., 1998). Devam eden araştırmalar yüksek afinite ile glioma hücrelerine bağlanabilen Chlorotoxin' in aynı zamanda seçici bir bağlanma özelliği gösterdiği ve normal ya da neoplastik hücrelere bağlanma eğiliminde olmadığını göstermiştir. Chlorotoxin' in MMP-2' ye olan yüksek afinitesi sayesinde hücre membranında konumlanan MMP-2/ Chlorotoxin bağlanması ile glioma hücrelerinin metastatik profilinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Cohen-Inbar, 2016). Chlorotoxin' in halen TM 601 isimli sentetik üretimi yapılmaktadır. Gelişen teknolojiler ile birlikte TM-601' in anti-tümoral ilaçlar ile birlikte kombine olarak uygulanması sonucu daha seçici ve etkin bir tedavi şekli geliştirilmeye çalışılmaktadır. Aynı zamanda yüksek seçicilik ile substratına bağlanması sayesinde MR gibi görüntüleme sistemleri ile birlikte çeşitli yeni nesil görüntülemelerde kullanılmak üzere çalışmalar sürmektedir (Cohen-Inbar vd., 2016). TM-601 araştırmaları şu anda faz II klinik deneyler aşamasındadır.

2.3. Akrep Venomlarının Sahip Olduğu Diğer Farmakolojik Potansiyelleri

Günümüze kadar birçok akrep türünden antikanser, anti-mikrobiyal, anti-epileptik özellik taşıyan ve jelatinolitik, fibrinolitik, kazeinolitik, hyaluronidaz, fosfolipaz gibi proteolitik ve enzimatik özellikler gösteren ve bu etkilere ek olarak da Na⁺, K⁺, Ca⁺² ve Cl⁻ kanallarına etkili çok sayıda molekül saflaştırılmıştır (Valdez- Valezquez vd., 2016).

Saflaştırma çalışmalarında kromatografik ve elektroforetik ayırıştırma yöntemleri, kütle spektrometresi, protein sekanslama cihazı gibi biyokimyasal temellere dayanan teknolojik cihazlar kullanılmaktadır. Saflaştırılan peptid ile daha ileri çalışmalar peptidin işlev ve fonksiyonunu aydınlatmaya yöneliktir. Bu çalışmalardan biri antikanser aktivitenin araştırılmasını kapsayan; hücre kültürü çalışmaları, immünohistokimyasal boyamalar, adhezyon- proliferasyon deneyleri, hücre canlılığı, kaspaz aktivasyonu, LDH testi gibi birçok apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü deneyleridir. Bu metodlar ve edinilen bilgiler ışığında akrep venom peptidlerden antikanser özelliğe sahip Chlorotoxin, BmK AGAP, BmKCT, Iberiotoxin, Magatoxin, Charybdotoxin, Bengalin, Neopladin 1 ve Neopladin 2 peptidleri saflaştırılmıştır ve kanser tedavisi için geliştirilme aşamasındadır (Chaisakul, vd., 2016, Ding vd., 2014).

Bir diğer çalışma anti- bakteriyal aktivite belirleme çalışmalarıdır. Bu çalışmalarda substrat olarak jelatin, fibrin, kazein, hyaluronik asit gibi substratlar kullanılarak gerçekleştirilen zimogram deneyleri, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC) çalışmaları yer almaktadır. Bu çalışmalar sonucunda çeşitli gram pozitif (*Staphylococcus aureus*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp) enfeksiyöz bakteriler üzerinde peptidin antibakteriyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Valdez- Velazquez vd., 2016).

İyon kanalları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar ise temel olarak saflaştırılan peptidin hangi iyon kanalı üzerinde, hangi mekanizma ile çalıştığını belirlemeyi temel almaktadır. Bu anlamda Patch-clamp ve Voltaj-clamp olarak adlandırılan iki farklı yöntem takip edilmektedir. Günümüze kadar saflaştırılan ve elektroforetik profili ortaya konan peptidlerin büyük bir çoğunluğu iyon kanalında bulunan reseptörüne bağlanarak kanalın açılıp kapanma mekanizmasını modifiye ederek ya da bloke ederek çalışmaktadır. Ancak Ryanodine gibi bazı Ca^{+2} kanalına bağlanmak yerine direkt kanaldan geçerek iskelet kaslarına etki etmektedir (Quintero- Hernández vd., 2013).

Elde edilen bulgular sonucunda peptidlerin sürekli doğal kaynakları olan akreplerden sağımının gerçekleştirilmesi yerine farklı teknikler ile elde edilen total mRNA' dan moleküler teknikler ile cDNA hazırlanması, rekombinant ve sentetik peptid üretimi de giderek popüler hale gelmektedir (Cohen-Inbar vd., 2016, Caliskan vd., 2006).

Günümüzde uluslararası literatüre kazandırılmış akrep venomları ile gerçekleştirilen biyokimyasal ve moleküler çalışmalara ek olarak ülkemiz akreplerinden 2006 yılından günümüze kadar 4 türün: *Androctonus crassicauda*, *Buthacus macrocentrus*, *Mesobuthus gibbosus* ve *Leiurus abduallahbayrami* venomları ile biyokimyasal ve moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda ham venom elektriksel uyarı ile akreplerden elde edilmiş ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılarak ayrıştırılmış, ardından peptidik bileşenin Edman reaksiyonu ile aminoasit dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen yüksek saflıktaki peptidin kütle spektrometresine uygulanması ile birincil yapısı ve molekül ağırlığı doğrulanmıştır. *Androctonus crassicauda*'dan 8 (Acra1-8 olarak adlandırılan), *Buthacus macrocentrus*'tan 1 (Bu1 olarak adlandırılan), *Mesobuthus gibbosus*' dan 3 (Meg1-3 olarak adlandırılan) olmak üzere toplam 12 venom peptid, grubumuz tarafından izole edilmiş, birincil yapısı tam ya da kısmen aydınlatılmış ve bioinformatik veri tabanlarına kaydedilmiştir (Caliskan vd., 2006; Caliskan vd., 2012; Caliskan vd., 2013; Diego-Garcia vd., 2013)

2.4. Akrep Venomlarından Saflaştırılan Peptidlerin Halk Sağlığı Açısından Önemi

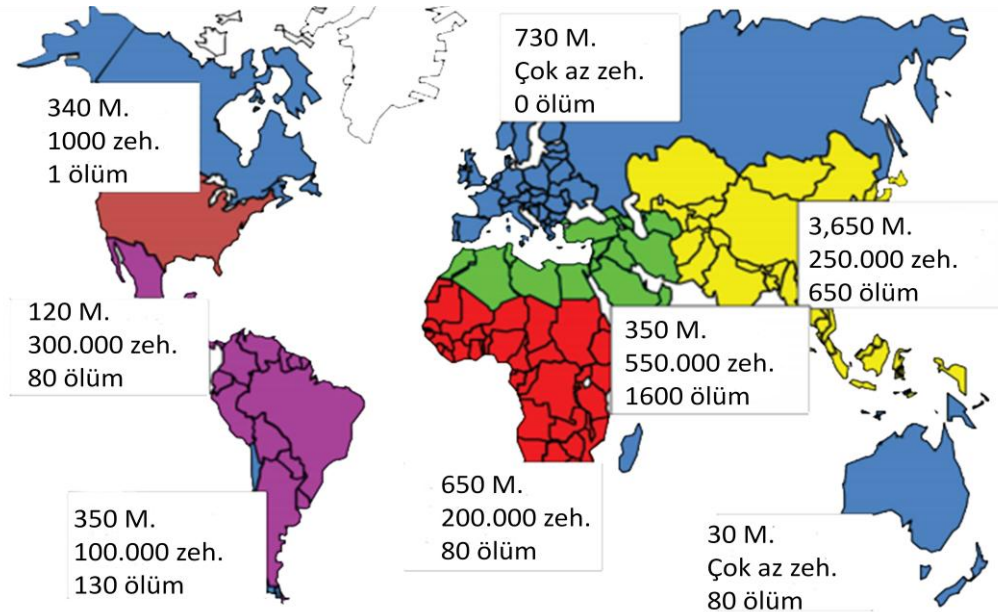
Akreplerin taş altları, ahırlar, evlerin bahçe ve içleri gibi halkın yaşam alanlarında hayatlarını sürdürmesi nedeni ile halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Zehirli hayvanlar olan akrepler insanlar için direkt doğal tehdit oluşturmalarında dikkatsizlik ya da kaza sonucu akrep tarafından sokulmalar ve bunun sonucu olarak da ölümler gerçekleşmektedir.

Yalnızca 30 akrep türünün insan sağlığı için tehlikeli olduğu bilinmesine rağmen dünyada yılda yaklaşık 1,5 milyon sokulma vakası kayıtlara geçmiş ve bu sokulmalar sonucunda da ölüm sayısının yaklaşık 2600 olduğu bildirilmiştir (Chippaux, 2012). Ancak kayıt altına alınamayan sokulma vakaları da sayılacak olursa bu değerler çok daha fazladır.

Akrep sokmalarının klinik çerçevede kardiyojenik şok ve/veya pulmoner ödem, akut kalp yetmezliği ya da ölümlerle sonuçlandığı bildirilmektedir (Ortiz vd., 2015). Genel çerçevede akrep venom toksinlerinin hipertansiyon ya da hipotansiyon, hipotermi, taşikardi, hipersalivasyon, miyokardit, pankreatit, hiperglisemi, hiperamilazemi, anksiyete,

nörotoksisite ve koagulasyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, katekolamin salınımında artış; bradikinin, prostaglandinler gibi sistemik yanıtlar üretme, interlökin-6 (IL-6), nitrik oksit (NO), α -antitripsin I, tümör nekroz faktör- δ (TNF- δ) gibi faktörlerin salınım düzeylerini değiştirme ve bazı solunum yolu problemleri gibi etkilere neden olmaktadır (Aboumaâd vd., 2014, Meki ve Mohey-Eldean, 1998).

Bu semptomlarla ve ölümlerle ilişkili olarak, akrep zehirlenmeleri skorpionizm adı altında kaydedilmektedir. Şekil 2.1 yeryüzündeki skorpionizm dağılımını ve etkilerini göstermektedir.



Şekil 2.1 Skorpionizm' in insidansı, kayıt altına alınan zehirlenme ve ölüm sayıları. (Chippaux, 2012) M: Milyon (popülasyon), zeh: Zehirlenme

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

Çalışma süresi boyunca analitik saflıktaki kimyasal maddeler kullanılmıştır. Çözeltiler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı (ESOGÜ-VAL) ve Meksika Ulusal Otonom Üniversitesi (UNAM) Moleküler Tıp ve Biyoproses Bölümü Venom Araştırma Laboratuvarı protokol notları kullanılarak hazırlanmıştır.

Asetik Asit (Sigma-Aldrich 27225)
Asetonitril (J.T Baker HPLC gradient grade 8143)
%37 Asetonitril (Wako 014-13831)
Asp-N (Sigma-Aldrich P 3303)
Dithiothreitol (Sigma-Aldrich 43819)
DMEM (Sigma-Aldrich D5796)
Etil Asetat (Wako 054-04981)
% 5 Fenil izotiyosiyanat n-heptan (Sigma-Aldrich P1034)
Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich F6178)
Glikoz (Sigma- Aldrich GO350500)
Guanidine hydrochloride (Sigma-Aldrich G7294)
Hepes (Sigma- Aldrich H4034)
Heptan (Wako 084-05501)
Iyodoasetat (Sigma-Aldrich I1149)
Kalsiyum klorür (Sigma- Aldrich)
Magnezyum klorür (Merck S4943833)
Sodyum monofosfat (Sigma- Aldrich S8282)
Poly Brene Membran (Sigma-Aldrich 107689)
Potasyum hidroksit (Sigma-Aldrich P1767)
Potasyum klorür (Sigma- Aldrich P9333)
Sodyum klorür (Sigma- Aldrich S7653)

Trifloroasetik asit (J.T Baker 9470-01)

%25 Trifloroasetik asit (Wako 201-10781)

%12 Trimetilamin (Wako 207-10761)

Tris-HCl (Sigma-Aldrich 88438)

Klorobutan (Sigma-Aldrich 414255)

3.1.1. Kullanılan çözeltiler

- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'nde 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) çalışmalarında kullanılan çözeltiler:
%50 asetonitril içeren % 0,1 (v/v) 'lık asetik asit HPLC ayırımından elde edilen örneklerin dilüe edilmesi için hazırlanmıştır.
- Alkilasyon-indirgeme işleminde kullanılan çözeltiler:
Red Buffer: 5ml 8 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.
- Enzimatik yıkım çalışmalarında kullanılan çözeltiler:
50 mM' lık pH: 8,5' da 100 µl NaH₂PO₄ tampon olarak kullanılmıştır.

- Protein Sekanslama (PPSQ) çalışmalarında kullanılan çözeltiler:
SHIMADZU PPSQ 31-A protein sekanslama cihazının çözeltiler kısmında firmanın yönergesinde bulunan %37 asetonitril, 1- klorobutan, etil asetat, heptane, % 5 fenil izotiyosiyanat n-heptan, %25 trifloroasetik asit ve %12 trimetilamin solüsyonları hazır olarak kullanılmıştır.
- Elektrofizyolojik çalışmalarda (Patch-Clamp) kullanılan çözeltiler:
Ekstraselüler solüsyon (Ek -80): 19 g NaCl (130 mM), 0, 9 g KCl (5 mM), 0,75 g CaCl₂ (2mM), 1 g (6H₂O) MgCl₂ (2mM), 5, 95 g HEPES (10mM) ve 2, 25 g glikoz (5mM) olacak şekilde karıştırılarak 250 ml deiyonize su içerisinde çözülmüş ve pH metre yardımı ile pH: 7.40' a ayarlanmıştır.

