

***Protoiurus kraepelini* (SCORPIONES: IURIDAE) ZEHRİNİN
PEPTİDOMİK KARAKTERİZASYONU VE BİYOAKTİVİTE
TARAMASI**

**PEPTIDOMIC CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITY
SCREENING OF *Protoiurus kraepelini* (SCORPIONES:
IURIDAE) VENOM**

TUĞBA DOĞAN

**Prof.Dr.Afife İzbırak
Tez Danışmanı
Doç.Dr.Can ÖZEN
İkinci Danışman**

Hacettepe Üniveristesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

Tuğba Doğan'ın hazırladığı “**Protoiurus kraepelini (Scorpiones: Iuridae) Zehrinin Peptidomik Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Taraması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Sibel Sümer

Başkan

.....

Prof.Dr.Afife İzbırak

Danışman

.....

Doç.Dr.İ.Çağatay Karaaslan

Üye

.....

Yrd.Doç.Dr.Salih Özçubukçu

Üye

.....

Yrd.Doç.Dr.Erhan Astarıcı

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof.Dr.Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Dünyam, Canım Kızım Zülal'ime...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10/07/2015

Tuğba DOĞAN

ÖZET

***Protoiurus kraepelini* (SCORPIONES: IURIDAE) ZEHRİNİN PEPTİDOMİK KARAKTERİZASYONU VE BİYOAKTİVİTE TARAMASI**

Tuğba DOĞAN

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Afife İZBIRAK

İkinci Danışman: Doç.Dr.Can ÖZEN

Temmuz 2015, 112 sayfa

Hayvan zehirleri biyolojik olarak aktif ve inaktif maddelerin bir karışımıdır. Zehirler; proteinler, peptitler, poliamin nörotoksinler, enzimler, nükleik asitler, serbest amino asitler, monoaminler, serbest asitler ve inorganik tuzlar gibi çok çeşitli ve neredeyse sınırsız biyolojik fonksiyona sahip biyoaktif moleküllerden oluşmaktadır. Ancak esas biyolojik aktiviteye protein ve peptit bileşenleri sahiptir. Zehirlerin yapısında bulunan peptitler farmasötik öneme sahiptir. Bu peptitler milyonlarca yıllık evrimsel süreçte doğal seçim yoluyla oluşmuş peptit kütüphaneleri olarak tanımlanabilir ve yeni ilaçların geliştirilmesi açısından büyük bir kaynak durumundadırlar.

Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de tanımlanmış ülkemize endemik bir akrep türü olan *Protoiurus kraepelini* zehrinin peptit içeriğinin

karakterize edilmesi ve biyoaktivitesinin taranmasıdır. Bu amaçla biyokimyasal ve peptidomik yaklaşımlar takip edilmiş aynı zamanda da biyoaktivite taranması için hücresel sistemler kullanılmıştır. Ham zehrin kuru ağırlığa göre protein miktarı %70 olarak bulunmuştur. Elektroforetik tekniklerle zehir yapısında bulunan protein ve peptitlerin molekül ağırlıklarının dağılımı saptanmıştır. Ham zehir için yapılan Glisin SDS-PAGE jelinde yaklaşık 240 kDa'a kadar protein bantları gözlenmektedir. Ham zehir jelinde bulunan 10 kDa civarındaki yoğun bantlar peptit fraksiyonu için yapılan Trisin SDS-PAGE jelinde de doğrulanmıştır. Düşük molekül ağırlıklı peptit ve proteinlerin daha yüksek ayrımını mümkün kılan Trisin SDS-PAGE jelinde ise yaklaşık 2-10 kDa aralığında protein ve peptit bantları gözlenmiştir. Kromatografik yöntemlerle zehir saflaştırılmış ve peptit fraksiyonlarına ayrılmıştır. Peptit fraksiyonu, kütle spektrometre teknolojisi kullanılarak analiz edilmiş ve yapısında bulunan peptitlerin genel kütle profili çıkarılmıştır. Buna göre, *P.kraepelini* zehrinin peptit fraksiyonunda 1000 ile 5000 Da arasında peptit kütleleri gözlenmiştir. Ayrıca, hem ham zehir hem de fraksiyonlar ile antimikrobiyal, sitotoksik ve potasyum iyon kanal testleri gerçekleştirilerek, zehir bileşimi biyoaktivite açısından taranmıştır. Ham zehir (1mg/mL) *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir; peptit fraksiyonlarından ters faz kromatografideki 6 numaralı fraksiyonun (RPF6) 80 µg/mL konsantrasyonda *E.coli* bakterilerinde büyümeyi inhibe etmeye başladığı ve 300 µg/mL konsantrasyonda ise tamamen öldürdüğü, yani güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Ham zehirden elde edilen sonuçlara göre Jurkat hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmezken, peptit fraksiyonu ile (0,25 mg/mL-1mg/mL) doza bağımlı sitotoksik bir etki görülmüştür. Ham zehir (1 mg/mL) ve peptit fraksiyonları (40-80 µg/mL) için K⁺ iyon kanalı üzerinde herhangi bir bloke edici aktivite gözlemlenmemiştir. Zehrin peptit bileşiminin saptanması, zehrin yapısının tanımlanması ve muhtemel biyoaktif bileşenlerin ortaya konması yeni bir peptit ilaç keşfi yönünde önemli bir adım olacaktır. Bu çalışmada ortaya koyulan aktivitelerin hangi peptit ya da peptitlerden kaynaklandığı ileri araştırmalar ile belirlenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Protoiurus kraepelini*, peptidomiks, peptit, toksin, akrep zehri, sitotoksisite, antimikrobiyal etki, K⁺ iyon kanalları, zehirli hayvanlar

ABSTRACT

PEPTIDOMIC CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITY SCREENING OF *Protoiurus kraepelini* (SCORPIONES: IURIDAE) VENOM

Tuğba DOĞAN

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr.Afife İZBIRAK

Co-supervisor: Doç.Dr.Can ÖZEN

July 2015, 112 pages

Animal venoms are mixture of biologically active or inactive substances. They comprise variety of bioactive molecules such as proteins, peptides , polyamines neurotoxins, enzymes , nucleic acids, free amino acids, monoamines, free acids and inorganic salts with unlimited biological functions. However, the main components are proteins and peptides having biological activity. Venom peptides possess pharmacological importance. These peptides are defined as peptide libraries consisting of millions of years by natural selection in the evolutionary process and are a major source in case of development of new drugs .

The aim of this study is to characterize venom of *Protoiurus kraepelini*, a species of scorpions endemic to our country in Turkey, focusing on the content of the venom peptide and check for bioactivity. Peptidomic biochemical approaches have been followed for this purpose and also for detecting bioactivity cellular systems were used. The amount of protein based on dry weight of the crude venom was

found to be 70%. The distribution of molecular weights of proteins and peptides found in the venom content was determined by electrophoretic techniques. For crude venom, on Glycine SDS-PAGE gel, up to about 240 kDa protein bands were observed. In the crude venom gel, intense bands near 10 kDa peptide is confirmed by Tricine SDS-PAGE gel for the peptide fraction. Tricine SDS- PAGE enables a higher separation of low molecular weight peptides and proteins. Using this gel, about 2-10 kDa protein and peptide bands were observed. Venom purified with chromatographic methods and is divided into peptide fractions. The peptide fraction was analyzed using mass spectrometry and mass profile of peptides present in this fraction was detected. Molecular weights of the peptides present in the peptide fraction were found to be about 1000 and 5000 Da. Additionally, both crude venom and peptide fractions were screened for bioactivity with antimicrobial, cytotoxicity and potassium ion channel assays. Crude venom (1 mg/mL) showed antimicrobial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*; the peptide fraction 6 from reverse phase chromatography (RPF6) (80 µg/mL) showed growth inhibition effect on *E.coli*, at 300 µg/mL concentration completely inhibited the growth of *E.coli*. According to the results obtained from the crude venom, no cytotoxic effect on Jurkat cells was observed. However, with the peptide fraction (0.25mg/mL to 1mg/mL) a dose-dependent cytotoxic effect was observed on Jurkat cells. No observable K⁺ ion channel blocking activity was detected for crude venom (1 mg/mL) and venom fractions (40-80 µg/mL). Determination of the venom peptide composition and to demonstrate the potential of bioactive components will be a major step towards the discovery of new peptide drugs. Further research should be conducted to understand which peptides individually responsible for the observed activities.

Keywords: *Protoiurus kraepelini*, peptidomics, peptide, toxin, scorpion venom, cytotoxicity, antimicrobial action, K⁺ ion channels, venomous animals

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan danışman hocam Sayın Prof.Dr.Afife İZBIRAK'a,

Tez çalışmalarım süresince her aşamada bilimsel katkısı, bilgi ve tecrübesiyle ile çalışmalarımı yönlendiren, hoşgörüsüyle bana destek olan, ikinci danışman hocam Sayın Doç. Dr. Can ÖZEN'e;

Çalışmamda kullandığım akrep zehirlerini temin eden Sayın Kadir Boğaç KUNT'a; tez izleme komitemde yer alarak, tez çalışmalarımın boyunca bilimsel tecrübelerini esirgemeyen Sayın hocalarım Prof.Dr.Hatice MERGEN ve Prof.Dr.Meral YÜCEL'e;

Doktora eğitimim süresince beni desteklemelerinden dolayı ODTÜ Merkez Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi Yönetimine, özellikle Sayın Hocam Prof.Dr.Meral YÜCEL'e, desteklerinden dolayı mesai arkadaşlarıma;

Tez çalışmalarım boyunca hiçbir desteği esirgemeyen, yardımlarıyla her aşamada yanımda bulunan ODTÜ Syborg grubumuzdaki değerli arkadaşlarıma; özellikle Hazal Hüsnügil, Selin Gerekçi, Naşit İğci ve Ayşenur Biber'e sonsuz desteklerinden dolayı,

Doktora çalışmamın gerçekleştirilmesi ve uygulanması aşamasında bütçe olanaklarıyla katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne, lisansüstü eğitimim boyunca başarı bursu ile destek olan TÜBİTAK'a,

Yoğun çalışma temposunda sevgisi, sabrı ve sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olup, tüm zorlukları aşmam için beni yüreklendiren sevgili eşim Erkan DOĞAN'a, varlığıyla hayatıma anlam katan canım kızım Zülal'e, hayatımın her anında destekleriyle yanımda olan canım aileme,

Teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiv
1.GİRİŞ	1
2. HAYVAN ZEHİRLERİ	5
2.1. Zehirlerin Genel Etki Mekanizması.....	7
2.2.Venomik Projesi	8
2.3. Arachnid'ler, Akrepler ve Akrep Zehirleri.....	9
2.3.1.Arachnid'lerin Genel Özellikleri	9
2.3.2. Akreplerin Dağılımları ve Biyolojik Yapıları	10
2.3.5. Akrep Zehirleri.....	12
2.4. Günümüze Kadar Akrep Zehirlerinden İlaç Adayı Olarak Tanımlanan Peptitler.....	13
2.5. Türkiye'nin Akrepleri.....	15
2.5.1. <i>Protoiurus kraepelini</i>	16
3. AKREP ZEHİR PEPTİTLERİ	17
3.1. Peptitler ve Peptidomik	17
3.2. Akrep Zehir Peptitleri.....	17
3.3. Akrep Zehir Peptitlerinin Terapötik Potansiyelleri.....	20
3.3.1. Antimikrobiyal Peptitler	21
3.3.2. Antikanser Peptitler	23

3.3.3. Potasyum İyon Kanallarını Bloke Eden Peptitler.....	25
3.4. Zehir Profillemesinde Kullanılan Metotlar	29
3.4.1. Sıvı Kromatografi Yöntemi	30
3.4.2. Kütle Spektrometresi.....	33
4.MATERYAL VE METOD.....	36
4.1. Akrepler.....	36
4.2. Akreplerin Bakımı.....	36
4.3. Zehir Sağımı, Liyofilizasyon ve Saklama.....	36
4.4. Zehir Karakterizasyonu ve Saflaştırılması	37
4.4.1. Protein Miktar Tayini	38
4.4.2. Jel filtrasyon Kromatografisi ile Zehrin Ön Saflaştırılması	39
4.4.3. Ters-Faz Sıvı Kromatografisi	41
4.4.4. Elektroforetik Analiz	44
4.4.4.1. Glisin SDS PAGE	45
4.4.4.2. Trisin SDS PAGE.....	47
4.4.4.3. Biyoanalizör (MikroKapilerElektroforez).....	51
4.4.5. Kütle Spektrometresi.....	51
4.4.5.1. LC/MS/TOF Sistemi İle Yapılan Fingerprinting Analizi	51
4.4.5.2. MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon- Uçuş Süresi) Sistemi İle Yapılan Fingerprinting Analizi	53
4.4.6. Biyoinformatik Çalışmaları	53
4.4.7. Biyoaktivite Testleri	53
4.4.7.1. Potasyum İyon Kanal Testi	53
4.4.7.2. Sitotoksisite Testi.....	56
4.4.7.3. Antimikrobiyal Aktivite Testi	57
5.SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	59
5.1. <i>P.kraepelini</i> Zehrinin Protein İçeriği.....	59