Intraselüler solüsyon: Potasyum aspartat (130mM), 0, 9 g KCl (5mM), 0, 75 g CaCl₂ (2mM), 1 g MgCl₂ (2Mm), 5, 95 g HEPES (10mM) olacak şekilde karıştırılarak 250 ml deiyonize su içerisinde çözülmüş ve pH metre yardımı ile pH: 7.30' a ayarlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

1. Elektrostimülatör (Maksimum Kapasite, 50 V, 10 Hz)
2. Santrifüj: Hettich Micro 200R
3. Vakum Kurutucu: Labconco Centri Vap Concentrator/ Thermo Fisher Savant Speed Vac SC210A
4. Hassas Terazî: SHIMADZU AU X 220
5. HPLC: SHIMADZU Prominence series (SDP-M20A DAD)/ Waters 2489 UV/ visible dedektör
6. HPLC Kolonları: Vydac C 18 Protein & Peptid Coloumn (4,6 mm x 250 mm)
7. Kütle Spektrometresi (LC-MS-ESI): Thermo Finnigan LCQ Fleet, Pump: Accela 600
8. Protein Sekanslama Cihazı (PPSQ): SHIMADZU 31-A, SPD-20 A UV dedektör, LC 20 AT
9. Elektrofizyoloji Cihazı ve Amplifikatör: Axon CNS 700 B Multi Clamp, Digidata 1440 D amplifikatör

10. Spektrofotometre: NanoDrop 2000 Thermo Scientific
11. pH metre: Ohaus Starter 3000
12. Binoküler Mikroskop: Nikon ECLIPSE E100
13. Derin Dondurucu: Bosch -20 °C
14. Derin Dondurucu: Haier -80 °C
15. Buzdolabı: Bosch +4 °C
16. Inkübatör: Santez SI-50
17. Isıtmalı Blok: Heidolph Hei Standart

3.2. Yöntem

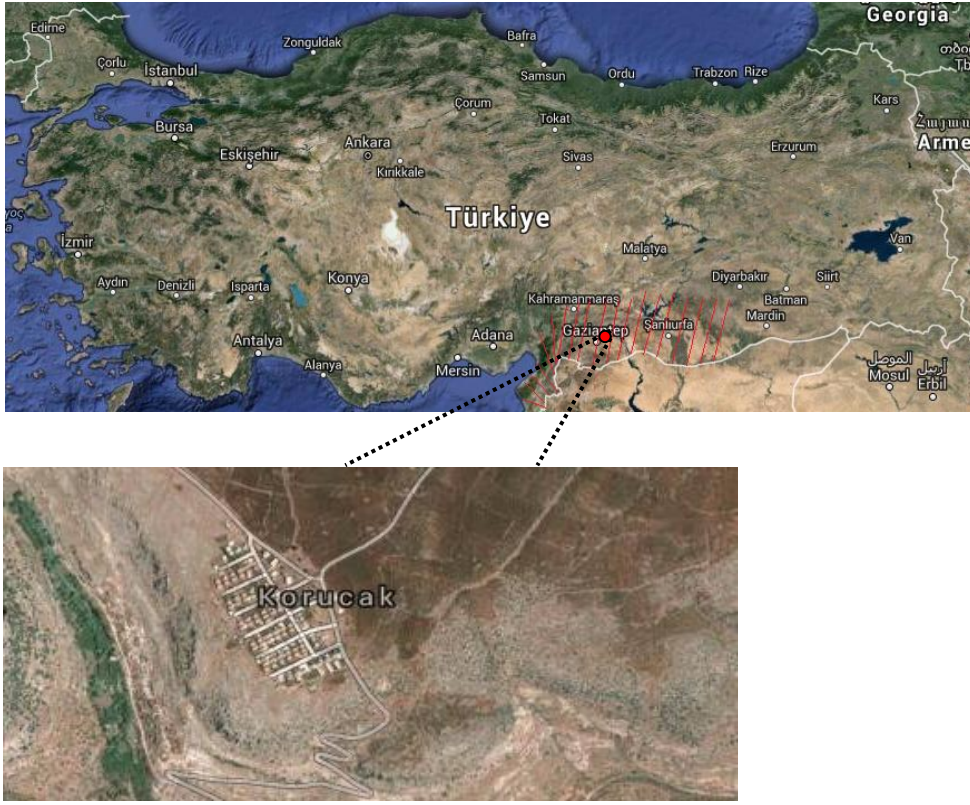
3.2.1. Akrelerin toplanması ve bakımı

Çalışmada kullanılan *Leiurus abdullahbayrami* türü akreler, akrelerin UV ışık (365 nm) altında gösterdiği ışımadan yararlanılarak (Şekil 3.1) Temmuz 2014 tarihinde Gaziantep İli' nin Nizip İlçesi' ne bağlı, Korucak Köyü (37° 12' 11'' . 6604 Kuzey-37° 44' 2. 1156'' Doğu koordinatları, 715 m rakım)' nden UV lamba yardımı ile gece toplanmıştır.



Şekil 3.1 *Leiurus abdullahbayrami* türü akrebin genel ve UV ışık altındaki görüntüsü

Akrelerin yayılım gösterdiği bölgeler kırmızı çizgi ile taranmış ve Türkiye fiziki haritası üzerinde Şekil 3.2.a ile gösterilmiştir. Çalışmalarda kullanılmış akrelerin toplandığı bölge olan Korucak Köyü ve koordinatları da Şekil 3.2. b' de verilmiştir.



Şekil 3.2 a. *Leirus abdullahbayrami* türü akrebin Türkiye’deki dağılımı **b.** Çalışmalarda kullanılan akrelerin toplandığı bölge

Toplanan akrepler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı’na canlı olarak getirilmiş, numaralandırılmış, 25x14x13 cm boyutlarında ve üzerlerine 4 adet 3 mm çaplı havalandırma delikleri açılmış plastik kutularda, her bir kaptaki bir akrep olacak şekilde 25-30 °C sıcaklıkta, doğal havalandırmalı laboratuvar odasında canlı olarak saklanmışlardır. Kutuların tabanlarına, tabanı tamamen kaplayacak şekilde kağıt yerleştirilmiş ve her hafta düzenli olarak yenileri ile değiştirilmiştir. Akrepler haftada bir defa olmak üzere *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvaları ile beslenmişlerdir (Gopalarishnakone vd., 1995). *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvaları da besleme amacı ile ayrıca yetiştirilmiştir. Akreplerin su ihtiyacı ise plastik kutular içerisine yerleştirilmiş küçük kaplar içine konulan ıslak süngerler ile karşılanmıştır. Aynı şekilde bu süngerler de beslenme periyodu dahilinde yenilenmiştir.

3.2.2. Ham venom eldesi

Ham venomun eldesi elektrostimülasyon sağım yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elektrostimülatör ile 20 V, 10 Hertz' lik elektrik akımı pens yardımı ile tutulan *Leiurus abduhbayrami* türü akrebin telsonuna anot ve katot uç olmak üzere iki adet elektrot kullanılarak uygulanmıştır (Corzo vd., 2001).

3.2.3. Peptid karışımının eldesi ve peptid miktarının belirlenmesi

1,5 ml' lik tüp içerisine toplanan venomlar deiyonize su ile çözülerek 4 °C' de, 15 dakika, 14.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı yeni bir tüpe alınarak soğutmalı vakum kurutucuda kurutulmuştur. Tamamen kuruyan venomlar etiketlenerek daha sonraki deney aşamalarında kullanılmak üzere -20 °C ve -80 °C' de saklanmıştır (Caliskan vd., 2012). Bu işlemler düzenli olarak ayda bir kez olmak koşulu ile tekrarlanmıştır. Elde edilen ham venomun venom konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu hesaplamada NanoDrop spektrofotometre kullanılmıştır. Her bir fraksiyon 100 µl distile su içerisinde çözülmüş ve çözülen her bir fraksiyondan 2 µl alınarak cihaza yüklenmiştir. Spektrofotometrik ölçümler 280 nm (A_{280}) dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (Götze ve Saborowski, 2011).

3.2.4. Ham venomun yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nde ayrımı ve peptid izolasyonu

Ham venomun saflaştırılması aşamasında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Çalışmalarda HPLC kolonu olarak C18 ters faz analitik protein peptid kolonu kullanılmıştır. Çalışma metodu olarak hareketli fazın akış hızı 1ml/ dk olacak şekilde, doğrusal gradient olarak ayarlanmış ve 60 dakika süresince 230 ve 280 nm dalga boylarında absorban değerleri takip edilerek ayırım gerçekleştirilmiştir (Caliskan vd., 2012). HPLC' de her bir fraksiyon 1,5 ml' lik tüpler içerisine toplanmıştır. Toplanan tüm örnekler soğutmalı vakum kurutucu yardımı ile kurutulmuş, ağızları parafilm ile sıkıca kapatılmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmışlardır (Caliskan vd., 2006).

3.2.5. Toksikite çalışmaları

Toksikite çalışmaları için 8 haftalık, 20 ± 2 gr ağırlığında BALB/C türü fare kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Leiurus abduhbayrami* ham venomunun kromatografik ayrımı sonucunda elde edilen 30. ve 40. dakikalar arasında toplanan majör fraksiyonlar farelere enjekte edilmiştir. Peptidin enjeksiyonu farelere intraperitoneal olarak gerçekleştirilmiştir. Peptid konsantrasyonu $20\mu\text{g}$ olarak kullanılmıştır. Toksikite çalışmaları Meksika Ulusal Otonom Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Hayvan Deneyleri Etik Kurulu' nun yönergesi dahilinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Peptid moleküler ağırlık belirleme çalışmaları

Moleküler ağırlık belirleme çalışmaları LC-MS-ESI cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Cihazın çalışma prensibi; peptidlerin belirli bir elektriksel yük ile yüklenmesi ve bu yüklü parçacıkların nanospray kaynağından püskürtülmesi; püskürtülen parçacıkların da dedektör yardımı ile yakalanarak kütle/yüklenme (m/z) oranının hesaplanarak proteinlerin moleküler ağırlığının hesaplanması temeline dayanmaktadır.

HPLC ile ham venomun ayrıştırılmasından sonra seçilen peptid vakum kurutucuda kurutulmuştur. Daha sonra peptid örneği $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonda olacak şekilde %50 asetonitril içeren %0,1 'lik asetik asit içerisinde çözülmüş ve $3\mu\text{l}$ örnek kütle spektrometresi cihazına temiz Surveyor MS şırıngası kullanılarak enjekte edilmiştir. Akış hızı $1\mu\text{l}/\text{dk}$, iyonizasyon voltajı 1.75 Kv, kapiler sıcaklığı $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve kütle/yüklenme spektrumu (m/z) 200-2000 olacak şekilde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar bilgisayar programı Xcalibur tarafından kayıt altına alınmış ve analiz edilmiştir.

Bu işlem alkilasyon öncesi, alkilasyon sonrası ve enzimatik yıkım işlemleri sonrasında gerçekleştirilmek koşulu ile üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.7. Alkilasyon ve indirgeme çalışmaları

100 µl Red Buffer, mikropipet yardımı ile temiz bir tüp içerisine alınmıştır. Buffer içerisine 1 mg DTT denatüre edici ajan olarak eklenmiştir. Bu karışımdan 10 µl alınarak içerisinde peptid örneğinin bulunduğu tüp içerisine aktarılmıştır. Tüp içerisinde bulunan oksijen, gaz halindeki nitrojen ile muamele edilerek dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüp sonrasında ısıtmalı blok üzerinde 55 °C' de, 40 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 90 µl Red Buffer temiz bir tüp içerisine alınmıştır. Buffer içerisine 1 µg iyodoasetat eklenmiştir. 10 µl bu karışımdan alınarak içerisinde peptid örneğinin bulunduğu tüpe eklenmiştir. İnkübasyonun karanlık ortamda gerçekleşmesi gerektiği için tüp alüminyum folyo ile sarılarak siyah bir kutu içerisinde, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Tüm bu işlemlerden sonra peptidin kromatografik ayrımı yapılmıştır. Fraksiyonlar vakum kurutucuda kurutulmuş ve sonraki çalışmalarda kullanılana kadar -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.8. Enzimatik yıkım çalışmaları

Peptidin N- terminal ucundan, aspartik asit rezidülerinden yıkım yapabilme özelliğine sahip olan Asp-N restriksiyon endopeptidaz enzimi ile ilgili peptidin yıkım işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkım işlemi için 50 mM' lık pH: 8,5' da 100 µl NaH₂PO₄ tampon olarak örnek içeren tüpe eklenmiştir. Sonrasında ise 5µl Asp-N enzimi tüpe eklenmiş tüp 37 °C' de 4 saat boyunca ısıtmalı blok üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Restriksiyon enzim yıkımı işleminden sonra peptid örneği HPLC cihazına yüklenerek enzimatik yıkım işlemi sonrasına ait kromatogram verileri elde edilmiştir. HPLC cihazından toplanan örnekler vakum kurutucuda kurutulmuş ve sonraki çalışmalarda kullanılana kadar -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.9. Peptid aminoasit dizisi belirleme ve sekans karşılaştırma çalışmaları

Peptidlerin N-terminal bölgeden direkt sekanslanması protein sekanslama cihazında otomatik Edman degradasyon yöntemine dayanılarak yapılmıştır. Cihazın çalışma prensibi; membran üzerinde cihaza yüklenen peptid örneğinde bulunan her bir aminoasite PITC molekülünün bağlanması ve PITC' ye özgü dalga boyu olan 280 nm dalga boyunda cihaza

entegre halde olan likit kromatografi cihazı ile aminoasitlerin verdiği özgün ışımaya değerinin saptanması temeline dayanmaktadır. Örnekler 1 µg/µl konsantrasyonda olacak şekilde deiyonize su ile çözülmüş ve 3µl örnek GFD membran üzerine eklenmiştir. Örneğin membran üzerine difüze olması için 1 saat beklenmiştir. Örneğin membrana tamamen difüze olduğuna emin olunduktan sonra membran steril ince uçlu bir pens yardımı ile protein sekanslama cihazına yerleştirilmiştir. Her bir döngü sonrasında diziden elde edilen aminoasitler PITS' ye özgü olan 280 nm dalgaboyunda, her bir aminoasitin kendine özgü verdiği ışımaya bağlı olarak; sekanslama cihazına entegre halde olan likit kromatografi cihazı tarafından saptanmış ve bilgisayar yazılım programı ile kayıt altına alınmıştır. Bilgisayar programının kayıt altına aldığı veriler manuel olarak analiz edilmiştir.

Bu işlem alkilasyon sonrası ve enzimatik yıkım işlemleri sonrasında gerçekleştirilmek koşulu ile iki kez tekrarlanmıştır.

3.2.10. Elektrofizyoloji çalışmaları (Hücre kültürü/ Patch clamp)

Elektrofizyoloji çalışmalarında kullanılacak olan farklı tipte Na⁺ kanalları eksprese eden insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293) için hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kullanılacak olan hücreler sıvı azot tankından çıkartılarak flaslara; % 4,5 glikoz ve % 10 FBS içeren DMEM medium kullanılarak ekilmiş ve ardından %5 CO₂ ve atmosfer nemi değerlerine sahip olan 37 °C' deki etüve yerleştirilmişlerdir. Hücrelerin proliferasyonu her gün binoküler mikroskop altında kontrol edilmiştir. Hücreler flask içerisinde yeterli yayılıma sahip oldukları zaman pasajlama işlemleri aynı koşullar altında laminar kabin ortamında gerçekleştirilmiştir.

Patch-clamp tekniği; kapiler cam pipetin sisteme entegre edilmiş bir CCD kamera bağlı mikroskop altında manuel olarak yakalanmış bir hücreye ait hücre membranının çok küçük bir miktarının vakum ile bu kapiler pipetin içine alınması ve sonrasında hücre yüzeyinde bulunan iyon kanalının elektriksel akım altında depolarizasyon ve repolarizasyon zamanlarındaki değişimlerin saptanması temeline dayanmaktadır.

Çalışmalara başlamadan önce Patch- clamp sistemine yüklenecek olan peptid miktarını belirlemek için 33,27 dakika alıkonma zamanına sahip peptid örneği 20 µl deiyonize su içerisinde çözülmüş ve NanoDrop ile konsantrasyonu belirlenmiştir. Kullanılacak peptid konsantrasyonu 500 nM olarak seçilmiş ve bu konsantrasyonu elde etmek için gerekli olan peptid miktarı hesaplanmıştır. Hesaplamada kullanılan formülasyon aşağıda belirtilmiştir.

$$OD_{280}: 10,54 \mu\text{g}/\mu\text{l} \quad \text{MW}: 7274,3 \rightarrow \sim 7000 \text{ Da.} \quad (3.1)$$

$$\left. \begin{array}{l} 7000 \mu\text{g}/\mu\text{l} \\ X \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1\text{M} \\ 500 \text{ Nm} \end{array} \left. \right\} X: 3,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \quad \left. \begin{array}{l} 10,54 \mu\text{g}/\mu\text{l} \\ 3,5 \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1 \text{ ml} \\ Y \end{array} \left. \right\} Y: 0,33 \mu\text{l}$$

0,33 µl peptid 1/10 oranında dilüe edilmiştir

1 µl peptid örneği + 9 µl deiyonize su

3,3 µl → ~3,5 µl

3,5 µl peptid alınarak 1000 µl Ek -80/ Ekstraselüler Solüsyon ile karıştırılarak sisteme enjekte edilmiştir.

Yukarıda 3.1.2 bölümünde elektrofizyoloji için belirtilen intraselüler ve ekstraselüler çözeltiler kullanılarak 0 mV depolarizasyon akımı altında 200 ms' lik aralıklar ile -120 mV ile -10 mV aralığında ölçümler alınmıştır. Clampfit10 (Molecular Device, USA) ve Origin7 (OriginLab Corporation, USA) programları kullanılarak verilerin analizi yapılmıştır.

3.2.11. Filogenetik analiz

Lab1 peptidinin birincil yapısı NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veritabanında yer alan BLAST benzerlik analizi kullanılarak diğer akrep peptidleri ile karşılaştırılmıştır. Peptid sekansı çoklu hizalama analizi Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7) programı (<http://www.megasoftware.net/>) içerisinde bulunan CLUSTAL W ile gerçekleştirilmiştir.. (Tamura vd., 2011)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Akrelerin Eldesi, Bakımı ve Beslenmesi Sonuçları

Gerçekleştirilen arazi çalışması ile toplam 43 adet *Leiurus abduhbayrami* türü akrep toplanmıştır. Akrelerin bölüm 3.2.1' de açıklanan koşullar altında bakımları gerçekleştirilmiştir. Haftalık, düzenli olarak beslenme periyodları takip edilen akrelerin canlı yemlerini besleme anında tüketmedikleri tespit edilmiştir. Beslemeyi takip eden ortalama 10-15 dk.'lık süre sonrasında canlı yemlerini öldürerek tükettikleri gözlenmiştir. Akrelerin beslenme periyodu ile paralel olarak su ihtiyaçları karşılanmıştır. Ancak buharlaşmanın fazla olduğu yaz aylarında akrelerin su ihtiyaçlarının artmasından dolayı haftada iki kez su verilmiştir.

4.2. Ham Venom Eldesi Sonuçları

Çalışmalar süresince *Leiurus abduhbayrami* türü akrepten düzenli olarak ayda bir kez elektrostimülasyon yöntemi kullanılarak sağım gerçekleştirilmiş ve ham venom elde edilmiştir.

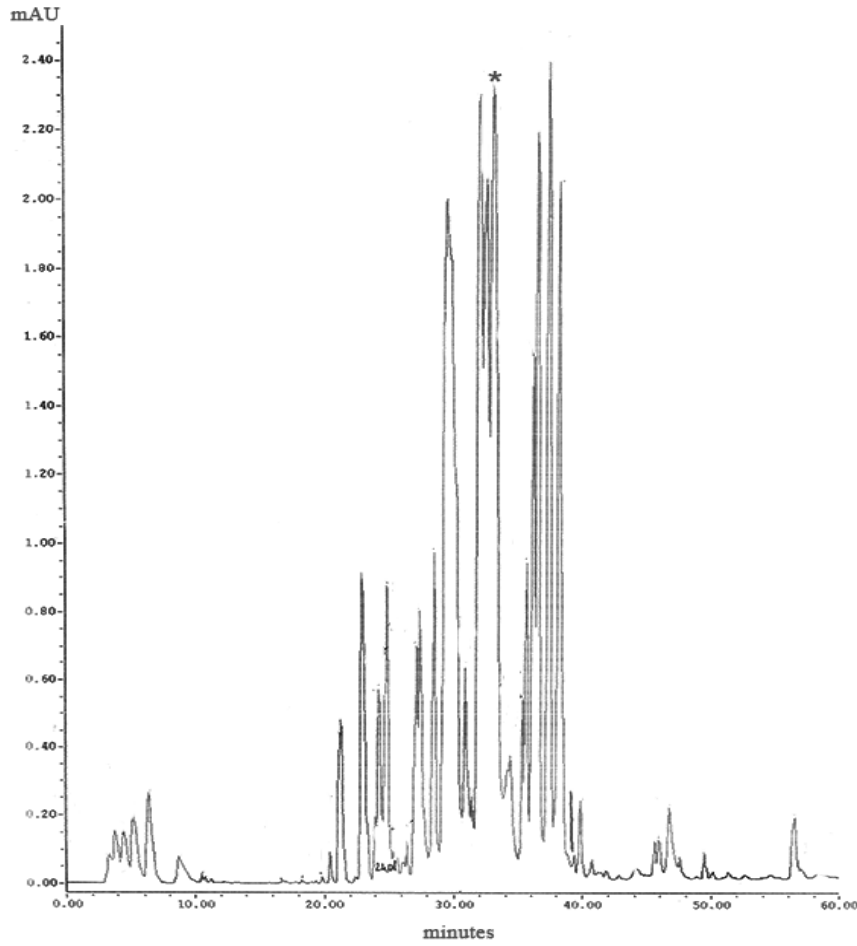
Elde edilen ham venomlar bölüm 3.2.3' de belirtilen yöntemler ile mukus ve hücrel atıklardan arındırılarak kurutulmuştur. Her bir akrebin sağım sonucu 1-2 damla olarak verdiği venom içeriğinin peptid miktarının yaklaşık 0.4-0.8 mg aralığında olduğu belirlenmiştir. Etiketlenen ham venom daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Ayrımı ve Peptid İzolasyonu Sonuçları

Çalışma için her seferinde 2- 2,2 mg konsantrasyonlarında hazırlanan ham venom, tampon A içerisinde çözülerek HPLC cihazına yüklenmiş ve ters-faz sistemi kullanılarak ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 60 dakika süresince, 0-60 %B tampon çözeltisi gradient faz oluşturacak şekilde uygulanmıştır. Artan absorbansa göre elüsyonlar tüplere

alınmıştır. Toplam en az 42 farklı alt fraksiyon alıkonma zamanlarına göre etiketlenerek toplanmıştır. Toplanan tüm fraksiyonlar içerisinde ön çalışmalarımızla toksik olduğunu belirlediğimiz majör bileşenlerden biri olan 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip olan peptid etiketlenerek ileri saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyolojik etkilerin araştırılmasına bu peptid ile devam edilmiştir.

Ham venoma ait kromatogram Şekil 4.1 ile ve kromatogram sonucunda elde edilen fraksiyonlara ait alıkonma zamanları ise ayrıntılı olarak Çizelge 4.1 ile aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.1 *Leiurus abduallahbayrami* türü akrebin ham venomunun HPLC ile ayırımına ait kromatogram

Çizelge 4.1 *Leiurus abduhbayrami* türü akrebin ham venomundan elde edilen fraksiyonlar

Fraksiyon No	Alıkonma Zamanı (RT)	Fraksiyon No	Alıkonma Zamanı (RT)
1	3,44	22	29,48
2	3,85	23	30,96
3	4,59	24	32,02
4	5,21	25	32,52
5	6,44	26	33,01
6	8,79	27	34,41
7	10,57	28	35,34
8	16,79	29	35,61
9	18,34	30	36,12
10	19,38	31	36,47
11	20,47	32	37,30
12	21,18	33	38,12
13	21,34	34	38,40
14	22,94	35	39,88
15	24,01	36	44,09
16	24,27	37	45,56
17	24,85	38	45,93
18	26,42	39	46,70
19	27,17	40	49,46
20	27,45	41	56,45
21	28,52	42	58,51

4.4. Toksikite Çalışmaları Sonuçları

Ham venomun kromatografik ayrımından elde edilen 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptid ile gerçekleştirilen toksisite çalışmalarına ait sonuçlar aşağıda Çizelge 4.2 de verilmiştir.

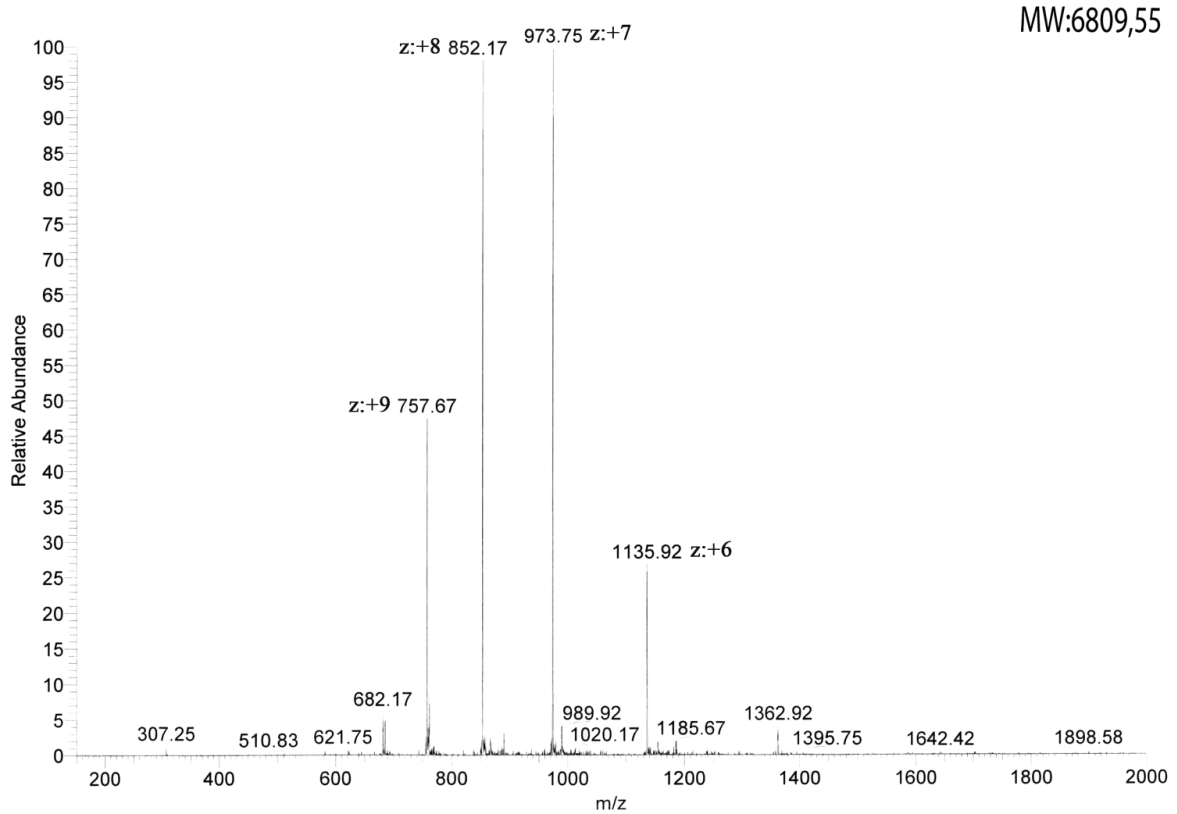
Çizelge 4.2 20 µg peptidin intraperitoneal enjeksiyonu sonrası gözlenen semptomlar

Enjeksiyon Zamanı	14:35
Ölüm Zamanı	14:45

Süre	Semptom
14:35	Tüm bedende kasılma
14:36	Tüm bedende kasılma, solunum problemleri
14:41	Tüm bedende kasılma, solunum problemleri, zıplama
14:45	Ölüm