5.2. Kromatografi Sonuçları	60
5.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografisi Sonuçları.....	60
5.2.1.Ters Faz Kromatografi Sonuçları	66
5.3. Biyoinformatik Çalışma Sonuçları	69
5.4. Elektroforetik Analiz Sonuçları	69
5.5.Kütle Spektrometre Analiz Sonuçları.....	73
5.6.Biyoaktivite Testlerinden Elde Edilen Sonuçlar	78
5.6.1. Potasyum İyon Kanalı Testi Sonuçları	78
5.6.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları	81
5.6.3. Antimikrobiyal Aktivite Test Sonuçları	83
5.7. Tartışma	86
KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ	109

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Peptit ilaçların diğer ilaçlara göre üstün ve eksik yanları.....	15
Çizelge 4.1. Mikroplak mikrotest standart setindeki seyreltme miktarları.....	39
Çizelge 4.2. Jel Filtrasyon kromatografisinde kullanılan metot parametreleri.....	41
Çizelge 4.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Metot Parametreleri.....	43
Çizelge 4.4 Jel Çözeltilerinin Stok Çözeltilerden Hazırlanması.....	49
Çizelge 4.5. Gümüş Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması.....	50
Çizelge 4.4. LC/MS/TOF metot parametreleri.....	52
Çizelge 5.1. Bradford testle belirlenen standart kalibrasyon eğrisi verileri.....	59
Çizelge 5.2. Referans standartların moleküler ağırlık değerleri, kolondan alıkonma zamanı ve hesaplanan logMA değerleri.....	61
Çizelge 5.3. <i>P.kraepelini</i> zehir peptid fraksiyonunda 1000 ve 5000 Da arasında gözlemlenen monoizotopik peptit kütleleri.....	71
Çizelge 5.4. Ham zehir ve fraksiyonlarının antimikrobiyal aktiviteleri.....	85

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1 Hayvanlar alemindeki zehirli grupların şematik ağacı.....	6
Şekil 2.2. Zehirlerin etki mekanizmasına ait bir örnek (Klorotoksin)	7
Şekil 2.3. Akrelerin Vücut Yapısı	11
Şekil 2.4. Ultraviyole ışık altında <i>Protoiurus kraepelini</i> (Fotoğraf: Naşit İğci) ve floresan ışımaya neden olan 4-metil-7-hidroksi-kumarin'in molekül.	12
Şekil 2.5. <i>Protoiurus kraepelini</i>	16
Şekil 3.1. Inhibitory cysteine knot (ICK) motifinin yapısı.	19
Şekil 3.2. Koni salyangozu, örümcek ve akrelerden keşfedilmiş zehir peptitlerinin moleküler ağırlık dağılım histogramı.....	19
Şekil 3.3. Akrep zehirlerinden türetilmiş antimikrobiyal peptitlerin farklı sınıfları (~45) ve her kategorinin göreceli oranı.....	23
Şekil 3.4. Zehirlerden türetilen ve ticari olarak mevcut olan bazı genel iyon kanal toksinleri	27
Şekil 3.5. İyon kanallarının filogenetik ağacı.....	28
Şekil 3.6. Sıvı kromatografi sisteminin temel bileşenleri	32
Şekil 3.7. Bir kütle spektrometrenin şematik diyagramı	35
Şekil 4.1. <i>P.kraepelini</i> bireyleri beslenirken.	36
Şekil 4.2. Sağım sırasında laboratuvarımızda kullanılan düzenek	37
Şekil 4.3. Deney iş akış şeması.....	38
Şekil 4.4. Varian Prostar HPLC Sistemi ve ön saflaştırma işleminde kullanılan jel filtrasyon kolonu	40
Şekil 4.5. FluxOR Potasyum İyon Kanalı Testinin Çalışma Prensibi	54
Şekil 4.6. AlamarBlue® hücre canlılık test protokolü	57
Şekil 5.1. Protein içeriğinin Bradford test ile belirlenen standart kalibrasyon grafiği	60
Şekil 5.2. Referans standartlar ile jel filtrasyon kolonunda elde edilen kromatogram.	61
Şekil 5.3. Molekül ağırlık tayini için, jel filtrasyon kolonu için referans standartlar ile çizilen standart grafik.....	61
Şekil 5.4. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon: Gündoğmuş-Akseki) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.	63

Şekil 5.5. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Alanya) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.	63
Şekil 5.6. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Taşatan) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.....	64
Şekil 5.7. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Avşallar) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.....	64
Şekil 5.8. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Taşatan) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.....	65
Şekil 5.9. Farklı lokasyonlardan toplanan <i>P.kraepelini</i> 'lere ait zehirlerin jel filtrasyon kromatogramlarının karşılaştırılması.....	65
Şekil 5.10. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Alanya) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.....	67
Şekil 5.11. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Gündoğmuş-Akseki) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.....	67
Şekil 5.12. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Avşallar) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.....	68
Şekil 5.13. <i>P.kraepelini</i> (lokasyon:Taşatan) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.....	68
Şekil 5.14. Veri tabanlarına göre, zehirlerin hedeflediği iyon kanal tiplerinin sayısal karşılaştırılmasını gösteren grafikler.....	69
Şekil 5.15. <i>P. kraepelini</i> zehri mikrofluidik kapiller elektroforez sonuçları.....	71
Şekil 5.16. <i>P.kraepelini</i> ham zehir ve peptit fraksiyonunun Tris-Glisin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı.....	72
Şekil 5.17. <i>P.kraepelini</i> ham zehir ve peptit fraksiyonunun Tris-Trisin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı.....	72
Şekil 5.18. <i>P.kraepelini</i> zehir peptit fraksiyonunun MALDI-TOF MS ile analizi sonuçları.....	74
Şekil 5.19. <i>P.kraepelini</i> zehir peptit fraksiyonunun LC/MS TOF spektrumu.....	75
Şekil 5. 20. <i>P.kraepelini</i> zehir peptitlerinin moleküler ağırlık dağılım histogramı..	76
Şekil 5.21. Pozitif kontrol olan klofazimin'in Jurkat hücreleri K+ iyon kanalları üzerindeki etkisi.....	79
Şekil 5. 22. <i>P.kraepelini</i> peptit fraksiyonlarıyla yapılan K iyon kanalı testi sonuçları.	79

Şekil 5.23. Negatif ve pozitif kontrol ile iyon akışı değişiminin floresan okuma sonuçları.....	80
Şekil 5.24. <i>P.kraepelini</i> zehir peptit fraksiyonunun Jurkat hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren grafik.....	82
Şekil 5.25. <i>P.kraepelini</i> ham zehrinin Jurkat hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren grafik.....	82
Şekil 5.26. <i>P.kraepelini</i> ham zehrinin antimikrobiyal aktivite testi sonuçları	84
Şekil 5.27. Üç farklı konsantrasyonda ham zehrin <i>S.aureus</i> üremesi üzerindeki etkileri.....	84
Şekil 5.28. Üç farklı konsantrasyonda ham zehrin <i>E.coli</i> üremesi üzerindeki etkileri	85

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

α

β

Kısaltmalar

ACE	Angiotensin-dönüştürücü enzim
Amp	Ampisilin
AMPs	Antimikrobiyal peptitler
APCI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon
APS	Amonyum per sülfat
ATP	Adenozin Trifosfat
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
cDNA	Komplementer DNA
CHCA	α -siyano-4-hidroksisinnamik asit
Cl ⁻	Klor iyonu
CltX	Klorotoksin
Cys	Sistein
Da	Dalton
DBPs	Disülfid köprülü peptitler
ddH ₂ O	Bidistile su
2-DE	İki Boyutlu Elektroforez
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FDA	U.S. Gıda ve İlaç idaresi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICK	Sistein düğüm inhibitörü
K ⁺	Potasyum İyonu
Kan	Kanamisin

kDa	Kilodalton
KTX	Potasyum kanal toksinleri
LB	Luria Bertani Broth
LC	Sıvı Kromatografisi
Log	Logaritma
MA	Moleküler Ağırlık
MALDI	Matris Destekli Lazer Desorpsiyon
MCE	Mikrofluidik Kapiler Elektroforez
MHA	Mueller-Hinton Agar
MMP	Matriks Metaloproteinaz
MRSA	Methisillin dirençli <i>S.aureus</i>
MS	Kütle Spektrometresi
Na ⁺	Sodyum iyonu
NDBPs	Disülfid köprüsü içermeyen peptitler
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PF	Peptit fraksiyonu
RPF	Ters faz fraksiyonları
RFU	Rölatif Floresans Birimi
SDS	Sodyum dodesil Sülfat
TDB	Tripton Dekstroz Broth
TEMED	Tetrametil etilenediamin
TFA	Trifloroasetik asit
Tl ⁺	Talyum İyonu
TMS	Ardışık Kütle Spektrometresi
TOF	Uçuş süresi
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
UNAM	Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi
Uniprot	The Universal Protein Resource
UV	Ultraviyole

1.GİRİŞ

Faydalı bir ilaç yüksek dozda ya da çok uzun süreli kullanımlarda zehir olabiliyorsa, tam tersi de doğru olabilir mi? Bir zehir düşük dozlarda ilaç olabilir mi? Bazı durumlarda bunun gerçek olduğu bulunmuştur. Örneğin, arsenik de bir zehir olarak bilinir; ancak arsenik bileşikleri antiprotozoal ve antikanser maddeleri olarak kullanılmaktadır. Uygun kontrol altında ve doğru dozda, ölümcül bir zehir de önemli bir tıbbi role sahip olabilir. Alternatif olarak, öldürücü zehirler yararlı ilaçların geliştirilmesi için başlangıç noktası olabilir. Örneğin, angiotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, bir yılan zehri peptidinden yola çıkılarak geliştirilmiş önemli kardiyovasküler ilaçlardır. Uzun bir zaman önce, 15. yüzyılda farkedilen büyük bir gerçek Paracelsus'un "Her madde zehirdir. Zehir olmayan madde yoktur; zehir ile ilacı ayıran dozdur" sözü ile ifade edilmektedir. Yüz adet aspirin tableti alarak ya da bir şişe viski içerek, ya da 9 kg ıspanak yiyerek kendinize ciddi derecede zarar verebilirsiniz, seçim sizin! [1].

Sonuç olarak, ilaçlar fiili veya potansiyel zehirler olarak görülebilir. Önemli olan seçici toksisitesi olmasıdır. Bakteriyel, antifungal etkili tıpta kullanılan birçok ilaç, memeli hücrelerine göre mikrobiyal hücrelere seçici bir toksisite gösterdiği için, etkili ve kullanışlıdır. Klinik olarak etkili antikanser maddeler, normal hücrelere göre kanserli hücreler üzerinde seçici bir toksisite göstermektedir. Benzer bir şekilde, etkili antiviral maddeler normal hücrelere değil virüslere toksiktir [1].

Sıklıkla vücuttaki makromoleküler hedefleri ile çok özel etkileşimleri olduğundan dolayı bitkiler, yılan, örümcek, akrep, böcek türleri gibi hayvanlar ve mikroorganizmalarda bulunan zehirler ve toksinler son derece etkilidirler. Zehirlerinin çoğu bileşeni, santral ve periferik nöronlar, aksonlar, sinapslar ve nöromusküler kavşaklar gibi çoklu moleküler kısımları hedef alarak sinir sistemini etkiler [2]. Bu hedef reseptörlerin birçoğu önemli fizyolojik rollere sahiptir ya da özel bir hastalık ile ilişkilidir. Pek çoğu polipeptit olan bu zehirler oldukça güçlüdürler. Zehirler ve toksinler yeni ilaçların geliştirilmesinde öncü bileşikler olarak kullanılmaktadır [1],[3],[4].

Örneğin, Brezilya engerek zehirinden izole edilen bir peptit olan teprotit; cilazapril ve captopril antihipertensif ajanların geliştirilmesinde öncü bir bileşik olmuştur. 1950'li yıllarda, anjiyotensin I dönüştürücü enzim (ACE)-inhibitör etkili

hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan ilk ticari ilacın (ticari isim Capoten®) geliştirilmesine öncü olmuştur [5]. *Clostridium botulinum* nörotoksinleri ciddi gıda zehirlenmesinden (botulizm) sorumludurlar, ama onlar da klinikte kas spazmını önlemek için (örneğin, göz kapağı kontrol gibi) özel kas içine enjekte edilebilir. Deniz koni salyangozundan türetilmiş konotoksin peptidi insanlarda çok güçlü analjezik etkiye sahiptir. Ziconotide (Prialt ®) denilen konotoksinin sentetik formu, kronik ağrı tedavisi için 2004 yılında FDA tarafından onaylanmıştır [1], [6].

Doğal ürünler, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde önemli rol oynayan ve keşfedilmeyi bekleyen farmakolojik olarak değerli moleküller için muazzam bir kaynak konumundadır [3], [7]. Doğal bir karışımda, biyolojik aktiviteden sorumlu olan bileşiğin tanımlanması ve miktar tayininin yapılması, biyoanalitik kimya ve tıp gibi pek çok alanda anahtar rol oynamaktadır. Yeni ilaçların kaynağı olarak doğal ürünlerin değeri, klinik kullanımdaki ilaçların % 50'sinin doğal ürün kökenli olduğu gerçeği ile vurgulanır [8], [9]. Günümüzde, birçok değişik hastalığın tedavisinde kullanılan farmasötiklerin çoğu daha önceden bitki ekstraktları ya da hayvansal toksinler gibi doğal karışımlarda keşfedilen moleküllerin yapısal kriterleri temel alınarak geliştirilmektedir [10], [11].

Zehirli hayvanlar genellikle, insanlarla kazara olan temaslarından sonra sebep oldukları negatif etkileri ile bilinirler. Bu grupta yer alan akrepler, insanları soktuğunda ölüme yol açabilir. Akrep zehirlerinde bulunan nörotoksinler ve diğer peptit/proteinler bu toksik etkilerden sorumludur. Bundan ötürü, akrep zehrindeki doğal bileşenler araştırma konusu olmuştur. Diğer yönden, binlerce yıldır, Asya ve Afrika'da akrepler ve zehirleri geleneksel tedavide kullanılmaktadır [12]–[14].

Karakterize edilen akrep zehir bileşenlerinin sayısında dikkat çekici bir artış kaydedilmiş olup, bunlar arasında tıbbi tehditlere karşı potansiyel etkiye sahip pek çok ilaç adayı bulunmaktadır. Yaşayan fosiller olarak, 400 milyon yıldır yeryüzünde yaşamlarını sürdürmekte olan akrepler uzun süreli evrimleri boyunca çok çeşitli zehir peptitleri geliştirmişlerdir [15]. Akrepler, yeni antibiyotiklerden güçlü antikanser teröpatiklerine kadar pek çok biyoaktif molekülün değerli ve önemli bir kaynağı halindedir. Zehir bileşenleri, ilaç geliştirilmesi için kullanışlı merkezi yapıları ile dikkat çekmektedirler [10], [11].

Zehirler ya alerjik reaksiyon ve dermatit gibi hafif, ya da pıhtılaşma bozuklukları, nekroz, solunumun durması gibi ağır komplikasyonlara sebep olabilen farklı fizyolojik etkiye sahip çeşitli toksinler içerirler. Akrep zehirleri negatif bir üne sebep olsa da, pek çok araştırmacı tarafından farmakolojik olarak aktif yapılar için zengin birer kaynak olarak görülmektedir [3], [9], [12], [16], [17]. Protein sentez inhibisyonu, apoptoz indüksiyonu ve antiviral aktivite, zehir bileşenlerinin farmakolojik etkilerinden bazılarıdır. Kardiyovasküler problemlerin tanı ve tedavisi için hayvan zehirlerinden geliştirilen bazı örnekler; Textarin ve Ecarin, yılan zehrinden elde edilen protrombin aktivatörleridir ve sistemik lupus tanısında kullanılmaktadır. *Bothrops atrox* zehrinden elde edilen batroxobin, Defibrase in etken maddesidir ve trombosiz tedavisi için denenmektedir; *B. jararaca* zehrinden elde edilen Captopril, en iyi bilinen ve hipertansiyon tedavisinde çok kullanılan bir ilaçtır. Engerek zehri peptitlerinden türetilmiş olan tirofiban ve eptifibatide, U.S. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylı olup günümüzde akut koroner sendrom tedavisinde anti-platelet ilaçlar olarak kullanılmaktadır [18], [19].

Hayvan zehirleri biyolojik olarak aktif ve inaktif maddelerin bir karışımıdır. Zehirlerin esas yapısını proteinler, peptitler, poliamin nörotoksinler, enzimler, nükleik asitler, serbest amino asitler, monoaminler, serbest asitler ve inorganik tuzlar oluşturmaktadır. Ancak esas biyolojik aktiviteye sahip olanlar protein ve peptit komponentleridir [10], [20], [21].

Bu tez çalışmasının amacı, peptitler açısından zengin olan akrep zehirlerini kaynak olarak kullanarak, *Protoiurus kraepelini* akrep zehrinin moleküler karakterizasyonunu yapmak ve aktivite testleri ile tarayarak yeni biyoaktif peptitler keşfetmektir. Ayrıca oluşturulacak bilgi ve tecrübe ile bu tarz doğal ürün araştırmalarında kullanılabilecek bir alt yapı oluşturmaktır. Zehrin peptit bileşiminin saptanması, zehrin yapısının tanımlanması ve muhtemel biyoaktif bileşenlerin ortaya konması yeni bir peptit ilaç keşfi yönünde önemli bir adım olacaktır.

Bu tez, *Protoiurus kraepelini* zehri ile yapılan ilk çalışma niteliğinde olup, günümüze kadar literatürde bu türün zehri ile ilgili yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu akrep türü ülkemizde endemik olduğundan, çalışmamız ülkemiz açısından da önem taşımaktadır. Bitki ekstraktı, hayvan zehir/toksini ve bunlar gibi birçok doğal ürünün taranması ve içeriğindeki biyoaktif bileşenlerin

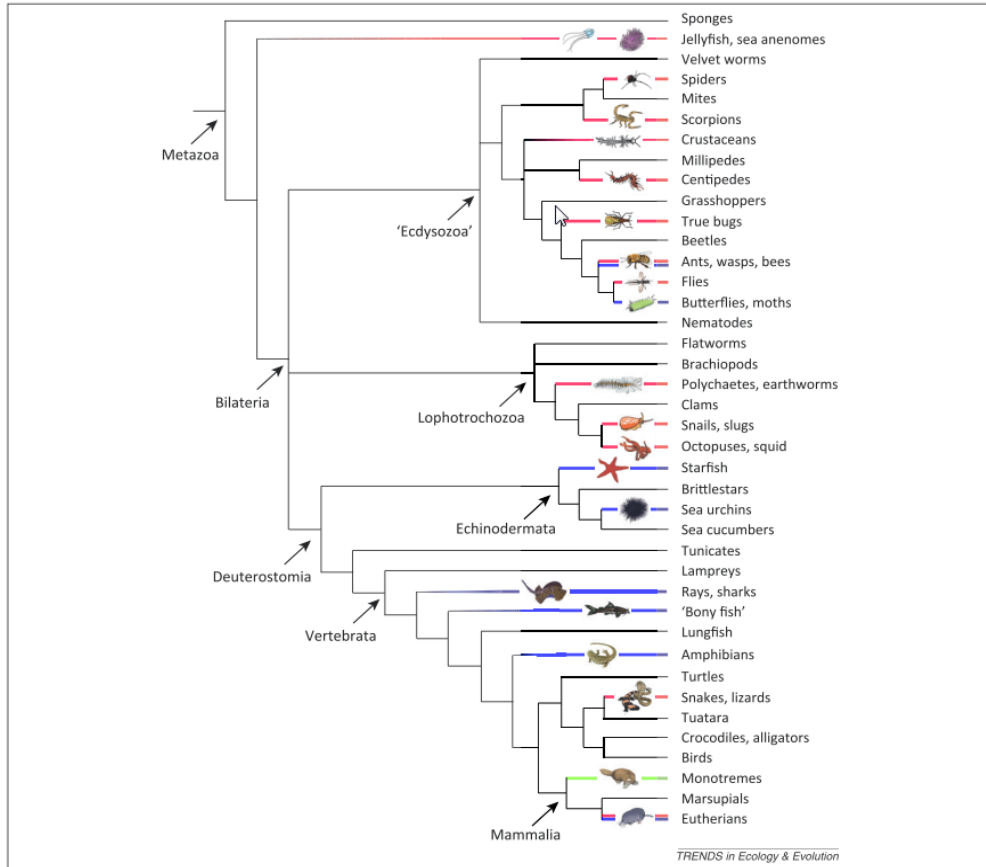
tanımlanması, gerek ilaç tasarımı ve geliştirilmesi, gerekse sağlık alanındaki uygulamalar açısından ileriki çalışmalara ışık tutacaktır.

2. HAYVAN ZEHİRLERİ

Hayvanlar alemi, toksin ya da zehir üreten çok sayıda zehirli türe sahiptir. Zehirli hayvanlar, hayvanlar aleminin pek çok sınıfında, karasal ve denizel çoğu yaşam alanında bulunmaktadır. Zehirli hayvanlar, aslında sıkça rastlanan ve çok çeşitli-nerdeyse her şubeden- türler içermektedirler. En yaygın olarak bilinenleri yılanlar, akrepler, örümcekler, arı ve karınca gibi böceklerdir; fakat bazı memeliler (ör: *Platypus*), balıklar (ör: taş balığı), yumuşakçalar (ör: konik salyangoz), sölenler (deniz anemonları) gibi diğer pek çok hayvan türü de zehirlidir. Yaklaşık, 100.000' den fazla zehirli hayvan türü bulunmaktadır [3,6,22]. Zehir, özelleşmiş zehir bezleri tarafından üretilmekte ve diş (yılanlar, örümcekler), iğne (akrepler, arılar, karıncalar), zıpkın (deniz anemonları, koni salyangozu) gibi çeşitli sistemler aracılığıyla enjekte edilmektedir [7], [22]. Zehirler; hedefleri olan iyon kanalları, G-Protein bağlı reseptörler gibi membran reseptörlerine güçlü ve özel bir şekilde bağlanan toksinler içerir. Hayvan zehirleri, insan fizyolojisi ve farmakolojisi hakkındaki araştırmalarda önemli katkılar sağlamaktadır. Bu toksinlerin etki mekanizmaları hakkındaki bilgiler, zehirlenme vakalarının tedavisi için bilimsel bir yaklaşıma olanak sağlamıştır [23].

Zehir, bir hayvan tarafından savunma ve saldırıda kullanmak üzere salınan bir çeşit toksin karışımıdır. Zehirler ölümcül karışımlar olmakla beraber, doğada doğal seleksiyonla seçilmiş toksik etkide olan veya olmayan eşsiz peptit ve proteinlerden oluşmaktadırlar. Bu yapılarıyla, geleneksel tedavi yöntemlerine cevap vermeyen hastalıkları tedavi edebilecek biyoaktif maddeler açısından büyük bir kaynak durumundadırlar. Hayvan zehirleri, doğada evrim süresince binlerce molekülün en doğru kombinasyonlarla oluşturulmuş güçlü, aktif ve farmakolojik olarak kullanabilecek formlarını yapılarında biriktirmiştir. Pek çok tür tarafından zehirlerin kullanımı evrimin güzel bir örneğini sergilemektedir [7], [20], [24]. Zehirli hayvanların toksinlerini kodlayan aktif olarak seçilmiş çoklu gen aileleri özel fonksiyonlara sahip çok çeşitli toksinler oluşturmaktadırlar. Zehirler, çevreye ve predatöre özgü av için maksimum etkili olacak şekilde evrimleşmiş ve hayvanın standart diyetine göre özelleştirilmişlerdir [25].