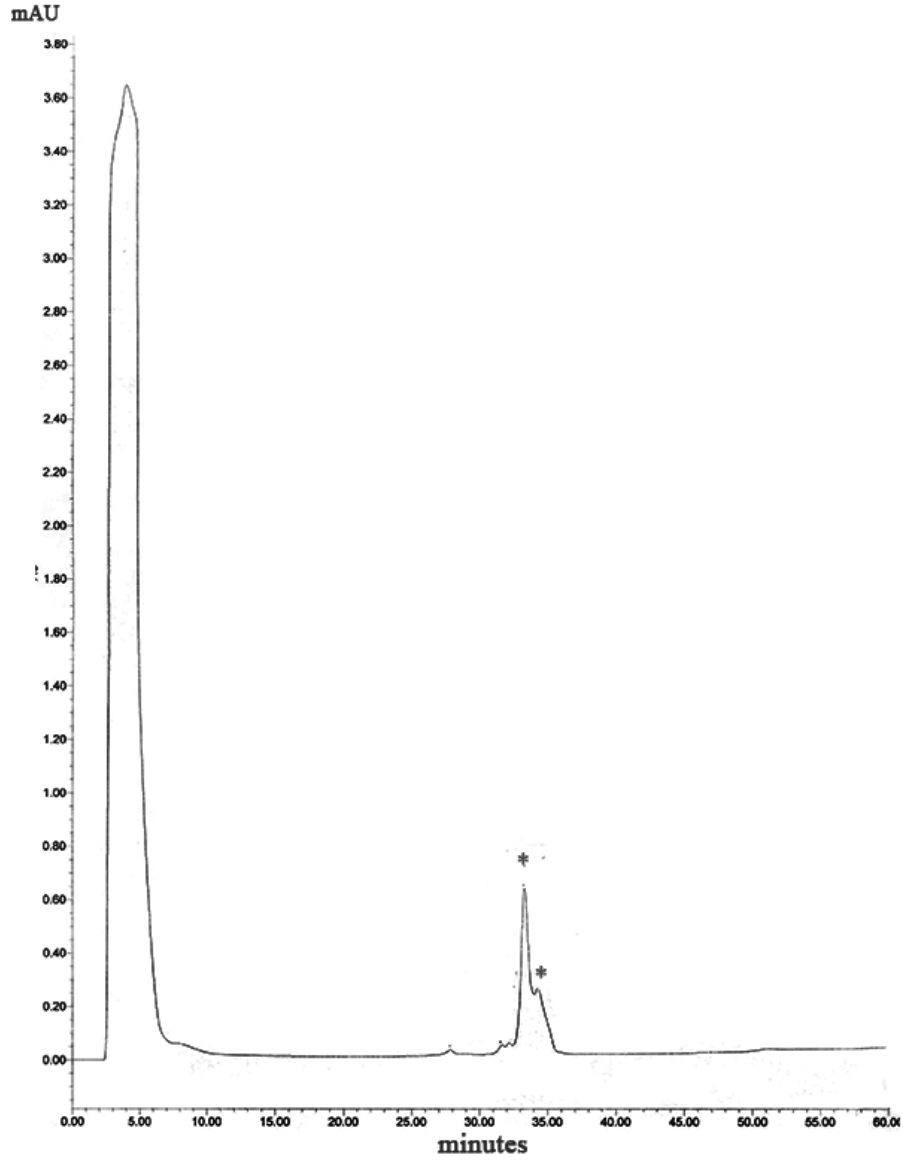
4.5. Peptid Moleküler Ağırlık Belirleme Çalışmaları Sonuçları

Kromatografik ayırım sonrasında elde edilen majör bileşenlerden 33,01 dakika alıkonma zamanlı peptidin molekül ağırlığı kütle spektrometresi ile 6809,55 Da. olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).



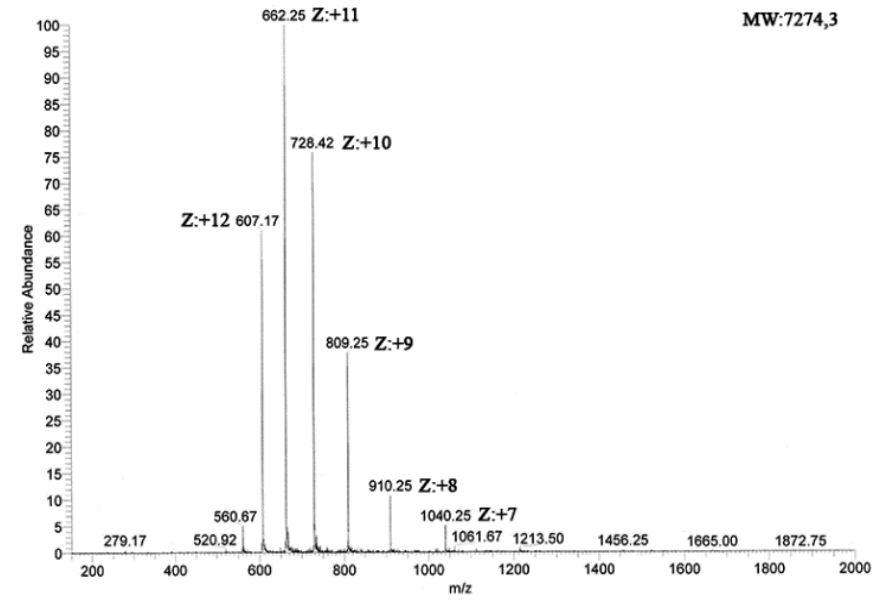
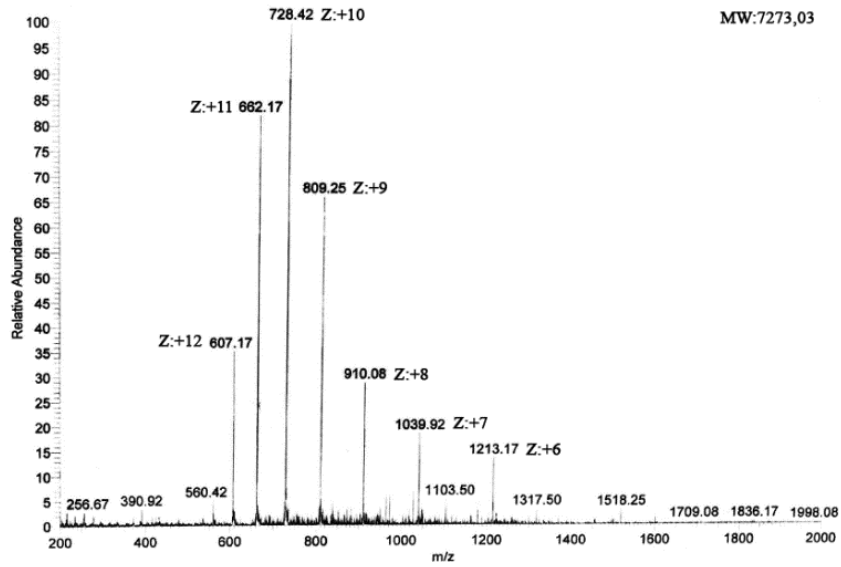
Şekil 4.2 33,01 dakika alıkonma zamanlı peptidin moleküler ağırlık belirleme sonucu

Peptidin içerdiği sistein aminoasit sayısı ve dolayısıyla kaç disülfid köprüsü içerdiğinin belirlenmesi için alkilasyon ve indirgeme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Alkilasyon işlemi aşamasında kullanılan kimyasalların peptidten uzaklaştırılması amacıyla yeniden kromatografik ayırım gerçekleştirilmiş 27,93- 31,60- 32,18- 33,27 ve 34,28 dakika alıkonma zamanına sahip 5 farklı fraksiyon elde edilmiştir (Şekil 4.3).

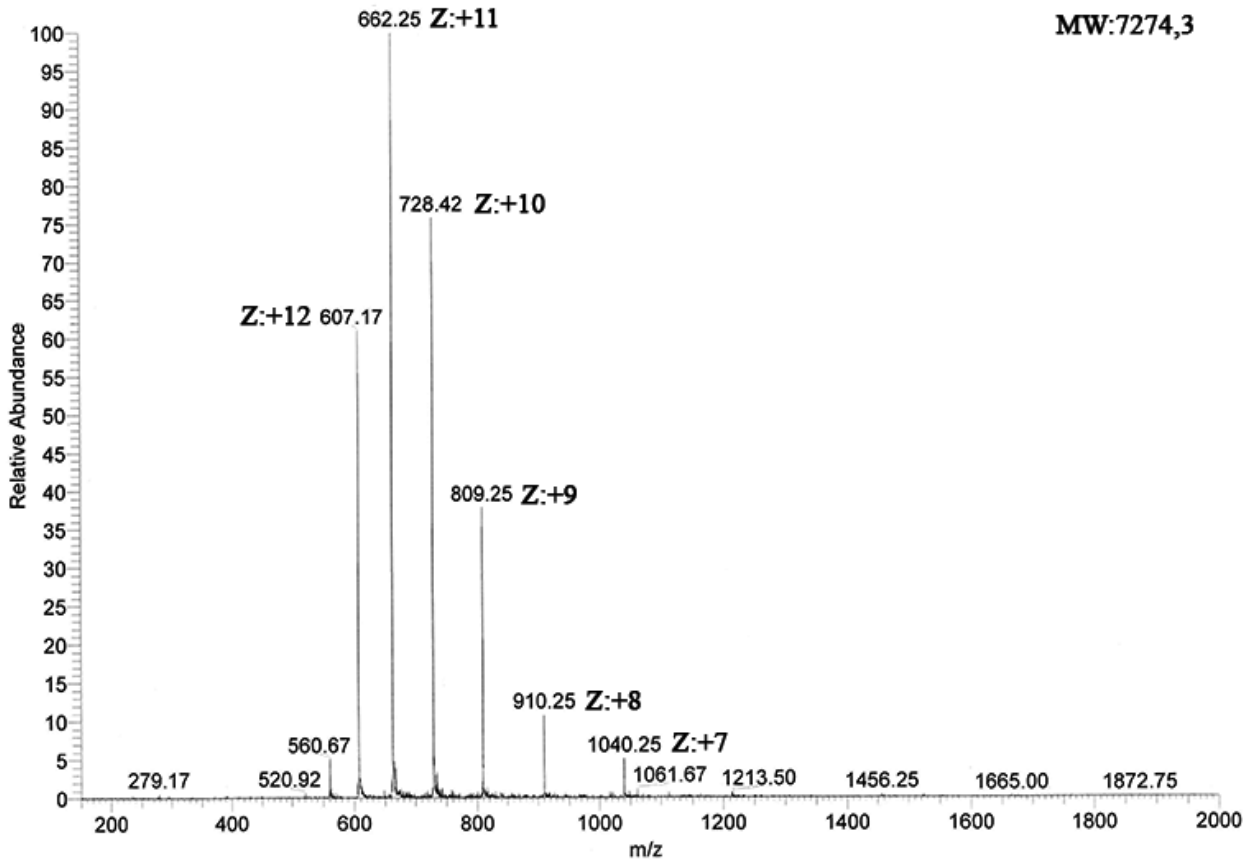


Şekil 4.3 Alkilyasyon ve indirgeme çalışmaları sonrası gerçekleştirilen kromatografik ayırma sonucu

Çalışmalar; moleküler ağırlık belirleme çalışması sonuçlarına bakılarak kütle spektrometresi sonucu elde edilen moleküler ağırlıkların yaklaşık değerlerde (7274,3-7273,03) olması bize bu iki majör fraksiyonun aynı moleküle ait olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 33,27 ve 34,28 dakika alıkonma zamanına sahip alkile peptidlerin moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları

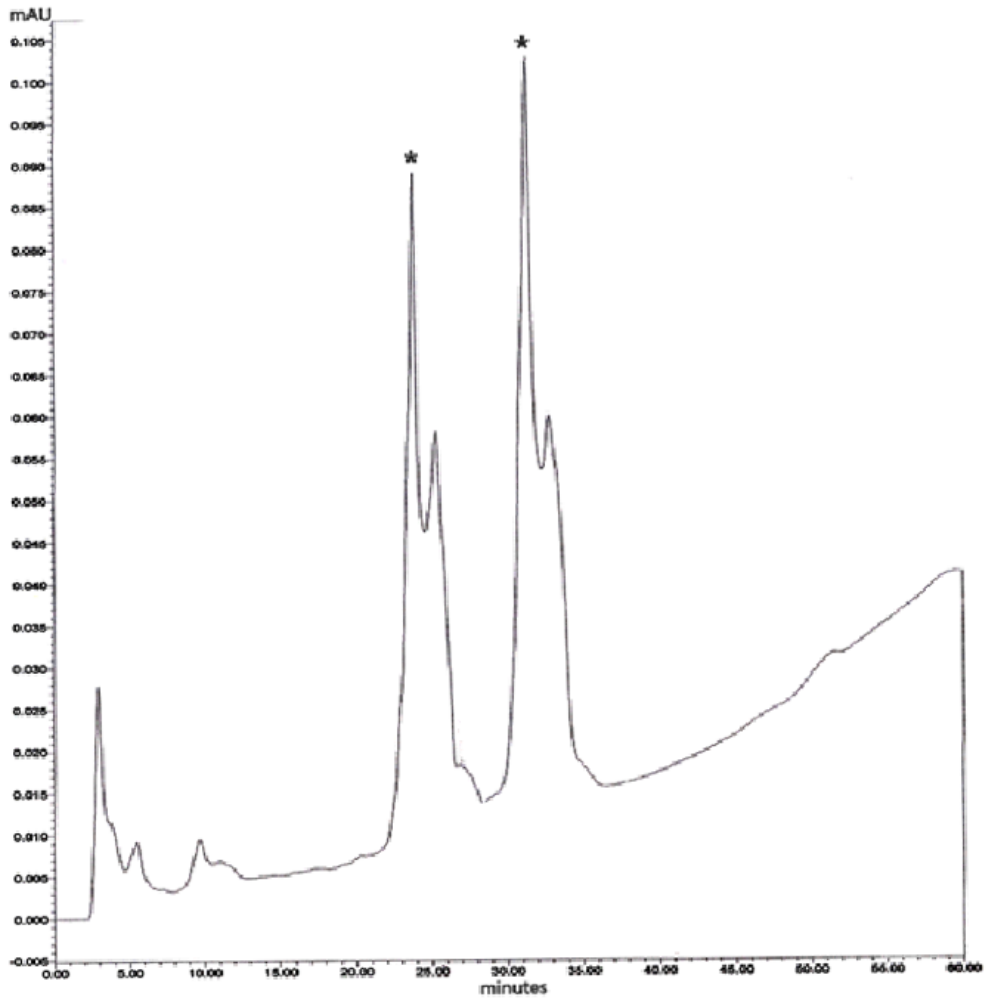


Şekil 4.5 33,27 dakika alıkonma zamanlı alkile peptidin moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları

Çalışmalara HPLC çalışması sonucunda daha saf olarak elde edildiği anlaşılan 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin alkilli türevi olan 33,27 dakika alıkonma süreli peptid ile devam edilmiştir. İşlemler sonrasında alkile peptidin molekül ağırlığı 7274,3 Da. olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5)