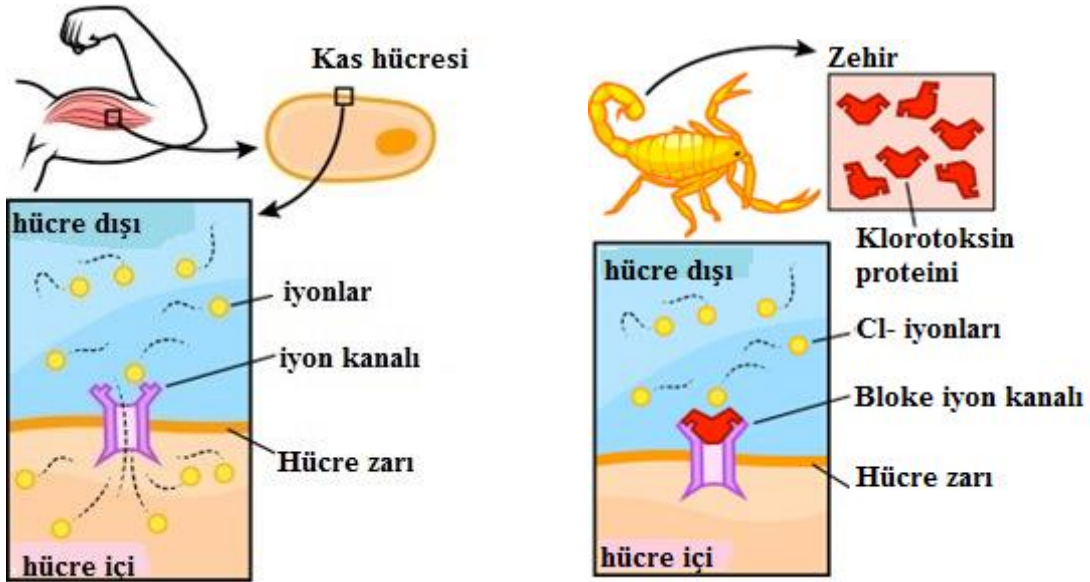
Hayvan zehirleri, toksik kokteyller halindedir ve sayıları 1000'i bulan organik ve inorganik moleküllerin bulunduğu kompleks karışımlardır. İyonlar, biyolojik amin ve poliamin gibi küçük organik moleküller, peptitler, enzimler ve proteinlerin yanı sıra, iç ve dış zararlı etkilerden (örneğin yüksek sıcaklık) korunmak ve zehir bezinde haftalarca muhafaza edilebilmelerini sağlayan proteaz inhibitörleri ve dengeleyici ajanlar (stabilizing agents) içermektedirler [4], [24]. Zehrin içerik ve oranları farklı sınıf, cins hatta türler arasında bile değişiklik göstermektedir. Cinsiyet, dişilerin gebelik durumu, yaş ve yaşam alanları gibi faktörler zehrin bileşimini etkilemektedir. Bununla birlikte, zehrin büyük bir kısmını çeşitli biyoaktif özellikler gösteren peptit ve proteinler oluşturmaktadır. Kuru ağırlığın %90'ını oluşturan peptit/proteinler, tuz, şeker, enzimler ve nörotransmitterler gibi diğer bileşenle su bazlı sıvıda bir çözünmüşlerdir [22].



Şekil 2.1 Hayvanlar alemindeki zehirli grupların şematik ağacı [24].

2.1. Zehirlerin Genel Etki Mekanizması

Zehirler, genellikle hücre davranışını bozarak etki ederler. Çoğu zehir peptidi, toksik etkilerini artırmak için hücre yüzeyinde ve/veya içinde yer alan reseptörler, iyon kanalları ve enzimler ile etkileşime girerler [26]–[31]. Toksinin reseptöre bağlanmasını, hücre içinde oluşturulan hücre fonksiyonunu değiştiren bir başka sinyal ya da sinyal üretiminin bloke edilmesi izler. Zehir toksinleri, ilaçlara benzer bir şekilde, etkilerini üretmek için hücresel kilitlere-reseptörlere uygun-bağlanan anahtarlar gibilerdir [22].



Şekil 2.2. Zehirlerin etki mekanizmasına ait bir örnek (Klorotoksin) [32]

Şekil 2.2.de görüldüğü gibi, kas hücrelerin zarında yer alan kanallar iyonların hücre içine girmesine izin verir, bu olay kasın kasılma ve gevşemesini kontrol eder. Akrep zehrinden elde edilen bir toksin olan Klorotoksin, kas hücrelerindeki kanalları bloke ederek iyonların geçişini durdurur [32].

Bir zehirin toksik doğası, avındaki hayati sistemleri tahrip etmek için sinerjik olarak hareket eden çok sayıda toksinin varlığına bağlıdır. Bununla birlikte, bu toksinlerin her biri ayrı olarak alınıp az bir dozda enjekte edilirse belki de teröpatik etki gösterebilir. Bu şekilde, bazı toksinlerin, ağrı ve kalp fonksiyon bozukluklarında

güçlü iyileştirici etkileri olduğu keşfedilmiştir. Esas itibariyle, istenilen özellikteki toksik bir zehir bileşeni doğru dozda uygulanırsa hastalıkları tedavi etmede faydalı bir ilaç olabilir [3], [22].

2.2.Venomik Projesi

Venomik birliği 2011 yılında beş ülkedeki (Fransa, İspanya, Portekiz, Belçika ve Danimarka) akademik laboratuvarlar ve küçük-orta işletmelerden sekiz ortak ile oluşmuş dört yıllık, büyük bütçeli bir projedir. Oluşum, proje lideri VenomeTech firması tarafından, Avrupanın transkriptomiks, proteomiks, peptit üretimi ve ilaç keşfi alanlarında en iyi uzmanlarını seçmeyi hedeflemiştir. Üst düzey uzmanlığın da ötesinde, her ortak bu birliğe, proje çalışmalarını yürütmek için ileri teknoloji donanımı ile katılmıştır.

Önceki bölümlerde bahsedildiği üzere, zehir toksinleri yüksek seçicilik ve etkinlikle hedef moleküllere bağlanabilen aktif maddelerdir. Venomik projesinin vizyonu, “omics” teknolojilerine bir yenisini ekleyerek yüksek işlem hacimli bir iş akışında, özgün bir araştırma dizisinin geliştirilmesi, birleştirilmesi ve uygulamaya koyulması vasıtasıyla, zehir peptitlerinin muazzam yapılarını ve farmakolojik çeşitliliğini keşfetmektir. Bu proje ilaç keşfi programında kullanılmak üzere orijinal peptit bankası oluşturmak için zehirlerin çeşitliliğini *in vitro* ortamda kopyalamayı amaçlamaktadır [33].

Zehir peptitleri, yapısal boyutlarının ve farmakolojik spektrumlarının çok çeşitli olmaları ile yeni ilaç öncülleri olarak popüler adaylar durumundadırlar. Kütle spektrometresi ve transkriptomiks çalışmaları, akrep, örümcek ve konik salyangozun tek bir türünün zehrinde yüzlerce peptit ve proteinin varlığını göstermiştir. Bununla birlikte, zehirlerin doğrudan ilaç geliştirilmesinde kullanılması hızlı bir süreç gibi görünse de, materyalin bulunması, örnek miktarı ve zehrin kompleks yapısı gibi önemli zorluklar sebebiyle çoğunlukla tam olarak gerçekleştirilememektedir. Biyoaktif peptit tanımlanması için kullanılan klasik, biyolojik test tabanlı yaklaşım yerine Avrupa Venomik Projesi, zehir çeşitliliğinin kullanımı için yeni bir yaklaşım tasarlamıştır. Peptit dizilerini saptamak için saflaştırmanın ardından Edman dizileme yöntemi yerine transkriptomik ve proteomik teknolojilerinin birlikte kullanımı tercih edilmiştir. Bu projenin anahtar

özelliklerinden birisi, olgun aktif peptidin tam dizisini tahmin edebilme yeterliliğinin olmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, peptit toksinin, post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştiği N-terminaldeki tam dizisinin saptanması gerekir. İş akışının proteomik kısmında, hayvandan sağılan ham zehir üzerinde peptit analizi gerçekleştirilmektedir. Zehrin HPLC ayırımından sonra, kütle spektrometre analizlerine (MALDI-TOF MS/MS) geçmeden önce, peptitlerdeki disülfid bağları indirgenmektedir. Transkriptomik iş akışında ise, zehir bezi dokusundan mRNA'lar izole edilerek Illumina altyapısında dizilenmektedir. Bu zehir analizi iş akışı ile üretilen peptit kütüphanesi çeşitli biyolojik hedeflere karşı olası teröpatik öncülerin tanımlanması için değerlendirilecektir. Venomik Projesinin akışı zehirden ilaç adaylarına doğru ilerleyerek, doğal ürün kütüphaneleri oluşturacak ilaç öncüllerinin seçimini sağlayacak çoklu ve sonuç odaklı aşağıdaki basamakları içermektedir [22], [33].

- Zehir ve doku biyobankasının oluşturulması
- Zehirlerin proteomik analizi
- Zehir bezi dokusunun transkriptomik analizi
- Geniş bir dizi bilgi bankasının oluşturulması
- İn vitro peptit üretimi
- Hedef seçimi
- Farmakolojik tarama ve öncüllerin seçimi

2.3. Arachnid'ler, Akrepler ve Akrep Zehirleri

2.3.1. Arachnid'lerin Genel Özellikleri

Arachnidae sınıfı, filogenetik olarak Arthropoda şubesinin üyesidir. Halen yaşayan arachnid'ler 400 milyon yıl önce evrimleşmiş olup kökenleri deniz ekosisteminden gelmektedir. Arachnidler sekiz ayaklı anatomileri ve keliser adı verilen ağız kısmındaki yapılar ile böceklerden kolayca ayırt edilebilirler. Keneler, örümcekler, akrepler, pseudoakrepler bu sınıfta yer almaktadır. Akrepler ve örümcekler özelleşmiş zehir bezlerine sahiptir. Pseudoakreplerin zehir bezleri ve kanalları kıskaçlarının içinde yer almaktadır. Örümcekler zehri aktarmak için fang (uzun sivri diş) adı verilen keliser benzeri yapıları kullanırlar. Akreplerin telson

kısımlarında zehir bezleri vardır, telsonun uç kısmındaki sivri kısım (sting) ile üretilen zehri aktarırlar.

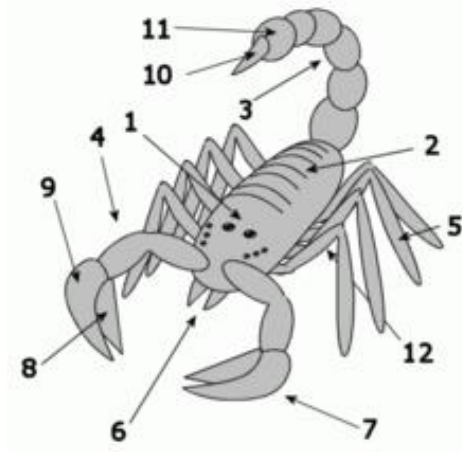
2.3.2. Akrelerin Dağılımları ve Biyolojik Yapıları

Akrepler, Arachnid sınıfının Scorpiones takımını oluşturan eklembacaklılardır ve sudan karaya geçen ilk hayvan gruplarından. İlk akrep cinsi olarak bilinen *Paleophonus*, denizlerde yaşamıştır. Karada yaşayanlar ise 420 milyon yıl önce, geç Silurian döneminde ortaya çıkmışlardır [34]. Jeolojik devirlerde ilk ortaya çıkışlarından günümüze kadar çok az değişikliğe uğramış olmaları sebebiyle akrepler, yaşayan fosiller olarak bilinmektedir [35].

Buzul bölgeler hariç hemen hemen her yerde, genellikle sıcak ve nemli bölgelerde (tropikal ve tropik altı iklim kuşaklarında) ormanlık alanlarda, çöllerde, taşlık ve kayalık yerlerde yaşarlar, vücutları kitin tabaka ile örtülüdür [36], [37]. Kıvrık ve kalkık kuyruklarında zehir iğnesi (telson) bulunur. Son segment olan telsonda iki zehir bezi, ucunda da bir zehir dikenini vardır. Zehir bezlerine ait kanallar dikeninin ucunda bulunan deliklerden dışarı açılırlar.

Yaşayan yaklaşık 1753 türü bulunur [12], [38], [39]. Akrelerin boy aralığı 9 mm'den (*Typhlochactas mitchelli*) 20 mm'e (*Hadogenes troglodytes*) kadardır. Teraryumda beslenen bazı bireyler 9 yıla kadar yaşasa da doğada ömürleri 3-8 yıldır.

Geceleri aktif olan akreplere gündüz, taş altlarında, duvar yarıklarında rastlamak mümkündür. Yaşadıkları çevreye göre, sarı ve açık kahverenginden siyaha kadar değişen tonlarda renklere sahiptir. Vücutları, sırttan ve karından (dorso-ventral) basık, başlıgöğüs ve karın olarak iki bölümden oluşmaktadır. Başlıca besinleri böcekler, örümcekler ve kırkayaklar gibi eklembacaklılardır. Büyük bireyler, küçük yılanları, kertenkele ve fareleri de avlayabilirler. Yamyamlık, sıklıkla görülmektedir. Akrebin vücut kısımları Şekil 2.3.de görülmektedir.



Şekil 2.3. Akrelerin Vücut Yapısı

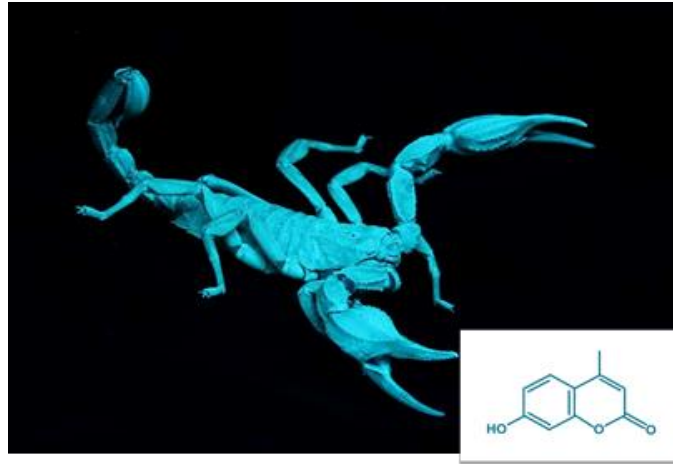
1 = Başlıgögüs (cephalothorax ya da prosoma) 2 = Karın (mesosoma) 3 = Kuyruk (metasoma) 4 = Pedipalp 5 = Bacaklar 6 = Ağız parçaları (chelicerae) 7 = Kısaç (chela) 8 = İç kısaç (manus) 9 = Dış kısaç (tarsus) 10 = İğne (telson) 11 = Anüs [37].

Avlarını kısaçlarıyla yakalarlar. Kuyruklarını avına uzatarak sokan akrep, zehri ile böcekleri hemen öldürür. Akrepler, enjekte edecekleri zehir miktarını avlarına göre belirlerler. Büyük kısaçlı olanlar, küçük avlarını güçlü kısaçlarını kullanarak öldürürken, zayıf kısaçlı akrepler zehirlerini kullanarak avı sokar ve felç ederek öldürür. Keliserini avına yerleştirir ve sindirim enzimleri salgılayarak dokuları sıvılaştırır ve oluşan sıvıyı emer. Soğukkanlı hayvanlar oldukları için az yiyeceklerle yetinebilirler, aylarca hatta iki yıl kadar açlığa dayanabilirler. Korunmak amacıyla, insan ve hayvanları sokarak zehirlenme ve ölümlere sebep olabilirler.

Dünyadaki yaklaşık 1750 akrep türü içerisinde 50'sinin zehirli, 20-25'inin öldürücü olduğu bilinmektedir. Ülkemizde ise 8 tür insan üzerinde etkili zehre sahiptir, bunların 2'si *çok zehirli* ve "ölümcül" özelliktedir [37]. En zehirli akrep türlerine örnekler;

- Türkiye: *Leiurus abduhbayrami*, *Androctonus crassicauda*
- Güney Amerika : *Tityus serrulatus* , *Centruroides suffusus*
- Orta doğu ve Kuzey Afrika : *Androctonus crassicauda* , *Buthus occitanus*
- Güney Afrika : *Parabuthus granulatus*
- Hindistan : *Mesobuthus tamulus* , *Palamneus swammerdami*

Dişi akrepler yavrularını sırtlarında taşımaları ile bilinirler. Yavru akrepler beyaz renklidir ve bir süre sonra yaklaşık 5mm olduğunda anneden ayrılarak bağımsız yaşarlar. Akreplerin vücutlarının dış kabuğunda organik bir bileşik bulunmaktadır. Bu bileşik bir kumarin türevidir ve UV ışık (365nm) ile uyarıldığında yeşilimsi bir ışımaya neden olur. Bu nedenle karanlıkta akrepler yeşil renkte fosforu parlak görünürler [40]. Denizden karaya geçişlerinde güneşten korunma amaçlı bu özelliği kazandıkları ve UV ışığının sebep olduğu DNA hasarlarından koruyan bir avantaj sağladıkları hipotezi öne sürülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada [41], akreplerin floresans özellikleri sayesinde çok düşük UV ışığını algılayabildikleri ve bu sayede ay aşığından kaçarak saklanabildikleri ileri sürülmüştür [35]. Karanlıkta UV ışık altında ışımaları, gece yapılan arazi çalışmaları sırasında araştırmacılara yardımcı olmaktadır [42], [43].



Şekil 2.4. Ultraviyole ışık altında *Protoiurus kraepelini* (Fotoğraf: Naşit İğci) ve floresan ışımaya neden olan 4-metil-7-hidroksi-kumarin'in molekül [42].

2.3.5. Akrep Zehirleri

Yaşayan akrep türlerinin hepsi zehirlidir. Çok az akrep türü insanlar için öldürücü dozda zehire sahiptir. Eğer sokulan kişinin alerjisi yoksa bir tehlike söz konusu değildir. Akrep aileleri içinde Buthidae familyası nörotoksik yapıda, diğer familyalardakiler ise sitotoksik yapıda zehire sahiptir. Nörotoksin yapısındaki zehirler genelde insanlar için daha tehlikelidir [35].

Akrep zehiri tatsız ve şeffaf bir sıvıdır. Kimyasal reaksiyonlarda asidik özellik gösterir, salgılandığında parlak, daha sonra matlaşarak beyaz bir görünüm kazanır [44]. Zehirin temelde nörotoksin olduğu dolayısıyla sinir sistemini etkilediği bilinmektedir [35]. Eritrositleri bozan ve eriten hidrosiyanik ve karbamilden oluşmaktadır [44].

2.4. Günümüze Kadar Akrep Zehirlerinden İlaç Adayı Olarak Tanımlanan Peptitler

UniProt veri tabanına göre, günümüze kadar 900'den fazla akrep zehir peptidi tanımlanmıştır [45]. Bu peptitlerin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser ve otoimmünite baskılayıcı aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Antimikrobiyal peptitler (AMPler) bakterilerden yüksek ökaryotik organizmalara kadar çok farklı türlerde bulunabilir. Akreplerden zehir bileşeni olarak izole edilen AMP'lerin rolleri hala net değildir. Şimdiye kadar keşfedilen AMP'ler; *Hadrurus aztecus*'dan hadrurin, *Pandinus imperator*'dan pandininler; *Parabuthus schlechteri*'den parabutoporin'dir. Akrep zehrindeki çoğu AMP, yapısal olarak disülfid bağı içermeyen peptitler (NDBPler) grubuna dahildir. Bu peptitler, çoklu dirençli patojenik suşlarda bile genellikle düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri göstermektedir. Zehir kaynaklı antimikrobiyal peptitlerin önemli bir dezavantajı, memeli hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik ve hemolitik aktivite göstermeleridir. Antibakteriyel aktivite gösteren disülfid bağı içermeyen peptitler (NDBP'ler), genellikle *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi patojenik fungal türler üzerinde de etkilidirler. Örneğin, Pandinin2 ve parabutoporin sırasıyla *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde mikromolar konsantrasyonlarda büyümeyi inhibe edici etki göstermektedirler [46], [47]. Antibakteriyel ve antifungal peptitlerin yanı sıra, akrep zehirlerinden *Plasmodium falciparum* türüne etkili antimalarial peptitler de keşfedilmiştir. *Mesobuthus eupeus* türü akrebin zehir bezinden elde edilen cDNA kütüphanesi taranarak bulunan iki adet NDBP yapısında peptit, *P. falciparum* enfeksiyonunu konak hücreleri üzerine toksik etki göstermeden ciddi derecede yok etmiştir. Diğer taraftan, antiviral aktiviteye sahip sınırlı sayıda zehir peptitiyle de karşılaşmıştır [48].

Potasyum iyon kanalları T-hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonunda temel rol oynar. Akrep zehirleri de K⁺ iyon kanallarını inhibe eden peptitler açısından zengin olduklarından dolayı, otoimmün hastalıklara karşı ilaç geliştirilmesi açısından kıymetli kaynaklardır. *Centruroides margaritatus* zehrinden margatoksin ve *Leiurus quinquestriatus* zehrinden karibidotoksin en çok bilinen Kv1.3 inhibitörü peptitlerdir. Yine *Leiurus quinquestriatus* türünden keşfedilen antikanser etkili zehir peptidi klorotoksin, en ilgi çekenlerden biridir. Bu doğal kaynaklar önümüzdeki yıllarda çok sayıda yeni peptit ilaçların geliştirilmesi için yapısal iskelet oluşturabilir [12], [49]–[52].

Zehir Türevli Ticari İlaçlar Bir zehir toksininin klinik olarak faydalı bir ilaç haline gelmesinin örnekleri zaten hali hazırda bulunmaktadır. En başarılı örneklerden birisi olan captopril (ticari adı Capoten®), engerek yılanı *Bothrops jararaca* zehrinden elde edilen ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir moleküldür. Bir milyar dolardan fazla piyasa hacmi ile satış rekorları kıran bir ilaç durumundadır. Yılan zehrinden geliştirilen diğer iki ilaç, eptifibatide (Integrilin ®) ve tirofiban (Aggrastat ®) A.B.D. Gıda ve İlaç idaresi (FDA) onaylı olarak akut koroner sendrom tedavisinde kullanılmaktadır. Bir koni salyangoz olan *Conus magus* zehir peptidi, ziconotide (Prialt ®) inatçı ağrı tedavisinde kullanılmaktadır.

Bir glukagon-benzeri peptit-1 (GLP-1) agonisti Exendin-4, *Heloderma suspectum* (Gila monster) kertenkele zehrinde keşfedilmiştir [53], [54]. Bu peptidin sentetik versiyonu Exenatide isimli peptit, Byetta ticari adla piyasaya çıkarılmıştır. Byetta şu anda iyi bilinen peptid ilaçlardan birisi olarak, tip-2 diyabet tanılı hastalarda kullanılmaktadır [55],[56].

Peptit ilaçların diğer ilaçlara göre üstün ve eksik yanları Çizelge 2.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Peptit ilaçların diğer ilaçlara göre üstün ve eksik yanları [57].

Avantajlar	Dezavantajlar
Yüksek aktivite	Oral olarak düşük biyoyararlılık
Özgünlük	Enjeksiyon gerektirir
Düşük toksisite, daha az yan etki	Daha az kararlı
Dokularda daha az birikme	Çözünürlük zorlukları
Biyolojik ve kimyasal çeşitlilik	Zor ve pahalı sentez
Minimum ilaç-ilaç etkileşimleri	Membranlardan geçiş zorlukları

Frost & Sullivan'e göre, dünya çapında 40'dan fazla ilaç olarak pazarlanan, yaklaşık 270 tane klinik faz test aşamasında ve yaklaşık 400 adet klinik öncesi faz aşamasında olan peptit vardır [57]. İnsülin, vankomisin, oksitosin gibi doğal peptidler; Fuzeon ve Integrilin gibi sentetik olarak üretilmiş olanlar onaylı peptit bazlı ilaçlardan bazılarıdır [57].

2.5. Türkiye'nin Akrepleri

Son kayıtlara göre, Türkiye 4 aile ve 13 cins altında, 29 akrep türüne sahiptir [58]. Dört aile; Buthidae, Scorpionidae, Luridae ve Euscorpiidae'dir. Zehirlenmelere sebep olan, tıbbi açıdan da en önemli olan türleri Buthidae ailesinden *Androctonus*, *Leiurus* ve *Mesobuthus* cinsine ait türlerdir [21], [59]. Buthidae ailesinde *Androctonus*, *Buthacus*, *Compsobuthus*, *Hottentotta*, *Leiurus*, *Mesobuthus* and *Orthochirus* olmak üzere 7 cins bulunmaktadır. *Scorpio* cinsi Scorpionidae ailesinin ülkemizdeki tek üyesidir. *Calchas*, *Neocalchas*, *Iurus* ve *Protoiurus* cinsleri Luridae ailesindedir. Euscorpiidae ailesinden de *Euscorpius* isimli tek cins bulunmaktadır.

2.5.1. *Protoiurus kraepelini*

luridae ailesine ait bir türdür. *lurus kraepelini* türü, von Ubisch (1922) tarafından Finike (Antalya)'den tanımlanmıştır [35]. Ağustos 2012'de, Kovarik, Fet, Soleglad ve Yagmur *lurus* cinsine ait geniş bir revizyon yaparak cinsi *lurus* ve *Protoiurus* olarak ikiye ayırmışlardır ve bu yayınlara üç yeni tür tanımlanmıştır. *Protoiurus kraepelini* türü de bunlardan birisidir [60], [61]. Bu tür, Türkiye'nin güney bölgesinde Mersin, Karaman, Konya, Isparta, Antalya, Muğla illerinde endemiktir, ayrıca Yunanistan'ın Meis adasında da bulunmaktadır. Taş altlarında, ormanlık bölgelerde, doğal kavitelere yaşar. Şekil 2.5.'de bu türe ait bir birey görüntülenmektedir.



Şekil 2.5. *Protoiurus kraepelini* (Fotoğraf: Naşit İğci).

3. AKREP ZEHİR PEPTİTLERİ

3.1. Peptitler ve Peptidomik

Peptitler, 2-100 amino asitten oluşur. Doğada 20 standart amino asit vardır. Basit bir 10 amino asitlik peptit yapısı için bile 10 trilyon kombinasyon olasılığı bulunmaktadır. Peptitler küçük olmalarına rağmen, kompleks ve önemli biyolojik aktivitelere sahip moleküldür (Hormonlar, toksinler, antibiyotikler, nörotransmittörler vb.). Örneğin, şeker metabolizmasında önemli rol oynayan insülin ve glukagon da birer peptit hormondur.