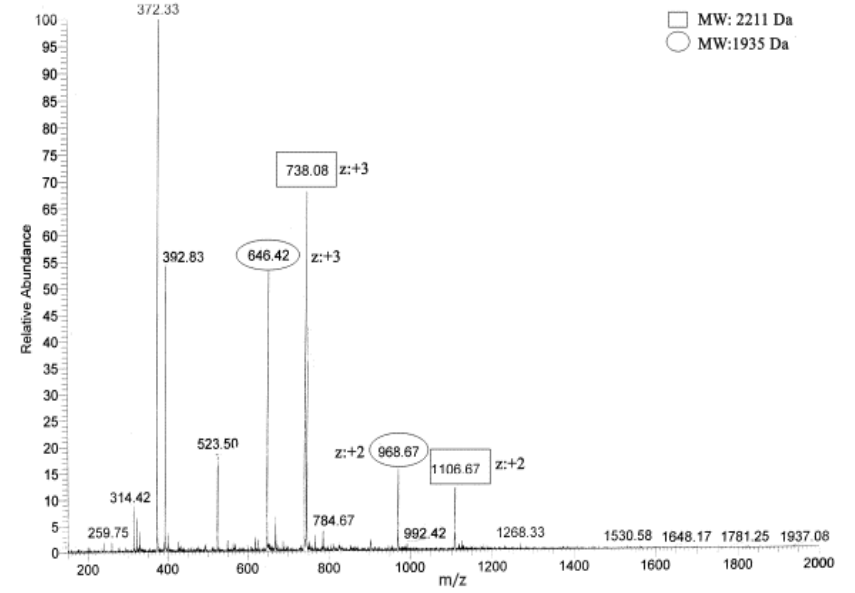
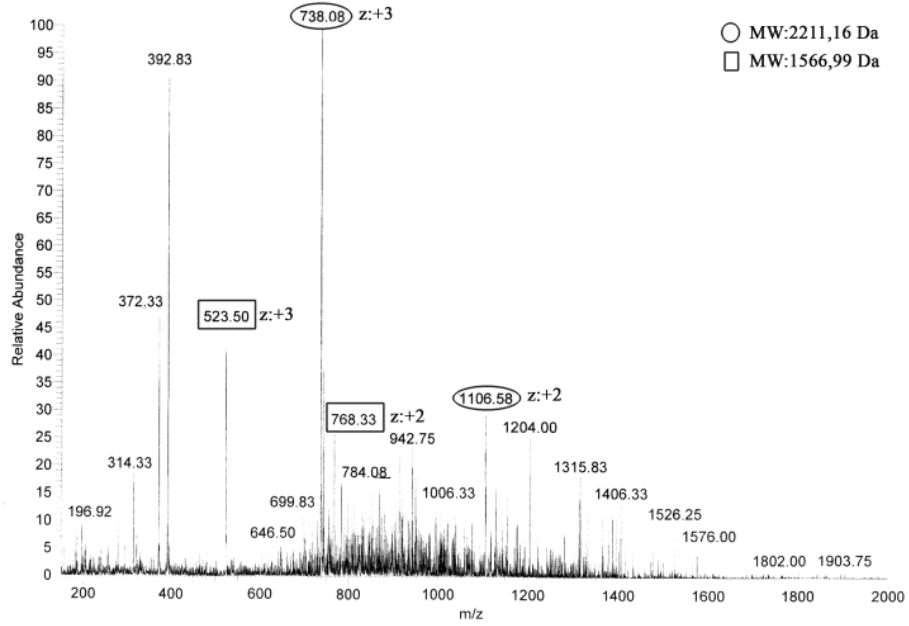
4.6. Peptid Aminoasit Dizisi Belirleme Çalışmaları Sonuçları

Protein sekanslama cihazının tek bir okumada uzun aminoasit dizilerini yüksek başarı oranı ile okuyamadığı bilinmektedir. Bu nedenle peptid N- terminal uçtan, aspartik asit rezidülerinden kesim yapabilen Asp-N endopeptidaz enzimi ile yıkılmıştır. Alkilasyon sonrasında Asp-N ile enzimatik olarak yıkılan örnek yeniden kromatografik ayrımaya alınmıştır. Şekil 4.6' da görüldüğü gibi 9,18- 23,88- 25,26- 27,00- 31,27 ve 32,83 dakika alıkonma zamanlarına sahip 6 farklı fraksiyon elde edilmiştir.

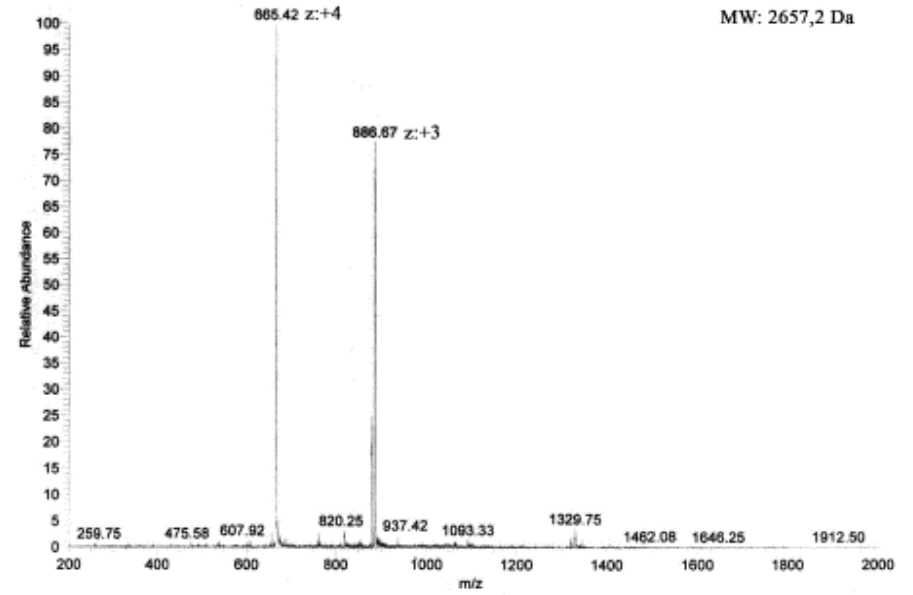
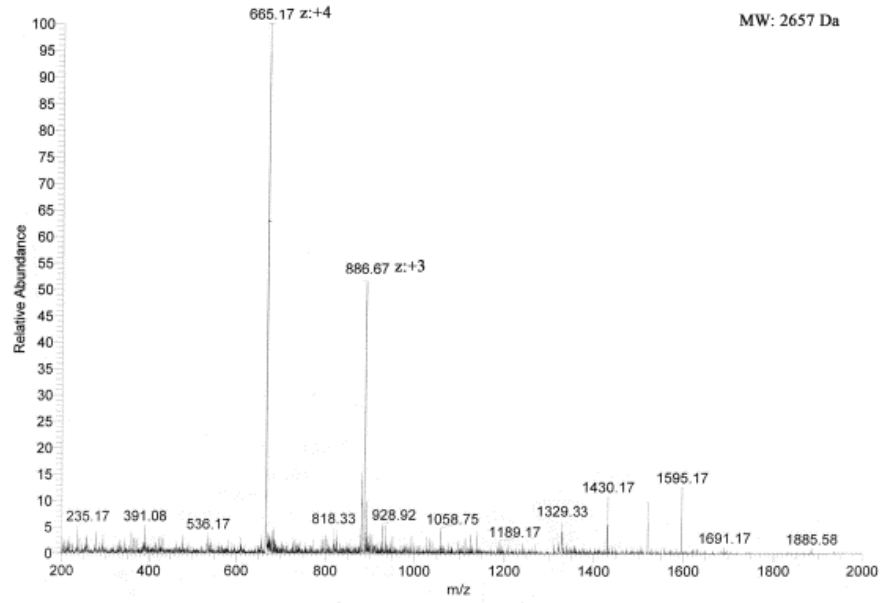


Şekil 4.6 Peptidin Asp-N endopeptidaz enzimi ile yıkımı ardından gerçekleştirilen kromatografik ayırma ait kromotogram

Majör olan fraksiyonların (23,88- 25,26- 31,27 ve 32,83 dakika alıkonma zamanı) kütle spektrometresi ile moleküler ağırlıkları belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7 23,88 ve 25,26 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonların moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları



Şekil 4.8 31,27 ve 32,83 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonların moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçları

Ham venomun ilk kromatografik ayrımı sonucunda elde edilen 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptid, protein sekanslama cihazına yüklenmiş ve Şekil 4.9' daki dizilim elde edilmiştir;

5 10 15 20 25
VRDGYIAKPENCVYHCIPDCDTLX/CXA

Şekil:4.9 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin ilk okumada elde edilen aminoasit dizilimi

Peptide ait ilk okumada N terminal uçtan başlayan 26 aminoasit uzunluğunda bir okuma gerçekleştirilmiştir. (X ile gösterilen aminoasitler sekanslama cihazına entegre likit kromatografi cihazının verdiği aminoasite özgül pik büyüklüklerinin çok yakın olmasından dolayı anlamlı doğrulukta sayılamayan aminoasitleri göstermektedir).

4.7. Filogenetik Analiz Sonuçları

Peptidin sekanslanması sonucunda elde edilen ilk 23 aminoasit uzunluğundaki dizi NCBI veritabanında bulunan BLAST benzerlik analizi ile araştırılmış ve en yakın aminoasit dizisi %96 benzerlik oranı ile *Leiurus quinquestriatus habreus*' tan izole edilen Lqh6 olarak bulunmuştur. Lqh6, 64 aminoasit uzunluğunda ve 4 disülfid köprüsü içermektedir. Lqh6'nın aminoasit dizisi Şekil 4.10' daki gibidir;

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
VRDGYIAQPENCVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK

Şekil 4.10 Lqh6 peptidinin aminoasit dizilimi

33,01 dakika alıkonma zamanlı peptidin yapı belirleme çalışmalarına yardımcı olmak ve yön vermek kapsamında en yakın dizilime sahip olan Lqh6'nın Asp-N enzimi ile teorik olarak yıkımı Expasy/ Protein Prospector programı ile gerçekleştirilmiştir. Expasy/ Protein Prospector programında Lqh6' nın Asp-N restriksiyon enzimi ile teorik kesimi sonuçları Çizelge 4.3 ile verilmiştir. Şekil 4.11 kesim işlemi gerçekleştirilen Lqh6 peptid parçalarının moleküler ağırlıkları ile birlikte manuel olarak konumlandırılmasını

içermektedir. Gerçekleştirilen protein sekanslama çalışmaları ile direkt 26 aminoasitlik ilk okumaya ek olarak Asp-N endopeptidaz enzim kesimi sonucu elde edilen parçaların manuel olarak birleştirilmesi sonucu ve alkilenmiş peptidin direkt sekanslanması ile edilen veriler birleştirildiğinde çalışılan peptidin tüm aminoasit dizilimi elde edilmiştir.

Çizelge 4.3 Expsy/ Protein Prospector programında Lqh6' nın Asp-N endopeptidaz enzimi ile teorik kesimi sonuçları.

No	m/z (mi)	m/z (av)	Mod.	Start	End	Missed Cleav.	Sequce
1	<u>1496</u> .7890	1497.7673		51	64	1	(P)DNVGIIVDGVKCHK(-)
1	<u>1821</u> .7935	1823.0688		3	18	0	(R)DGYIAQPENCVYHCIP(D)
1	<u>2039</u> .8296	2041.3016		3	20	1	(R)DGYIAQPENCVYHCIPDC(D)
1	<u>2076</u> .9630	2078.3908		1	18	1	(-)VRDGYIAQPENCVYHCIP(D)
1	<u>2118</u> .9736	2120.4284	Acetyl	1	18	1	(-)VRDGYIAQPENCVYHCIP(D)
1	<u>2485</u> .0958	2486.8326		26	50	0	(K)DNNGTGGHCGFKLGHGIACWCNALP (D)
1	<u>3045</u> .3586	3047.5068		21	50	1	(C)DTLCKDNNGTGGHCGFKLGHGIACWCNALP(D)
1	<u>3195</u> .4921	3197.6663		26	57	1	(K)DNNGTGGHCGFKLGHGIACWCNALPDNVGIIV(D)



Şekil 4.11 Teorik kesim sonrası elde edilen parçaların manuel olarak konumlandırılması

Biyokimyasal çalışmalar sonucu elde edilen verilerin biyoinformatik yaklaşımlar ile analiz edilmesi sonucunda 33,01 dakika alıkonma süreli peptidin birincil yapısı ortaya çıkartılmış (Şekil 4.12), ve yeni peptide *Leiurus abduallahbayrami* türünden ilk saflaştırılan peptid olduğu için “**Lab1**” adı verilmiştir. Lab1’ e ait aminoasit dizisi aşağıda verilmiştir.