Peptidomik terimi, organizma, doku, hücre, organel ya da biyolojik bir sıvıdaki peptit içeriğinin sistematik analizi olarak tanımlanabilir. Peptidomik bilimi, genellikle doğal olarak oluşan peptitlerle yapılan çalışmaları kapsar. Hassas ileri teknoloji teknikleri kullanır. Nano-LC, MS ve cDNA kütüphaneleri kullanılan tekniklerin başında gelir.

3.2. Akrep Zehir Peptitleri

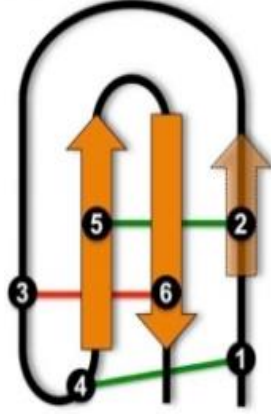
Zehir peptitleri 10-100 amino asitten oluşan mini proteinlerdir. Disülfid bağlarının varlığı ile de karakterizedirler. Bu bağlar, peptit kararlılığı ve aktivitesinde çok önemli olan; peptit yapısının sağlamlığının devamında ve özel üç-boyutlu yapısının oluşmasında görev yapmaktadır. Zehir peptitleri, çevre ısısındaki çözeltilerde kimyasal yıkıma, kendi yapısında ve avında bulunan proteazlarca enzimatik yıkıma karşı dayanıklıdır. Bu stabilite doğal olarak, post translasyonel modifikasyonlar ve/veya peptidin kararlı bir şekilde katlanmasını sağlayan disülfid bağları sayesinde başarılmaktadır (C-terminalin amidasyonu, sulfasyon, brominasyon, glikozilasyon vb.) [3]. Zehrin içeriğindeki protein ve peptitler disülfid bağı açısından zengindir ve %60 'ında Inhibitory Cysteine Knot (ICK) motifi yer almaktadır. Ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına, organik solventlere ve proteazlara karşı çok dayanıklıdır.

Peptit toksinler başlıca, avın sinir sistemini hedefleyen nörotoksinler, kalp fonksiyonlarını değiştiren kardiyotoksinler ve kan hücreleri ve dolaşım sistemini

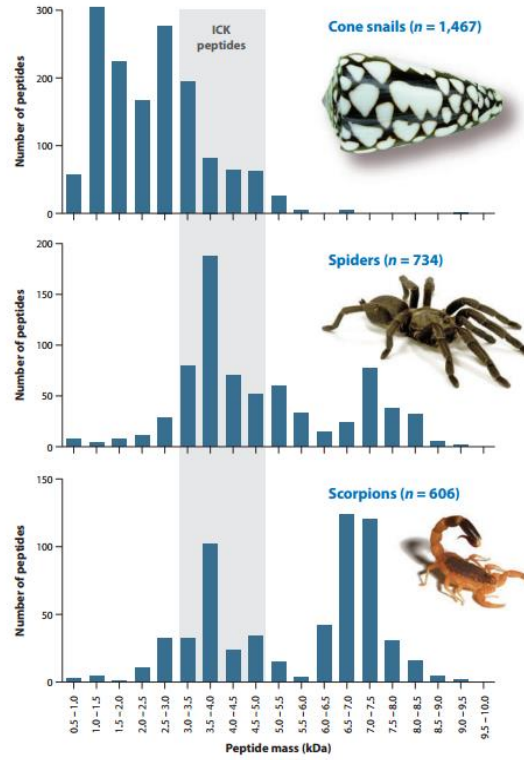
etkileyen hematoksinleri içerirler. Zehrin genel etkisi, bu toksinlerin her birinin özel fonksiyonunun birleşik sonucudur [22].

Akrep zehirlerinin de önemli bir kısmını oluşturan peptitler, disülfid köprüsü içeren peptitler (DBPs) ve disülfid köprüsü içermeyen peptitler (NDBPs) olarak iki grup altında değerlendirilebilirler [62]. Disülfid köprüsü peptitler, nörotoksin olarak aktivite gösteren, genellikle Na^+ , K^+ , Ca^{2+} veya Cl^- iyon kanal inhibitörleri olan, sisteince zengin, katyonik peptitlerdir. Bu grup da kendi içinde yapılarına göre iki gruba ayrılır; kısa zincirli nörotoksinler ve uzun zincirli nörotoksinler. Kısa zincirli, 3-5 kDa, uzun zincirli ise 6-8 kDa molekül ağırlığındadırlar. Kısa zincirli nörotoksinler, potasyum iyon kanal akış düzenleyicilerini oluştururken; uzun zincirli hücre membranı boyunca sodyum iyon akışını düzenleyicileri kapsamaktadırlar.

Peptit kütlelerinin bu çift durumlu dağılımı, arachnid zehirlerinde karakteristiktir, dolayısıyla akrep zehirlerinde de durum böyledir. Nörotoksinler, inhibitory cysteine knot (ICK) adı verilen genel yapısal bir motif taşırlar. ICK üç disülfid bağı içeren yapısal bir protein motiftir. Aralarında polipeptidin bölümleri ile birlikte, iki disülfid bağı, üçüncü bir disülfid bağına doğru bir loop yapar ve bir düğüm (diğer adı knottin) oluşturulur. Bu motif, evrimsel süreç boyunca, koni salyangozundan arachnidlere kadar korunmuştur. ICK motifi peptidik yapının dayanıklı olmasını sağlar ve böylece peptitler düşük pH, yüksek sıcaklık, hatta proteaz ataklarına karşı bile dirençlidir [63], [64]. Bu motifi taşıyan peptitlerin yapısal kararlılığı, doğal polipeptidik moleküllere özgüdür. Diğer taraftan, son yıllarda, akrep zehirlerinden disülfid köprüsü içermeyen peptitler de tanımlanmıştır. Bu peptitler genellikle 1-5 kDa molekül ağırlığında, daha çok 1-3 kDa aralığında kümelenmişlerdir. NDBP'ler antimikrobiyal, hemolitik ya da immün fonksiyonları düzenleyici aktiviteler göstermektedir [62].



Şekil 3.1. Inhibitory cysteine knot (ICK) motifinin yapısı. β şeritler turuncu renkte gösterilmiştir ve sistein düğüm oluşturacak altı sistein rezidüsü 1-6 etiketlenmiştir. [65].



Şekil 3.2. Koni salyangozu, örümcek ve akrelerden keşfedilmiş zehir peptitlerinin moleküler ağırlık dağılım histogramı [63].

Yılan ve örümcek zehirlerinin tersine, akrep zehirleri genellikle düşük enzimatik aktivite gösterirler [66]. Mukopolisakkaritler, fosfolipazlar, hiyaluronidazlar, proteaz inhibitörleri ve serotonin ve histamin gibi düşük molekül ağırlıklı moleküller, inorganik tuzlar, mukus ve nörotoksin peptit denilen birçok temel küçük proteinler içerirler [67]–[69]. Peptitler, iyon kanallarıyla özel etkileşim halindedirler, bu da akrep zehrinin özgün olarak istenilen hücre tipine-örneğin kanser hücreleri gibi-bağlanmasını sağlar. Bundan dolayı, zehir kaynaklı moleküller, ilaç tasarım ve geliştirilmesi açısından farmasötik endüstrisinin ilgisini çekmektedir [70].

3.3. Akrep Zehir Peptitlerinin Terapötik Potansiyelleri

Bahsedildiği üzere, zehirli hayvanlar avına saldırmak ve yakalamak için geniş bir dizi peptit toksin geliştirmektedirler. Bu peptitler çeşitli farmakolojik hedeflere karşı oluşturulurlar; bundan dolayı, hedeflerin özellikleri ile ilgili farklı deneysel çalışmalarda ligand olabilecek eşsiz birer kaynak olabilirler. Zehir peptitleri çok çeşitli ve seçici farmakolojik etkiye sahiptirler. Bu peptitlerin birçoğu in vitro, in vivo çalışmalarda; ağrı tedavisi, diyabet ve multiple skleroz gibi hastalıkların tedavisi için prelinik ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır [3].

Zehirlerin 10 milyondan fazla biyoaktif peptit içerdiği öngörülmekte ve bu onları ilaç keşfi için önemli bir kaynak yapmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, kronik ağrı, inflamasyon gibi pek çok hastalığa karşı ilaç geliştirilmesinde bu peptitlerin yapısı örnek alınmaktadır. Bilinen nörotoksik etkilerine ek olarak, antimikrobiyal, analjezik, antiparazitik, sitolitik, hemolitik, antiaritmik ve enzim inhibisyonu gibi aktivitelere sahip peptitler içermektedirler. Avlarını paralize ettikleri için zehirlerin nöronal iyon kanalları ve reseptörlerinin aktiviteleri üzerinde etkili olan bol miktarda peptit içermeleri şaşırtıcı değildir. Tanımlanan zehir peptitlerinin çoğu voltaj kapılı potasyum, kalsiyum ya da sodyum iyon kanallarını hedef almaktadır. Ligand kapılı kanallarla etkileşime giren peptitler de bulunmuştur. Zehirlerin çok az bir kısmı tanımlanmıştır, zehir tabanlı ilaç araştırmalarında devam eden teknik gelişmeler zehir yapılarının öncülüğünde pek çok yeni terapötik ortaya çıkarması beklenmektedir [65], [71]–[74]. Akrep zehirleriyle yapılan çalışmalarda da,

antimikrobiyal, anti-tümör, hemolitik, vazodilatör, anti-epileptik ve insektisidal aktiviteleri olduğu görülmüştür.

Akrep zehirleri, *in vitro* ve *in vivo*'da, hatta faz I ve II klinik denemelerinde kanser hücreleri üzerinde etkili oldukları için kanserle mücadele için umut verici bir yaklaşımdır. En çok çalışılan peptitler, 60-70 amino asit artığından oluşan dört disülfid köprü ile çapraz bağlanmış uzun zincirli toksinlerdir. Bu peptitler çoğunlukla Na⁺ kanallarını aktive ederler [13]. α -toksinler ve β -toksinler [75], [76] olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. 30-40 amino asit kalıntıları ile kısa zincirli toksinler çapraz bağlanmış üç disülfid köprü ile esas olarak K⁺ veya Cl⁻ kanalları üzerine hareket eden başka bir polipeptid ailesi oluşturur [13]. Zehir, iyon kanallarının yanı sıra diğer hedefler üzerinde etkili olan disülfid köprü içermeyen peptitleri içerir [13], [77]. İyon kanalları, hücrel aktivite için temeldir ve bu kanallar üzerinde etkili akrep zehiri proteinleri yırtıcılara karşı savunma ve avlanmada son derece önemlidir [13]. Ayrıca, yeni kuşak insektisitlerden biyoinspektisitler çevreye dost yapılarıyla geleneksel tarım ilaçlarına alternatif olmaktadır. Zehirlerinin böcekleri paralize eden ya da öldüren insektisidal peptitler açısından zengin olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerini, iyon kanalları, reseptörler veya enzimleri etkileyerek gerçekleştirmektedirler. Yeni tanımlanmış birçok zehrin avında/düşmanında etki açısından özgün bir bölgeyi hedef aldığı görülmüştür [78].

3.3.1. Antimikrobiyal Peptitler

Mikroorganizmalarda antibiyotik direnç sıklığının, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini geride bırakan bir hızla artışı çok ciddi bir problem haline gelmiştir. Acilen yeni ve daha etkili antimikrobiyal ajanların keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu etken maddelerin güçlü bir kaynağı, antimikrobiyal peptitler (AMPs), doğada mikroorganizmalar, böcekler, amfibiler, memeliler ve bitkilerde her zaman hazır ve sıkça bulunmaktadır. Bu ajanlar, doğal immün sistem savunmasının bir parçası olarak üretilmektedirler ve dirençli suşları da içeren geniş bir mikroorganizma spektrumuna güçlü aktivite göstermektedirler. Güçlü aktivite, düşük direnç oranları ve eşsiz aktiviteleri ile AMP'ler son zamanlarda çok ilgi görmüştür [11], [79].

Antimikrobiyal peptitlerin aktivite mekanizmaları, sitoplazmik membran bütünlüğünü bozarak hızlı bir şekilde mikroorganizmaları öldüren klasik

antibiyotiklerden daha farklıdır. Çoğu, hücre-duvar biyosentez yolağını etkilemek, protein biyosentez inhibisyonu ya da nükleik asitler ile etkileşim gibi intrasellüler süreçlere müdahale edebilirler. Bu özellikleri, antibiyotik geliştirilmesinde onları cazip birer ilaç adayı yapmaktadır. Son otuz yılda, en az 2300 farklı antimikrobiyal peptit [80], [81] çalışılmıştır, ve teröpatik ajan olarak birçok antimikrobiyal peptit keşfedilmiştir.