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
VRDGYIAKPENCVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK

Şekil 4.12 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin aminoasit dizilimi

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
Lab1 VRDGYIA**K**PENCVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK

Lqh6 VRDGYIA**Q**PENCVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK

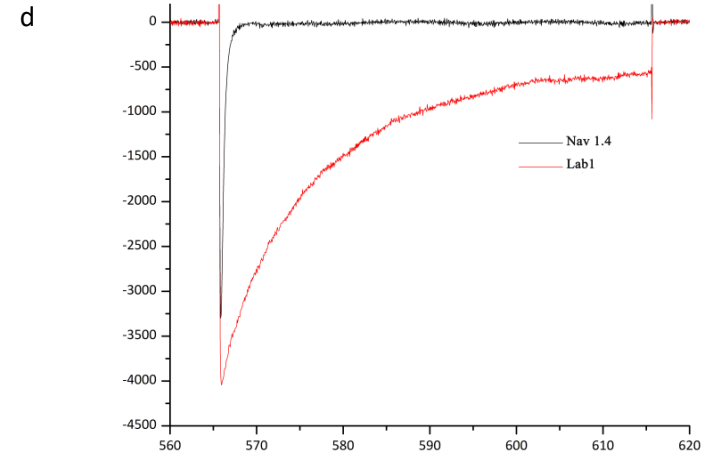
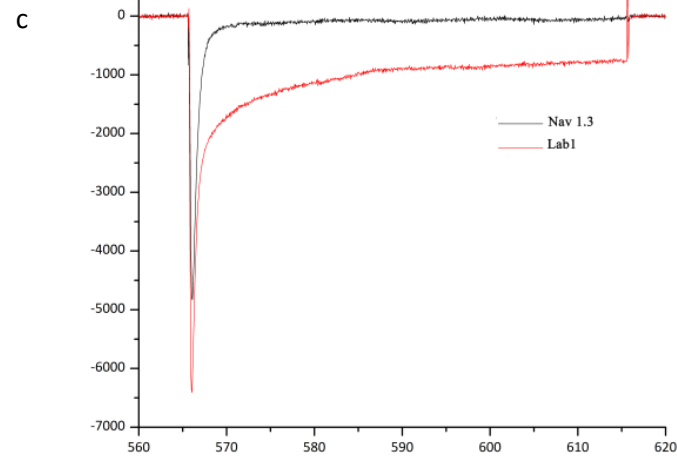
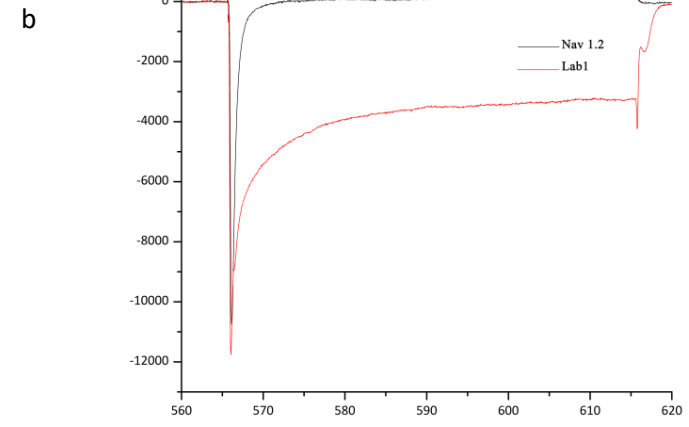
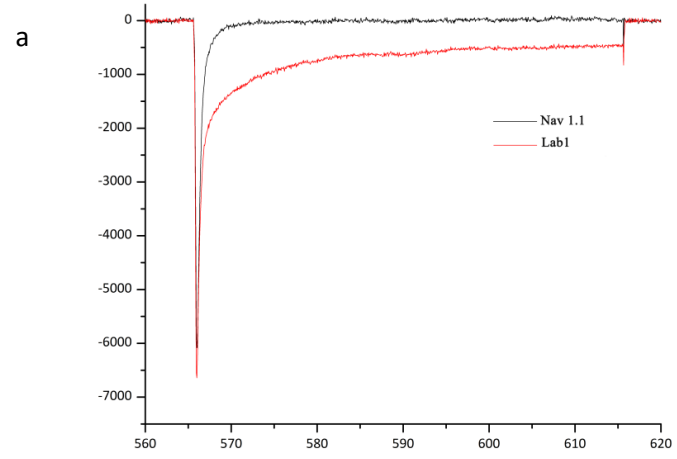
Şekil 4.13 Lab1 peptidi ile Lqh6 peptidinin aminoasit karşılaştırması

Peptidin tüm aminoasit dizilimi elde edildikten sonra benzerlik çalışmaları NCBI veri tabanında bulunan BLAST benzerlik analizi ile gerçekleştirilmiştir. En yakın aminoasit dizisi olan α -toxin Lqh6' ya olan benzerlik oranının %98 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).

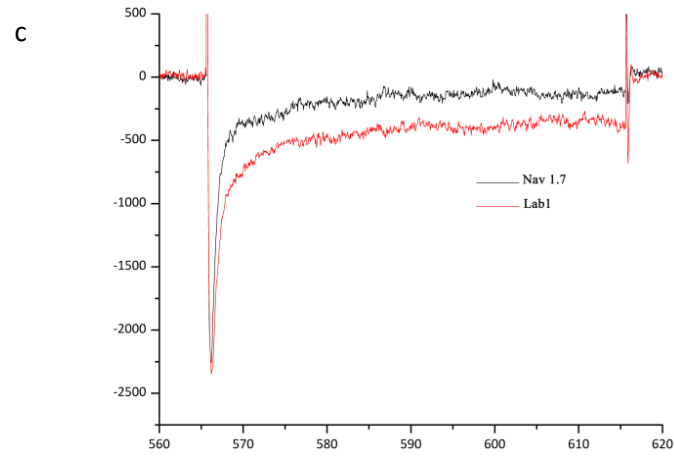
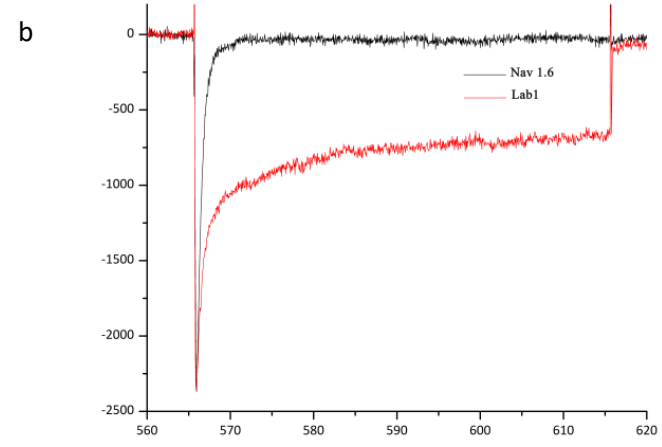
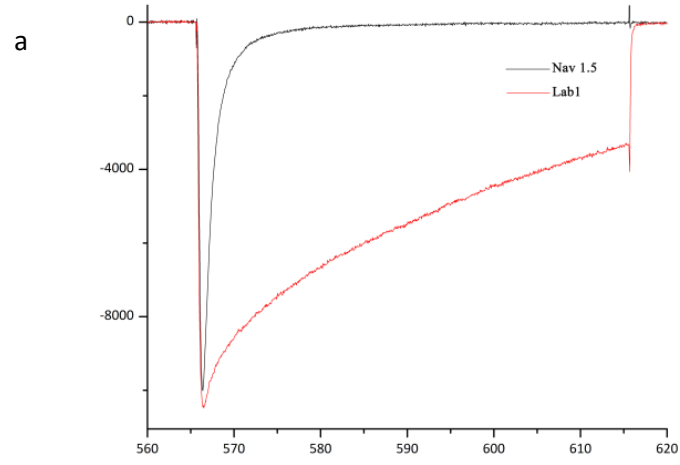
4.8. Elektrofizyoloji Çalışmaları Sonuçları

Na^+ kanal kaynağı olarak da farklı Na^+ kanalları eksprese eden HEK-293 hücreleri kullanılmıştır. Bu amaçla HEK-293 hücreleri ayrıca hücre kültürü yöntemleri ile çoğaltılmıştır.

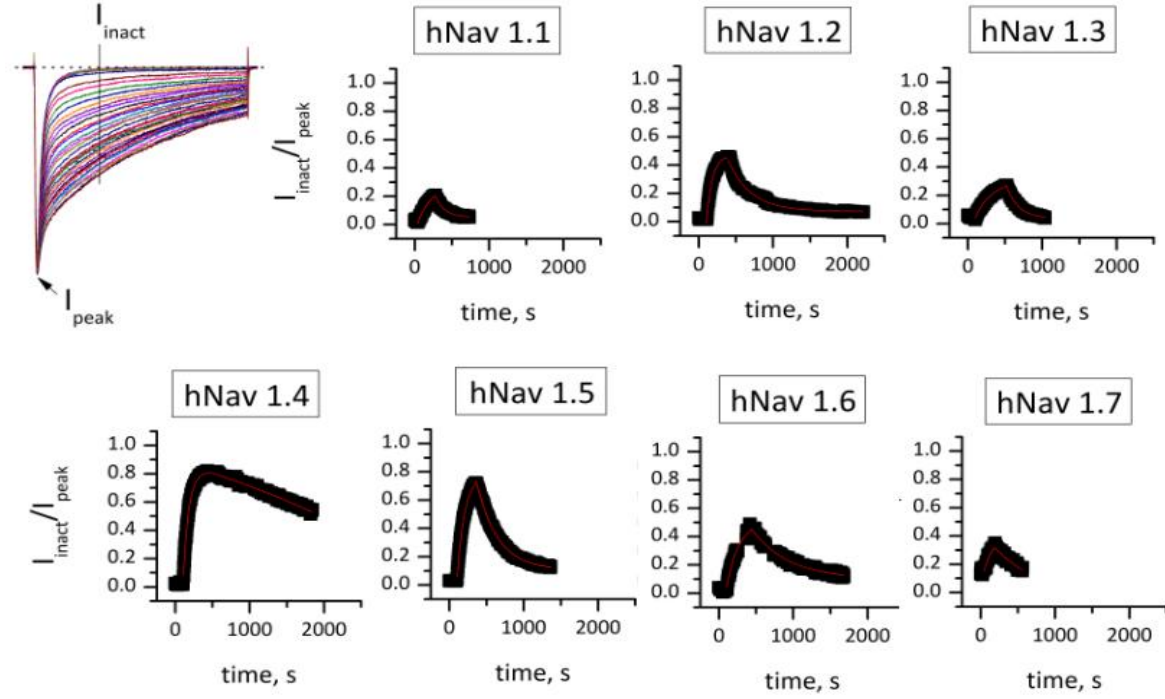
Lab1 peptidi varlığında HEK-293 hücrelerinde $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ ve $\text{Na}_v1.7$ kanalları üzerinde Patch-clamp tekniği ile gerçekleştirilen elektrofizyoloji testlerine ait sonuçlar Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 ile verilmiştir. Ayrıca, elektrofizyoloji çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin normalizasyon sonuçları Şekil 4.16 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.14 a) Na_v 1.1, b) Na_v 1.2, c) Na_v 1.3, d) Na_v 1.4 kanalları ile gerçekleştirilen elektrofizyoloji çalışmaları sonuçları



Şekil 4.15 a) Na_v 1.5, b) Na_v 1.6, c) Na_v 1.7 kanalları ile gerçekleştirilen elektrofizyoloji çalışmaları sonuçları



Şekil 4.16 Elektrofizyoloji çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin normalizasyon sonuçları

Diğer yandan, Patch-clamp metodu ile elektrofizyolojik çalışmaların gerçekleştirildiği Na⁺ kanallarından elde edilen depolarizasyon (τ_{on}) ve repolarizasyon (τ_{off}) zamanlarındaki değişimler kayıt altına alınmıştır.

Bu kayıtlara bağlı olarak K_D değerleri hesaplanmış ve değerler Çizelge 4.4' de verilmiştir. K_D değerleri aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$K_D = \frac{(K) \times \tau_{on}}{\tau_{off} - \tau_{on}} \quad (4.1)$$

Çizelge 4.4 Çalışmalarda kullanılan Na⁺ kanallarının Lab1 peptidi ile muamelesi sonucu elde edilen τ_{on} , τ_{off} ve K_D değerleri

	I(570 ms)/I(peak)	τ_{on} ms	τ_{off} (ms)	K_D (nM)
Nav 1.1	0.29	197	129	1450
Nav 1.2	0.47	79	305	175
Nav 1.3	0.31	224	159	1700
Nav 1.4	0.81	72	NA (Çok yavaş)	NA
Nav 1.5	0.78	103	278	294
Nav 1.6	0.52	171	497	262
Nav 1.7	0.30	NA (Çok yavaş)	NA (Çok yavaş)	NA

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde akrepler nedeniyle oluşan zehirlenmeler birçok farklı araştırmacı tarafından bildirilmiş, özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde halk sağlığı açısından önemli bir problem olduğu gösterilmiştir (Altınkurt vd., 1980). Bu çalışmalarla halk sağlığı için önemli olan türler; *Androctonus crassicauda*, *Leiurus abduhbayrami*, *Buthacus macrocentrus*, *Mesobuthus gibbosus* ve *Mesobuthus eupeus* olarak bildirilmiştir (Caliskan vd., 2012). Ülkemiz faunasına ait 39 farklı akrep türü bulunmasına karşın gerçekleştirilen çalışmalar genellikle halk sağlığı açısından tehdit oluşturan akrepler nedeniyle oluşan zehirlenmeler ve bu vakalara ait hastane verilerini içermektedir. Oysaki ülkemizde memelilere toksik olmadığı bilinen yaklaşık 30' dan fazla akrep türü bulunmasına karşın, akrep venom bileşenlerinin anti-venom hazırlanması dışında iyiletim yöntemlerinin geliştirilmesi için gerçekleştirilen araştırmalar neredeyse yok denecek kadar azdır.

Ülkemiz akrep faunası içerisinde bulunan ve 12 türden üyesi bulunan Buthidae familyasına ait, Güneydoğu Anadolu bölgesinde yayılım gösteren Türkiye' ye endemik bir akrep türü olan *Leiurus abduhbayrami* yakın geçmişte 2009 yılında bilimsel literatüre kazandırılmıştır (Yagmur vd. 2009). 2009 yılına kadar bu tür *Leiurus quinquestriatus* olarak tanımlanmaktaydı. Bu nedenle *Leiurus abduhbayrami* türü ile yapılan çalışmalar çok yeni ve az sayıdadır.

Çalışmalar kapsamında Gaziantep İli, Nizip İlçesi' ne bağlı Korucak Köyü' nden 43 adet akrep toplanarak Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı' na getirilmiş ve canlı olarak saklanmıştır. Ayda bir kez olmak koşulu ile elektrostimülasyon yöntemi ile sağımları gerçekleştirilmiş ve ham venomları elde edilmiştir. Ham venomun konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre ile Protein A₂₈₀ metodu ile ölçülmüştür. Ham venomun HPLC' de 60 dakika süresince ayrımı gerçekleştirilmiştir. Ayrım sırasında tüm fraksiyonlar toplanmıştır.

Ham venomun ayırımından elde edilen 30. ve 40. dakikalar arasındaki majör fraksiyonların farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonu yapılmıştır. 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin enjeksiyonu sonrası gözlenen semptomlar ve ölüm ile ilgili bilgiler elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Bu bilgiler ışığında 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin memelilere toksik olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyon seçilerek çalışmalar bu fraksiyon üzerinden sürdürülmüştür.

Ayrıştırma yöntemleri ile yüksek saflıkta elde edilen 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptid Lab1 olarak adlandırılmış ve alkilasyon öncesi moleküler ağırlık belirleme çalışmaları yapılarak moleküler ağırlığının 6809,55 Da. olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Lab1 peptidinin aminoasit diziliminin belirlenebilmesi için N terminal uçtan okuma gerçekleştirilmeden önce içerdiği disülfid bağlarının indirgenmesi amacı ile alkilasyon işlemi uygulanmıştır. Alkilasyon basamaklarının uygulanmasından sonra HPLC cihazına yüklenen örneğin ayırım işlemi sonucunda 5 farklı fraksiyon saptanmıştır (Şekil 4.3). Elde edilen fraksiyonlardan majör olan 33,27 ve 34,28 dakika alıkonma zamanına sahip peptidler seçilerek moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonucu elde edilen moleküler ağırlıkların 33,27 dakika alıkonma zamanına sahip peptid bileşenin 7274,3 Da., 34,28 dakika alıkonma zamanına sahip peptid bileşenin 7273,03 Da. molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). Moleküler ağırlık sonuçlarının çok yakın değerlerde olması bize bu iki fraksiyonun da aynı moleküle ait olduğunu göstermiştir. Çalışmalara moleküler ağırlık belirleme çalışmaları sonuçlarına bakılarak devam edilmiştir. HPLC çalışması sonucunda daha saf olarak elde edildiği anlaşılan 33,27 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyon bize peptidin moleküler ağırlığını vermiştir. Alkillenmiş peptidin averaj moleküler ağırlığı 7274,3 Da. olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.5).