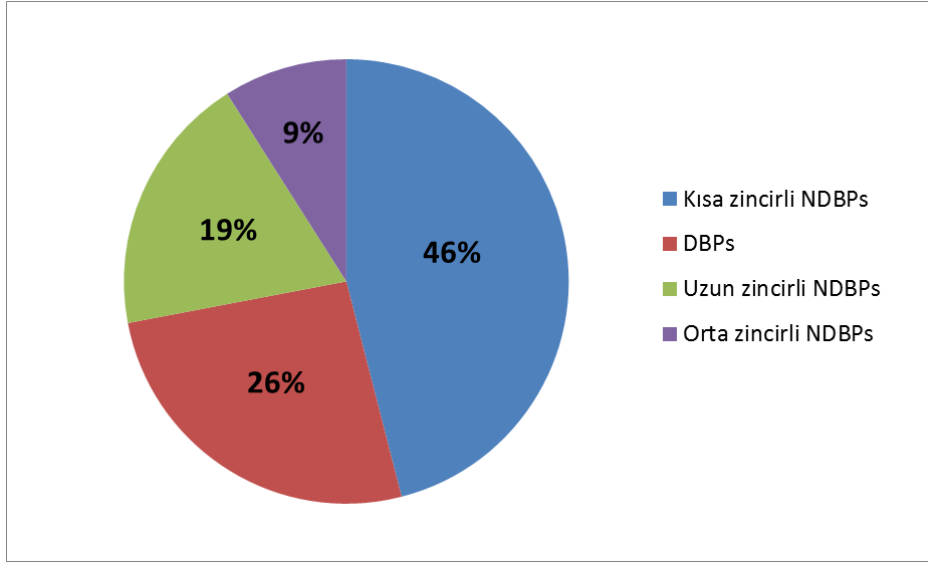
Antimikrobiyal peptidler genellikle α -helikal polikasyonik yapıda peptitlerdir. 12 ve 50 aminoasit dizisi arasındaki kısa proteinlerdir. Bu peptidler iki ya da daha çok pozitif yüklü arginin, lizin rezidülerini ve büyük çoğunlukla (genellikle %50) hidrofobik rezidüler içerir.

Zehir yapısında disülfid bağı içeren (DBPs) ve içermeyen (NDBPs) olarak sınıflandırılan peptitler bulunmaktadır. Antimikrobiyal toksinler, genellikle disülfid bağı içermeyen (NDBPs) peptit ailesine aittir. Akrep zehiri AMP'leri pozitif yüklü amfipatik peptitlerdir ve üç yapısal kategoriye ayrılabilir: (1) sistein içeren disülfid köprülü peptitler ; (2) sistein içermeyen amfipatik α -heliks yapısındaki peptitler (3) prolin ve glisin gibi belirli amino asitler bakımından zengin peptidler.

Akrep zehirlerinden sistein içeren ilk AMP, Possani ve arkadaşları tarafından Afrika akrebi *Pandinus imperator* türünün zehrinden izole edilmiştir [82]. Scorpine (8.3 KDa, 75 aa, 3 disülfid köprü) özgün bir yapıya sahiptir. Scorpine, agar difüzyon testte gram-positif (*B. subtilis*) ve gram-negatif (*K. pneumonia*) bakterilerine karşı aktivite göstermiştir.

Akrep zehirlerinden sistein içeren antimikrobiyal peptitler izole edilseler de, sonradan çok çeşitli NDBP'ler izole edilmiştir [48], [62], [83], [84] ve şimdi bunlar çoğunluktadır. Hadrurin, Meksika akrebi *Hadrurus aztecus* zehirinden saflaştırılan, sistein içermeyen AMP ailesinin bir prototipidir. Hadrurin (4436 Da, 41 amino asit), fizyolojik pH'da genel olarak pozitif yüklüdür [85]. Parabutopirin *Parabuthus schlechteri* [47] türü akrepten ve pandadinin 1 ve 2 *Pandinus imperator* [46] dan keşfedilen antimikrobiyal peptitlere örneklerdir. Parabutopirin için yapılan antimikrobiyal testlerinde Gram–negatif organizmalara karşı üreme inhibisyonu (MIC 1-6 μ M) gösterirken gram-pozitif organizmalara karşı daha düşük aktivite (MIC >25 μ M) göstermiştir [86]. İki antimalarial peptit (meucin-24 ve meucin-25),

Asyalı akrep *Mesobuthus eupeus* türünün zehir bezi cDNA kütüphanesi taranarak tanımlanmıştır [48]. Bu iki peptit, solid state sentez metoduyla sentezlenmiştir.



Şekil 3.3. Akrep zehirlerinden türetilmiş antimikrobiyal peptitlerin farklı sınıfları (~45) ve her kategorinin göreceli oranı[11].

3.3.2. Antikanser Peptitler

Zehirlerle ilgili araştırmalar, zehirli sistemler genom projesi gibi genomik ve proteomik teknolojilerdeki son gelişmeler [4] zehir ve toksinleri taramak için yeni metotların geliştirilmesi [87], [88] ile çalışmak için çok heyecan verici bir saha haline gelmiştir.

Günümüze kadar 1500 ün üzerinde akrep türü tanımlanmış olup, her biri farklı tip zehir üretmekte ve her zehir de 50-100 farklı polipeptit toksin içermektedir. Bu türlerin sadece çok azı çalışılmış ve 250 civarında biyoaktif peptit karakterize edilmiştir [75], [89]. Bunların çoğu önemli oranda antikanser aktivite göstermiştir ve hala araştırmalar sürmektedir. Akrep toksinleri, Faz I ve faz II klinik denemelerde, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kanser hücreleri üzerinde ciddi etkiler göstermişlerdir. Antikanser tedavi hayvan orijinli peptit ve proteinlerin ana kullanım alanlarında birisidir. Uzun zincirli toksinler 60-70 aminoasitten oluşur ve disülfid

bağı içerirler, temel olarak Na^+ kanalları üzerinde etkilidirler. Kısa zincirli toksinler 30-40 aminoasitten oluşurlar ve K^+ ve Cl^- kanalları üzerinden etki ederler. Bu protein ve peptitlerin bazıları, spesifik olarak kanser hücre membranlarına bağlanarak migrasyon ve proliferasyonu etkiler. Hayvan zehirlerinden elde edilen bazı peptit ve proteinler mekanizmalarına göre tanımlanmışlardır; kanser hücre membranındaki spesifik hedefe bağlanan spesifik iyon kanal peptidini bloke ederek kanser hücre fizyolojisini etkileyen iyon kanal toksinleri [90], anjiyogenesis inhibitörleri [91], kanser hücrelerinde membran geçirgenliğinden sorumlu toksinler vb.

Akrep zehrinden bulunan, en dikkate değer moleküllerden birisi Klorotoksin (Cltx)'dir. Cltx 36 amino asit (2Cys-19Cys, 5Cys-28Cys, 16Cys-33Cys ve 20Cys-35Cys) ve dört disülfid köprüsü içerir [92], [93]. Cltx [94], *Leiurus quinquestriatus* türü akrepten iyon kanalı inhibitörü olarak keşfedilen ve beyin tümöründe etkili sonuç veren antikanser bir toksindir. Spesifik olarak beyin tümörü hücrelerinin membranında bulunan metalloproteinazları (MMP-2) hedef alan Cltx, Cl^- akışını inhibe ederek tümör invazyonunu engellemektedir [49], [90], [95], [96]. MMP-2, tümör invazyonunda etkili bir proteinazdır ve beyin tümörü hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilmektedir. Bu seçici ilgi nedeniyle Cltx, beyin kanserinin görüntülenmesinde klinik olarak denenmektedir.

Bu peptitin (TM601) iyot 131 bağlanmış sentetik bir versiyonu (131I-TM601) ilaç endüstrisi tarafından, tümör hücrelerine radyasyon taşınması için üretilmektedir [94]. Klinik öncesi ve faz I klinik çalışmalar gliom tekrarlayan hastalarda sonuçlandırılmıştır. Bu çalışmalar, kullanılan 131I-TM601 intrakaviter dozu en az toksisite ile güvenli olduğunu göstermiştir ve uzun süre için malign gliomlara etkili ve spesifik olarak bağlı kaldığı gözlenmiştir. Yeni bir çalışmada TM601 kanser hücrelerinde pro-anjiyogenik faktörler tarafından uyarılan anjiyogenezi inhibe ettiği ve TM601 bevacizumab ile birlikte uygulandığı zaman, kombinasyon bevasizumab'ın dozundaki on katlık bir artıştan daha güçlü etki gösterdiği ortaya koyulmuştur [97]. Cltx, düşük toksisitesi, glioma hücrelerine seçici bağlanması ile gliomaya karşı potansiyel olarak önemli bir ajan durumundadır.

Melittin, önemli ölçüde anti tümör aktivite gösteren, 26 amino asitten oluşan küçük ampifilik bir peptittir ve *Apis mellifera* türü arıdan elde edilmiştir. Çok değişik kanser tiplerinde etkili olduğu görülmüştür. Hücre proliferasyonunda rol oynayan

kalmoduline bağlanabilme ve inhibisyon özelliği gösterilmiştir [98]. Melanoma hücre membranlarında Melanotropin reseptörünü inhibe ederek etki ettiği de gözlenmiştir. Kaspaz ve metalloproteinaz aktivasyonu gibi farklı mekanizmalar ile de antikanser etki gösterdiği çalışılmıştır [99], [100].

Hadrurin ve parabutoporin gibi α -helikal polikationik antimikrobiyal peptitler, diğer hayvan türlerindeki arı zehrinden mellitin, *Rana ridibunda* zehrinden brevinins gibi por oluşturan toksinlerle homologtur [101]. Brevinins ve özellikle mellitin çeşitli kanser hücrelerine karşı antitümör aktiviteleri ile bilinirler. Bu durum, akrep zehirlerinden izole edilen böyle homolog por oluşturan toksinlerin de tümör hücreleri üzerinde benzer özellikler sergileyebileceği fikrini vermektedir. Mellitin benzeri başka moleküllerin antitümör aktiviteleri pek çok çalışmayla rapor edilmesine rağmen, antimikrobiyal etkili akrep toksinlerinin kansere karşı net etkisini gösteren bir çalışma yoktur, araştırmanın bu sahası hala keşfedilmemiştir.

3.3.3.Potasyum İyon Kanallarını Bloke Eden Peptitler

K kanalları, seçici olarak K^+ iyonlarını hücre membranlarından taşırlar; uyarılan ve uyarılmayan hücrelerin fizyolojisinde anahtar rol oynarlar [102], [103]; kalp atışının regülasyonu, kas kasılması, nörotransmitter madde salınımı, hormon sekresyonu, sinyal iletimi ve hücre proliferasyonu gibi hücresel süreçlerde aktif olarak görevlidirler. Bu kanallar üzerinde etkili akrep zehir toksinleri, düşmana karşı savunma ve avını yakalamada çok önemlidir. Akrep zehirlerinin ilk hedefi, sinir hücre zarları üzerindeki voltaj kapılı sodyum ve potasyum iyon kanallarıdır. Kanalları değiştirerek etkilenmesi sonucunda hipertansiyon, taşikardi, mide bulantısı, asidoz vb. gibi komplikasyonlar oluşur. Zehirlenmede nörotoksinlere ek olarak bulunan serotoninin de ağrıyı artırdığı düşünülmektedir.

İyon kanalları neredeyse tüm canlı hücrelerinde ifade edilen zar proteinlerdir. İnsan genom sekansında 400'den fazla varsayımsal iyon kanalı tanımlanmıştır, ama bunların yalnızca bir kısmı klonlanmış ve fonksiyonel olarak test edilmiştir. Ökaryotlarda, farmakolojik olarak ve por topolojisine göre farklı yapıda pek çok K^+ kanalı tanımlanmıştır, bu çalışmalarda akrep zehirlerinden elde edilen peptitlerin kullanımı önem taşır. İyon kanalları, geçit oluşturan transmembran proteinlerdir; hücre membranı boyunca aktif iyon akışının kontrol ederek, hücre içi ve hücre dışı

çevre arasındaki voltaj potansiyelinin belirlenmesinde ve kontrolünde görev alırlar [104], [105]. Açılıp kapanmaları çok fazla fizyolojik süreç ile etkileşim halinde olmaları ve yaygın doku dağılımları nedeniyle ilaç keşfinde oldukça zorlayıcı hedeflerdir [106].