Alkilasyon işlemlerinde kullanılan iyodoasetamid molekülünün moleküler ağırlığı 57,00 Da' dır. Alkillenen peptidin moleküler ağırlığı olan 7274,3 Da.'dan saf peptidin moleküler ağırlığı 6809,55 Da. çıkarıldığında peptide toplam eklenen iyodoasetamid miktarı 465 Da. olarak bulunmuştur. Bu durumda 465 Da. farkı iyodoasetamidin moleküler ağırlığı olan 57,00'a bölüldüğünde 8 sayısı bulunmaktadır. Bu sayı peptide bağlanan

iyodoasetamid sayısını dolayısı ile peptidin içerdiği sistein amino asidi sayısını belirtmektedir. Bu bilgiler ışığında Lab1 peptidinin içerdiği 8 sistein aminoasidi nedeniyle akrep toksinleri için bir sınıflandırma kriteri olan 4 disülfid köprüsü ile paketlenmiş olduğu belirlenmiştir.

Alkile olmuş 33,27 dakika alıkonma zamanına sahip peptid ilk önce herhangi bir enzim ile yıkıma uğratılmadan protein sekanslama cihazına yüklenmiş ve N- terminal uçtan başlayan 26 adet aminoasit içeren VRDGYIAKPENCVYHCIPDCDTLX/CXA dizilimi elde edilmiştir (Şekil 4.9). Elde edilen bu dizilimin ilk 23 aminoasidi NCBI veri tabanında bulunan BLAST benzerlik aracı ile veritabanındaki diğer peptidler ile karşılaştırılmıştır. Elde edilmiş 26 aminoasit bilgisine dayanılarak yapılan BLAST analizi sonucunda dizilimi çalışılan peptide en yakın peptidin (Şekil 4.10) VRDGYIAQPENCVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIACWCNALPDNVGI IVDGVKCHK dizilimine sahip *Leiurus quinquestriatus habreus*' tan izole edilmiş olan Lqh6 peptidi olduğu ve aminoasit dizilim benzerlik oranının %96 olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan peptidin 26 adet aminoasitinin Lqh6 diziliminden sadece 8. pozisyondaki Q (Glutamin) in Lab1 peptidinde K (Lizin) ile yer değiştirdiği belirlenmiştir. Aminoasit dizisinde yakalanan bu yüksek benzerlik oranı Lab1 peptidi ile gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalara önemli katkılar sağlamıştır. Elde edilen bu bilgiler ışığında Lab1 peptidi yapı çalışmaları için model olarak Lqh6 kullanılmış ve ExPasy/ Protein Prospector ile Asp-N enzim yıkımı seçilerek yıkım *in silico* olarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3) ve peptid parçaları manuel olarak birleştirilerek olası dizilimler araştırılmıştır (Şekil 4.11)

Protein sekanslama cihazının tek bir okumada uzun aminoasit dizilerini yüksek başarı oranı ile okuyamadığı bilinmektedir. Bu nedenle peptid N- terminal uçtan, aspartik asit rezidülerinden yıkım yapabilen Asp-N endopeptidaz enzimi ile yıkılmıştır. Enzimatik yıkım sonrasında örnek HPLC cihazına yüklenmiş ve ayırım sonucunda 6 adet fraksiyon elde edilmiştir (Şekil 4.6). Bu fraksiyonlar içinden; majör fraksiyonlar olan 23,88; 25,26 31,27 ve 32,83 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonlar toplanarak daha sonra tekrar moleküler ağırlıkları hesaplanmıştır. 23,88 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonun saf olmayarak iki bileşenden oluştuğu, bir bileşenin moleküler ağırlığının 2211,16 Da. diğer bileşenin moleküler ağırlığının ise 1566,99 Da. olduğu tespit edilmiştir. 25,26 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonun da saf olmadığı ve iki bileşenden oluştuğu,

bir bileşenin moleküler ağırlığının 2211 Da. diğer bileşenin moleküler ağırlığının 1935 Da. olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). 31,27 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonun yüksek saflıkta olduğu ve moleküler ağırlığının 2657 Da. olduğu tespit edilmiştir. 32,28 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonun da yüksek saflıkta olduğu ve moleküler ağırlığının 2657,2 Da. olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Bu yakın moleküler ağırlık gruplanmaları bize 23,88 dakika alıkonma zamanına ve 25,26 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonların; 31,27 dakika alıkonma zamanına ve 32,28 dakika alıkonma zamanına sahip fraksiyonların aynı moleküller olduğunu göstermiştir. Protein sekanslama cihazına yüklenen tüm fraksiyonlara ait aminoasit dizilimleri elde edilmiştir. Lqh6' nın kesim sonucu baz alınarak manuel olarak birleştirilmiş ve peptide ait aminoasit dizilimi tam olarak elde edilmiştir.

Bu sonuçlara göre çalışmalarda kullanılan *Leiurus abduallahbayrami* türü akrepte bulunan 33,01 dakika alıkonma zamanına sahip peptidin aminoasit dizilimi (Şekil 4.12) VRDGYIAKPENCYVYHCIPDCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIACWCNLPDNLVGI IVDGVKCHK' dir. NCBI veritabanında yer alan BLAST benzerlik analizi sonucunda peptidin daha önce literatüre kazandırılmış; *Leiurus quinquestriatus habreus* türü akrepten izole edilmiş Lqh6 peptid diziliminden tek bir aminoasit farkı ile ayrıldığı bulunmuştur. Bu farklılık 8. pozisyondaki polar ve yüksüz Glutamin(Q) yerine Lab1 peptidinde pozitif yüklü ve bazik olan Lizin (K) aminoasidi yer almasıdır. Geriye kalan diğer 63 aminoasidin aynı sırada ve aynı cinsten olduğu görülmüştür. İlk aminoasit karşılaştırmasında belirlenen %96'lık benzerlik oranı, tüm dizilimin karşılaştırılması sonucunda %98'e yükselmiştir (Şekil 4.13).

İlk aminoasit dizisi belirleme çalışmalarına ek olarak Lab1 peptidinin tüm aminoasit dizisinin belirlenmesinden sonra BLAST benzerlik analizi tekrarlanmıştır. Gerçekleştirilen bu analiz sonucunda Lab1 peptidine aminoasit dizilimi olarak en yakın peptidler *Leiurus quinquestriatus habreus*' tan izole edilen Lqh6, Lqh 7 ve Lqh 3 peptidleridir (Şekil 5.1). Lab1 peptidinin sınıflandırılması, etki mekanizmasının araştırılması ve farmakolojik özelliklerinin belirlenebilmesi açısından aminoasit dizilimi bakımından benzerlik oranı en yüksek olan peptidler incelenmiştir.

	*****	****	**	*	*****	***	*****	***	*****	*****	*****	* ***									
Lab1	VRDGYIAK	PENC	VYHC	I	P---	DCD	TLCK	DNGGT	GGHC	GFKL	GHG	IACW	CNAL	PDNV	GII	VDG	VK	CHK			
Lqh6	VRDGYIAQ	PENC	VYHC	I	P---	DCD	TLCK	DNGGT	GGHC	GFKL	GHG	IACW	CNAL	PDNV	GII	VDG	VK	CHK	%98		
Lqh7	VRDGYIAK	PENCA	AHHC	F	P	GSSG	CDTL	CKEN	GGT	GGHC	GFKV	GHG	TACW	CNAL	PKV	GII	VDG	VK	CHK-	%83	
Lqh3	VRDGYIAQ	PENC	VYHC	F	P	GSSG	CDTL	CKE	GGT	S	GGHC	GFKV	GHGL	ACW	CNAL	PDNV	GII	VE	GEK	CHS	%79

Şekil 5.1 Lab1 peptidinin Lqh6, Lqh 7 ve Lqh 3 peptidlerinin aminoasit dizilimlerinin benzerlik karşılaştırılması ve oranları

Lab1 peptidinin alıkonma zamanı 30. ve 40. dakikalar arasındadır. Bilgilerimize göre bu dakikalar arasında elde edilen akrep venom peptidleri Na^+ kanalları üzerinde etki göstermektedir. Bu bilgiye ek olarak Lqh6 peptidinden yapısal olarak sadece tek bir aminoasit farklılığı içermesi nedeniyle, fonksiyonel olarak da benzerlik taşıyacağı ön görülmüştür. Bu nedenle Lab1 peptidinin Na^+ kanalları üzerindeki etkileri Patch-clamp metodu kullanılarak elektrofizyolojik çalışmalar ile belirlenmiştir.

Çalışmalarda HEK-293 hücrelerinin eksprese ettiği $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ ve $\text{Na}_v1.7$ kanalları kullanılmıştır. Peptidin kanal üzerindeki etkileri, kanalların polarizasyon ve depolarizasyon zamanlarındaki değişimler ve K_D değerleri belirlenmiştir.

Elektrofizyoloji çalışmaları sonucunda peptidin çalışılan tüm Na^+ ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ ve $\text{Na}_v1.7$) kanalları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Ancak, hesaplanan K_D değerleri göz önünde bulundurulduğunda en fazla etkinin; $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.3$ ve $\text{Na}_v1.4$ kanalları üzerine olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Elde edilen elektrofizyoloji sonuçları Lab1 peptidinin etki mekanizmasının diğer α benzeri toksin ailesinin fertleri gibi Na^+ kanallarının inaktivasyonunu yavaşlatarak gösterdiğini ortaya koymuştur. (Hamon vd., 2002).

Elektrofizyolojik sonuçlar 500 nM derişimde Lab1 kullanılarak belirlenmiştir. Oysaki %98 benzerlik gösteren Lqh6 peptidi ile HEK-293 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen Na^+ kanal çalışmalarında derişim 10 mM olarak kullanılmıştır (Hamon, vd,

2002). Peptid konsantrasyonundaki 20 kat farklılığın 8. pozisyonda meydana gelen Glutamin (Q)/ Lizin (K) aminoasit doğal mutasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Meydana gelen doğal mutasyonun peptidin 8. pozisyonundaki aminoasitte yani ilk kısımlarında meydana gelmesi; peptid katlanmaları sırasında peptidin yüzeyinde bulunan bir aminoasit olarak iyon kanalları ile bağlanmada direkt olarak rol aldığını düşündürmektedir. Buna ek olarak da Glutamin/ Lizin değişimi polar yüksüz bir aminoasitten pozitif yüklü bazik bir aminoasite değişimi göstermektedir. Bu değişimin de proteinin fonksiyonunda bir değişikliğe neden olduğu ve Lab1 peptidinin düşük konsantrasyonunda belirlenen yüksek ve anlamlı etkilerinin bu yapısal farklılık nedeni ile olduğu düşünülmektedir.

Na_v kanalları özellikle beyin, sinir sistemi hücrelerinde ve kaslarda yüksek oranda eksprese edilmektedir. Tüm Na^+ kanalları içerisinde Lab1 peptidinin en etkili olduğu kanal tiplerinden olan Na_v 1.1 ve Na_v 1.3 kanalları merkezi ve periferik sinir sistemi ile kalp miyositlerinde eksprese edilirken Na_v 1.4 kanalı iskelet kaslarında yoğun olarak eksprese edilmektedir. Na_v 1.1 kanalı epilepsi ve migren gibi hastalıklar ile Na_v 1.3 kanalı epilepsi ve genel ağrı ile Na_v 1.4 kanalı ise paraliz ve fizyolojik tetanoz ile ilişkilidir (IUPHAR – International Union of Basic and Clinical Pharmacology). Elde edilen veriler ışığında Na_v 1.1, Na_v 1.3 ve Na_v 1.4 kanallarında meydana gelen işlev ya da fonksiyon bozuklukları sonucu ortaya çıkan epilepsi, migren ve genel ağrı gibi insidansı yüksek rahatsızlıklarla ilgili hastalıkların araştırılmasında doğal bileşenlerden biri olan akrep venom peptidleri kullanılabilir. Na^+ kanalları üzerinde yapılacak daha detaylı doz ve fonksiyon çalışmaları sonucu bu rahatsızlıkların giderilmesinde kullanılabilir toksik olmayan bir farmakolojik araç geliştirilebileceği öngörülmektedir.

Ülkemiz akreplerin de yer aldığı zengin bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Akrep venomları kompleks venom bileşimine sahip canlılar olmasından dolayı Türkiye’ye endemik bir türden ilk Na^+ kanalına etkili peptid bu çalışma ile elde edilmiştir. Ülkemizin ölümlerle sonuçlanan zehirlenmelerinde önemli bir yeri bulunan bu bileşenlerin tanımlanması anti-venom çalışmaları için bir basamak yaratacaktır. Ayrıca iyon kanalları araştırmaları için farmakolojik bir araç olarak kullanılabilir bir peptid Lab1 adı ile ülkemiz tarafından uluslararası literatüre kazandırılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anonim, 2017, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), <http://www.ub.ntnu.no/scorpion-files>, erişim tarihi 10.04.2017.
- Anonim, 2017, International Union of Basic and Clinical Pharmacology, <http://www.iuphar.org>, erişim tarihi 12.04.2017.
- Anonim, 2017, The Universal Protein Resource, <http://www.uniprot.org>, erişim tarihi 14.04.2017.
- 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, 193-207.
- Aboumaâd, B., Tiger, A., Khattabi, A., Soulaymani, R., Lahssaini, M., Benhassain, S.M., Iba, N., 2014, Cardiac involvement and its complications about three cases of severe scorpion envenomation, *Toxicon*, 78, 78–82.
- Adıguzel, 2010, *In vivo* and *in vitro* effects of scorpion venoms in Turkey, a mini review, *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis* V.16, n.2, p. 198-211.
- Altinkurt, O., ve Altan, M., 1980, Urfa yöresi akrep (*Androctonus crassicauda*) zehrinin deney hayvanlarındaki farmakolojik etkileri ile bu etkilerden bir çoğuna streptomisin' in antagonistik cevapları, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 10, 41-60
- Barona, J., Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z., Lagunas- Gomez, F., Wanke, E., Otero, R., Possani, L.D., 2006, Proteomic analyses of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺ and K⁺ channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*, *Biochemica et Biophysica Acta*, 76-84.
- Batista, C.V., Gomez-Langunas, F., Lucas, S., Possani, L.D., 2000, Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺- channels, *FEBS Letters*. 486, 117-120.
- Bourinet, A., Zamponi, G.W., 2016, Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins, *Neuropharmacology*, 1-7.
- Caliskan, F., Garcia, B.I., Coronas, F.I.V, Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z and Possani, L.D., 2006, Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: Peptides and genes, *Toxicon*, 48, 12-22.
- Caliskan, F., Garcia, B.I., Coronas, F.I.V., Restano- Cassulini, R., Korkmaz, F., Sahin, Y., Corzo, G., Possani, L.D. Purification and cDNA cloning of a novel neurotoxic peptide (Acra3) from the scorpion *Androctonus crassicauda*, 2012, *Peptides* 37, 106-112.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Caliskan, F., Quintero- Hernández, V., Restano- Cassulini, R., Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z., Coronas, F.I.V., Possani, L.D., 2012, Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: General characterization of the venom and description of Bu1, a ponent mammalian Na⁺ channel α -toxin, *Toxicon* 59, 408-415.
- Caliskan, F., Ergene, E., Sogut, I., Hatipoglu, I., Basalp, A., Sivas, H., Kanbak, G., Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a Mouse brain tumor cell line (BC3H1) and production of spesific monoclonal antibodies, 2013, *Toxicon* 76, 350-361.
- Chaisakul, J., Hodgson, W.C., Kuruppu, S., Prasongsook, N., 2016, Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer, *Journal of Cancer*, 7(11).
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008, Epidemiology of scorpionism: a global appraisal, *Acta Trop.*, 107, 71- 9.
- Chippaux, J.P., 2012, Emerging options for the management of scorpion stings, *Drug Design, Development and Therapy*, 6, 165-173.
- Cohen-Inbar, O., Zaaroor, M., 2016, Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story, *Toxicon*, 33, 52-58.
- Corzo, G., Escoubas, P., Vllagas, E. Barnhjam, K.J., He, W., Norotn, R.S., Nakajima, T., 2001, Characterization of unique amphipatic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*, *Biochem. J.*, 359, 35-45.
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2002, Purification, structure-function analysis and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 1514-1552.
- 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, *Am. J. Physiol.*, 264, 361-9.
- De Lima, M.E., Borges, M.H., Verano-Braga, T., Torres, F.S., Montandon G.G., Cardoso F.L., 2010, Some arachnidan peptides with potential medical application, *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 16, 8-33.
- Diego-Garcia, 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, 72-82.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Diego-Garcia, E., Caliskan, F., Tytgat, J., 2014, The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides, *BMC Genomics*, 15, 295.
- Ding, J., Chua, P.,J., Bay, B.,H., Gopalakrishnakone, P., 2014, Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutics compounds, *Exp. Biol. Med.*, 239 (4); 387-393.
- Dutertre, S., Nouira, S., Besbes-Ouanes, L., 1999, Dobutamine in severe scorpion envenomation: effects on standadakika alıkonma zamanı hemodynamics, right ventricular performance and tissue oxygenation, *Chest*, 116, 748-53.
- Erdes, E., Dogan- Somay, T., Cosar, I., Danisman, T., Kunt, K.B., Seker, T., Yucel, M., Ozen, C., 2014, Characterization of *Leiurus abduallahbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity, *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 20: 48.
- Escoubas, P., Stankiewicz, M., Takaoka, T., Pelhate, M., Romi-Lebrun, R., Wu, F., Nakajima, T., 2000, Sequence and electrophysiological characterization of two insect-selective extraordinary toxins from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii*, *FEBS Letters*, 483, 175-180.
- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeb, M., Rochat, H., Allen, P.D., Pessah, I.N., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2000, Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca⁺² release channel/ryanodine receptors, *FEBS Lett.*, 469, 179-185.
- Gazarian, K.G., Gazarian, T., Hernandez, R., Possani, L.D., 2005, Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines, *Vaccine*, 23, 3357-3368.
- Gomes, A., Bhattacharjae, P., Mishra, R., Biswas, A.K., Dasgupta, S.C., Giri, B., 2010, Anticancer potential of animal venoLC-MS-ESI and toxins, *Indian J. Exp. Biol.*, 48, 93-103.
- Gopalakrishnakone, P., Cheah, J.,And Gwee, M.C.E, 1995, Black scorpion (*Heterometrus longimanus*) as a laboratory animal maintance of colony of scorpion for milking of venom for research, using a restraining device, *Laboratory Animals*, 29, 456-458.
- Gordon, D., Gurevitz, M., 2003, The selectivity of scorpion toxins for sodium channel subtypes is determaind by subtle variations at the interacting surface, *Toxicon*, 41, 125-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., Zinn-Justin, S., 1998, Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels, *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 17,2, 131-159.
- Gueron, M., Ilia, R., Sofer, S., 1992, The cardiovascular system after scorpion envenomation, A review *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 30, 245-58.
- Gurrola, G.B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L.D., Wanke E., 1999, A toxin to nervous, cardiac and endocrine ERG K^+ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom, *Faseb j.*, 13, 953-963.
- Hamon, A., Gilles, N., Sautie` re, P., Martinage, A., Kopeyan, C., Ulens, C., Tytgat, J., Lancelin, J.M., and Gordon, D., 2002, Characterization of scorpion a-like toxin group using two new toxins from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, *Eur. J. Biochem.*, 269, 3920–3933
- Hjelle, J.T., 1990, *Anatomy and morphology, The biology of scorpions*, Stanford, CA: Stanford University Pres., 9-63
- Jover, E., Cauraud, F., Rochat, H., 1980, Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1607-1614.
- Karatas, A., 2001, Doğu Akdeniz Akrep (Scorpiones) Faunası, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 93s.
- Karatas, A., Caliskan, F., Caliskan, H., Sirin, U., 2005, The scorpion fauna of Turkey, 7th International meeting of experts on envenomation from poisonous animals, March, Cuernavaca, Mexico, 119 p.
- Kourie, J.I., Shorthouse, A.A., 2000, Propedakika alikonma zamanies of cytotoxic peptide forming ion channels, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 278, 1063-78.
- Kloock, C.T., Kubli, A., Reynolds, R., 2010, Ultraviolet light detection: A function of scorpion fluorescence, *Journal of Arachnology*, 38(3), 441-5.
- 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*, 1-7.
- Legros, C., Ceard, B., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 1998a, Evidence for a new class of scorpion toxins active against K^+ channels, *FEBS Lett.*, 431, 375-380.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lewis, R.J., Garcia, M.L., 2003, Therapeutical potential of venom peptides, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 790-802.
- Lopez-Gonzalez, I., Olamendi-Portugal, T., De La Vega-Beltran, J.L., Van der Walt, J., Dyason, K., Possani, L.D., Felix, R., Darszon, A., 2003, Scorpion toxins that block T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 408-414.
- Martin-Eauclaire, M.F., Pimenta, A.M.C., Bougis, P.E., De Lima, M.E, 2016, Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 119, 253-265.
- Meki, A., Mohey-Eldean, Z.M., 1998, Serum interleukin-1b, interleukin-6, nitric oxide and a1-antitrypsin in scorpion envenomed children, *Toxicon*, 36, 1851-1859.
- Nirathanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph J.S., Sato, K., Tytgat, J., 2005, Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kapa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappahefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom, *Biochem. Pharmacol.*, 69, 669-678.
- Ortiz, E., Gurrola, G.B., Ferroni, Schwartz, E., Possani, L.D., 2015, Scorpion venom components as potential candidates for drug development, *Toxicon* 93, 125-135.
- Ozkan, O., Karaer, Z., 2003, The scorpion in Turkey, *Turk Bul. Hyg. Exp. Biol.*, 60(1), 55-62.
- Ozkan, O., Karaer, Z., 2007, Akreplerin Biyolojisi, *Turk Bul. Hyg. Exp. Biol.*, 64(1), 51-60.
- Ozkan, O., Yagmur, E.A., Ark, M., 2011, A newly described scorpion species, *Leiurus abduhbayrami* (Scorpion: Buthidae), and the lethal potency and in vivo effects of its venom, *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, (17)4, 414-421.
- Polis, G.A., 1990, *The biology of scorpions*, New York: Stanford Universtiy Press, p.504.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, J., 1982, The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centrurodies noxius* Hoffman, *Carlsberg Res. Commun.*, 285-289.
- Quintero- Hernández, V., Jimenénez-Vargas J.M., Gurrola, G.B., Valdivia, H.H.F., Possani, L.D., 2013, Scorpion venom components that affect ion-channels function, *Toxicon*, 76, 328-342.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rein, J.O, 2014, The Scorpion Files, Trondheim, Norwegian University of Science and Technology, Available online [http:// www.ub.ntnu.no/ub/scorpion-files](http://www.ub.ntnu.no/ub/scorpion-files) (erişim tarihi 1 Ekim 2015).
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2005, Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationship and evaluation, *Toxicon*, 46(8), 831-44.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2007, Novel paradigms on scorpion toxins that effects the activating mechanism of sodium channels, *Toxicon*, 49, 171-180.
- Rodríguez- Ravelo, R., Batista, C.V.F., Coronas, F.I.V., Zamudio, F.Z., Hernández-Orihuela, L., Espinosa-López, G., Ruiz-Urquiola, A., Possani, L.D., Comparative proteomic analysis of male and female venom from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*, 2015, *Toxicon* 107, 327-334.
- Salem M.L., Shoukry N.M.,Teleb W.K., Abdel-Daim M.M, Abdel-Rahman, M.A., 2016, In vitro and in vivo antitumor effects of the Egyptian scorpion *Androctonus amoreuxi* venom in an Ehrlich ascites tumor model, *Springer Plus*, 5:570.
- Sautiere, P., Castele, S., Kopeyan, C., Martinage, A., Drobecq, H., Doljansky, Y, Gordon, D., 1998, New toxins acting on sodium channels from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* suggest a clue to mammalian vs insect selectivity, *Toxicon*, 36, 8, 1141- 1154.
- Shao, J.H., Cui, Y., Zhao, M.Y., Wu, C.F., Liu, Y.F., Zhang, J.H., Purfication, characterization and bioactivity of a new analgesic- antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*, 2014, *Peptides* 53, 89-96.
- Sirinivasan, K.N., Gopalakrishnakone, P., Tan, P.T., Chew, K.C., Cheng, B., Kini, R.M., Koh, J.L., Seah, S.H., Brusic, V., 2002a, SCORPION, a molecular database of scorpion toxins, *Toxicon*, 40, 23-31.
- Stahlavsky, F., Koc, H., Yagmur, E.A., The first record of karyotypes in *Leiurus abdullahbayrami* and *Composobuthus matthiesseni* (Scorpiones: Buthidae) from Turkey, 2014, *North Western Journ. of Zoology* 10 (2), 355-358.
- Tan, P.T., Veeramani, A., Srinivasan, K.N., Ranganathan, S., Brusic, V., 2006, SCORPION2: a database for structure-function analysis of scorpion toxins, *Toxicon*, 47, 356-363.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Uawonggul, N., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Arkaravichien, T., Bunyatratchata, W., Ruangrachuporn, W., Jearanaiprepame, P., Nakamura, T., Matsuda, M., Kobayshi, M., Hattori, S., Daduang, S., 2207, Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom, *Toxicon*, 49, 19-29.
- Valdez- Velazquez, L.L., Romero- Gutierrez, M.T., Delgado- Enciso, I., Dobrovinskaya, O., Melnikov, V., Quintero-Hernandez, V., Ceballos-Magana, G., Gaitan- Hinojosa, M.A., Coronas, F.I., Puebla-Perez, A.M., Zamudio, F., Cruz-Garcia, I.D., Vazquez-Vuelvas, O.F., Soriano- Hernandez A.D., Possani, L.D., 2016, Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities, *Toxicon*, 118, 95-103.
- Volschenk, E.S., Mattoni, C.I., Prendini, L., 2008, Comparative anatomy of the mesosomal organs of scorpions (Chelicerata: Scorpiones), with implications for the phylogeny of the order, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154, 651-675.
- Wulff, H., Castle, N.A., Pardo, L.A., 2009, Voltage- gated potassium channels as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, 982-1001.
- Xu, X., Duan, Z., Di, Z., He, Y., Li, J, Li, Z, Xie, C., Zeng, X., Cao, Z., Wu, Y., Liang, S., Li, W. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Mesobuthus martensii*, 2014, *Journ. Of Proteomics* 106, 162-180.
- Yagmur, E.A., 2005, Gaziantep Akrepleri (Ordo: Scorpiones) ve Zoocoğrafik Dağılımları, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 136 s.
- Yagmur, E.A., Koç, H., Kunt, K.B., 2009, Description of a new species of *Leiurus Ehrenberg*, 1828 (Scorpiones: Buthidae) from Southeastern Turkey, *Euscorpius*, 85
- Yagmur, E.A., 2011, Güneydoğu Anadolu Akrep (Arachnida: Scorpiones) Faunası: Sistematığı ve Zoocoğrafyası, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 220 s.
- Yagmur, E.A., Tropea, G., 2016, Two New Species of *Euscorpius* Thorell, 1876 from Southern Turkey (Scorpiones: Euscorpiidae), *Euscorpius*, 234.
- Zeng, X.C., Wang, S.X., Zhu, S.Y., Li, W.X., 2004, Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsc, *Peptides*, 25, 143-150.
- Zeng, X.C., Corzo, G., Hahin, R., 2005, Scorpion venom peptides without disulfide bridges, *IUBMB Life*, 57, 13-21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zeng, X.C., Wang, S., Nie, Y., Zhang, L., Luo, X., 2012, Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: Gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides, *Peptides*, 33, 44-51.
- Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., Wenxin, L., 2006, Genetic mechanism of scorpion venom peptide diversification, *Toxicon*, 47, 348-355.
- Zuo, X.P., Ji, Y.H., 2000, Molecular mechanism of scorpion neurotoxins acting on sodium channels: insight into their diverse selectivity, *Mol. Neurobiol.*, 30, 365-278.