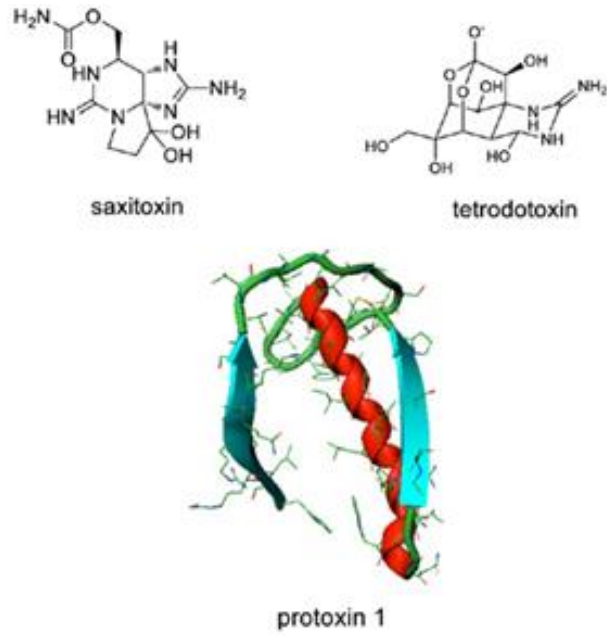
Bir çok çalışmada, hücre döngüsünün düzenlenmesinde iyon kanallarının da ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. İyon kanalları hücre proliferasyonunu çeşitli yollarla kontrol etmektedir. İlk olarak, iyon kanalları (özellikle voltaj kapılı K^+ kanalları) membran potansiyelinin korunmasını kontrol ederler ve membran potansiyelindeki değişiklikler hücre döngüsü boyunca kesinlikle gereklidir. İyon kanallarının, hücre döngüsü ilerlemesinde yer aldığı diğer bir nokta da hücre hacminin kontrolüdür. Hücre çoğalması, bazı durumlarda "şişme", K^+ ve Cl kanallarının aktivitesini içeren süreçle yakından ilişkilidir [107]. Beklendiği gibi, hücre çoğalmasını düzenleyen aynı iyon kanal mekanizmaları madalyonun diğer tarafının yani apoptoz kontrolüne de katılmaktadırlar. Çeşitli çalışmalar apoptozdaki klorür, potasyum ve kalsiyum kanallarının katılımını desteklemektedir. K^+ dışarı akışı hücreleri ölüme sürükleyen bir dizi olayı tetikler [108], [109]. Örneğin, kornea epitel hücrelerinde, UV indüklü apoptozun erken döneminde voltaj kapılı potasyum kanallarının aktive olduğu görülmüştür [110]. Pek çok çalışma, DNA fragmantasyonunun potasyum kanallarının bloke edilerek inhibe edildiğini göstermektedir. Örneğin, dofetilid (HERG kanal blokleri) kanser hücrelerinde DNA parçalanması engeller [111]. Kaspaz aktivasyonu ve apoptoz da, voltaj bağımlı potasyum kanallarının yaygın olarak bilinen inhibitörü tetraetilamonyum (TEA) ile inhibe edilir [112].

Voltaj kapılı K^+ kanallarının çeşitli kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonu, transformasyon sürecinde iyon kanallarının ilgili olduğunu düşündüren en ilgi çekici kanıtlardandır [106].

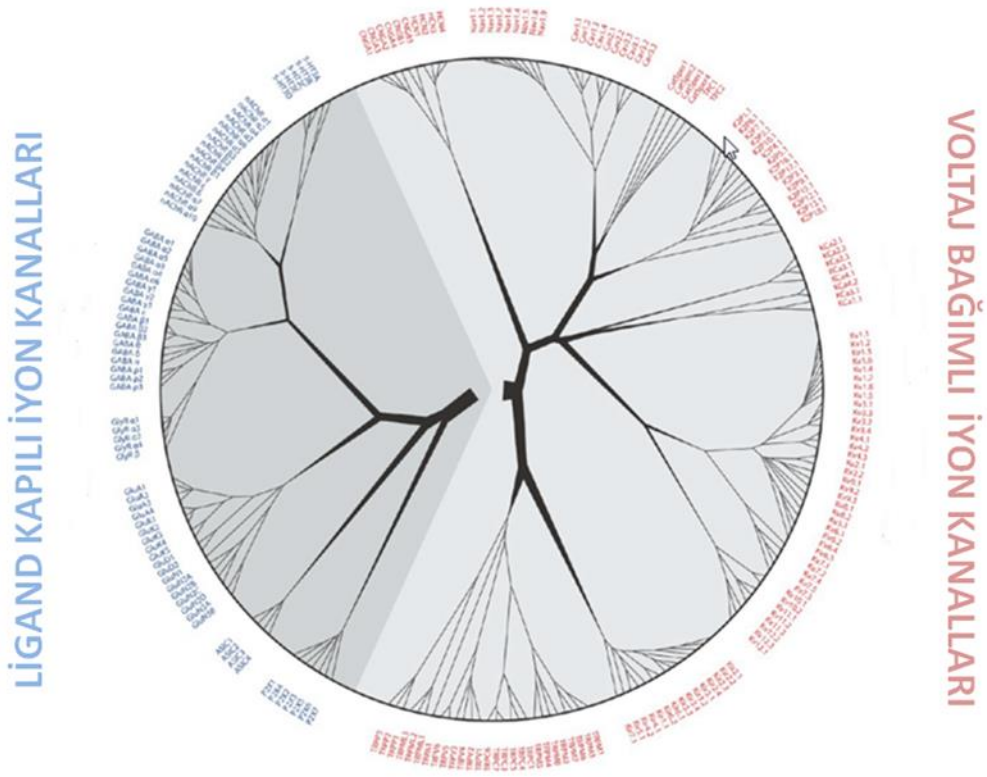
İyon kanallarının değişimi ve düzenlenmesi, kardiyak bozukluklar, nörolojik endikasyonlar, böbrek yetmezliği ve körlük gibi geniş bir yelpazede çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. İyon kanalları insan vücudunda bütün dokularda ve hücre tiplerinde ifade edilir, bu proteinlerin pek çok hastalıkla ilişkili olması şaşırtıcı değildir. İyon kanallarındaki mutasyonlar yoluyla oluşan 60'dan fazla kanal ilgili insan hastalıkları olarak tanımlanmıştır. İyon kanal süperailisi insan fizyolojisinde oynadığı merkezi rol göz önüne alındığında membran yerleşimleri ve ailenin farklı

üyelerinin çeşitli dokularda dağılımı, ilaç keşfi için cazip bir potansiyel hedef sınıfını temsil eder [106].

Pek çok kaynaktan fraksiyonlanmış zehir karışımları veya tek tek toksinler araştırma amaçlı ticari olarak mevcutken zehirli peptidler ve toksinlerin çok sayıda optimize versiyonları araştırmacılar tarafından takip edilmektedir. Bazı yaygın toksinler şekil 3.4.de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Zehirlerden türetilen ve ticari olarak mevcut olan bazı genel iyon kanal toksinleri [106].



Şekil 3.5. İyon kanallarının filogenetik ağacı [106].

İyon kanalları ailesinin en büyük şubelerini voltaj kapılı Kv potasyum kanalları oluşturur, tüm potasyum kanalları genel iyon kanal proteomunun en büyük kısmını oluşturmaktadır.

Akrep kaynaklı K kanalını bloke eden toksinler (KTxs) yapılarındaki 3-4 disülfid bağlarıyla 28-40 aminoasitlik kısa, sıkı ve dirençli peptitlerdir; K kanallarının fizyolojisini araştırmak, por yapılarını tanımlamak için çok değerli araçlardır. K kanallarını bloke eden zehir peptitleri, K kanalı ile ilgili olan birçok hastalığın tanı ve tedavisine yönelik ilaç geliştirilmesinde de kullanılmaktadır, çalışmalar sürmektedir. Karibidotoksin, *Leiurus quinquestriatus hebraeus* türü akrepten keşfedilen bir toksindir, kalsiyum aktive-K iyon kanalını bloke eder, anti-zehir

serum olarak akrep sokmalarına karşı kullanılmaktadır. *Centruroides margaritatus* zehrinden Margatoksin de en çok bilinen Kv1.3 inhibitörü zehir peptitlerindedir. MegTx1 , MegTx2 ve MegTx3 adlı üç yeni α -KTX tipi K^+ kanal inhibitörü, akrep *M. gibbosus*'un zehrinden, zehir bezinde ifade mRNA'ların cDNA kütüphanesinin taranması ile saptanmıştır. Bu toksinlerin, sırasıyla α -KTx3.x , α -KTx9.x ve α -KTx16.x ailelerine ait olduğu gözlenmiştir [113].

3.4. Zehir Profillemesinde Kullanılan Metotlar

Zehirler çeşitli etkilere sahip geniş bir moleküler kütle aralığındaki (0.1-200 kDa) bileşenlerin kompleks karışımlarını içermektedir. Örümcek, akrep gibi Arachnid türlerinin zehir bileşimi ağırlıklı olarak peptit, diğer zehirli hayvanlardan yılanların zehirlerindeki ise ağırlıklı olarak proteindir. Proteomiks profillemesi (MA>10 kDa olan bileşenler), geleneksel iki boyutlu elektroforez (2-DE) veya sıvı kromatografi tabanlı proteomiks metotların kütle spektrometresi (MS ya da MS/MS) ile kombinasyonu ile gerçekleştirilir. Peptidomik profillemesi ise (MA<10kDa) kromatografik ayrımların kombinasyonu ve Edman degradasyonu veya MS/MS ile peptit sekanslama ve tanımlanmasına dayanmaktadır [114]. Bu kadar kompleks karışımlar olan zehirlerin öncelikle ön saflaştırma işlemine de tabi tutulması gerekmektedir. Peptidomik profillerin çıkarılması, çok geniş çeşitlilik ve genomik verilerin eksikliğinden dolayı daha zordur. Bu nedenle, *de novo* dizileme ana yaklaşımdır. Bir seri jel filtrasyon ve ters faz kromatografisi ile ayırımından sonra *de novo* peptit sekanslama, tandem (ardışık) kütle spektrometresi (MS/MS) ile gerçekleştirilebilir. Bu tekniğin yanında otomatik Edman degradasyonu sistemleri de peptit dizileme amacıyla tamamlayıcı bir şekilde kullanılmaktadır. Hedeflenen moleküller 10 kDa'un altında molekül ağırlığına sahip peptitler olduğundan, daha büyük molekülleri ve proteinleri uzaklaştırabilmek için genellikle önce jel filtrasyon kromatografisi uygulanır [114].

Akrepler de dahil olmak üzere farklı zehirli hayvanların zehirleri, biyoaktivite rehberliğinde fraksinasyon (bioactivity-guided fractionation) stratejisi kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla, zehirler, biyoaktivite açısından tarandıktan sonra, biyolojik aktivite sergileyen fraksiyonların saflaştırma ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Zehir karakterizasyonunda kullanılan bu yaklaşım, uzun zaman

alır ve büyük miktarda ham zehir gerektirir. Son yıllarda, çeşitli akrep türlerinin zehir bileşimlerinin çeşitlilik değerlendirilmesinde zehir proteomik yaklaşımı kullanılmıştır [115]–[119]. Akrep zehir bileşimleri ile ilgili diğer bilgiler, çeşitli toksin benzeri peptidlerin tanımlanmasına izin veren yüksek verimli DNA diziliminin geliştirilmesi ile elde edilmiştir [115], [116], [118]–[129]. Sanger dizileme uygulanmasının ardından cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasına dayanan transkriptom yaklaşımının kullanılması, akrep zehirlerine genel bir bakış elde etme imkanı sağlamıştır. Bu yaklaşım, toksin transkriptlerinin oransal bolluklarını ve zehir bileşenlerinin göreceli önemini değerlendirmek için bir fırsat yaratmıştır[115], [129].

3.4.1.Sıvı Kromatografi Yöntemi

Yüksek Performans/Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analitik ayırma tekniklerinde en yaygın kullanılan cihazlardan biridir. Duyarlılığı ve kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması açısından önemlidir. Aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar, ilaçlar ve pestisitler gibi geniş bir analiz yelpazesi vardır. Ana modülleri; pompa otomatik örnekleyici (autosampler), kolon ve dedektördür.

Mobil Faz

Analiz edilecek maddeleri taşıyan hareketli fazdır. Mobil faz genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, metanol veya asetonitril ile oluşturulan çözeltiler veya organik çözücülerden oluşur. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri ayrımı doğrudan etkiler. Bu nedenle analiz edilecek madde ve kolona göre uygun mobil faz seçilmelidir.

Pompa

Pompa hareketli fazın yüksek basınçla sistem içinde hareket etmesini sağlar, mobil fazı çekip, örnekleyiciye ve kolona gönderir. Pompanın akış hızı ve basınç değerleri her analize uygun olarak ayarlanır. Akış hız limitlerine göre pompalar Analitik, Analitik-Preparatif ve Preparatif olarak gruplandırılabilir. Analitik olanlar 0.1–5mL akış değerleri arasında kullanılır. Mobil faz sayısı ve karıştırma özelliklerine göre de Tek Kanallı (İzokratik), Çift Kanallı Mikserli (Binary Gradient) ve Dört Kanallı Mikserli-Miksersiz (Quaternary Gradient) olarak sınıflandırılabilirler. Gradient çalışmalarda istenilen zaman aralığında mobil fazların değişik oranlarda

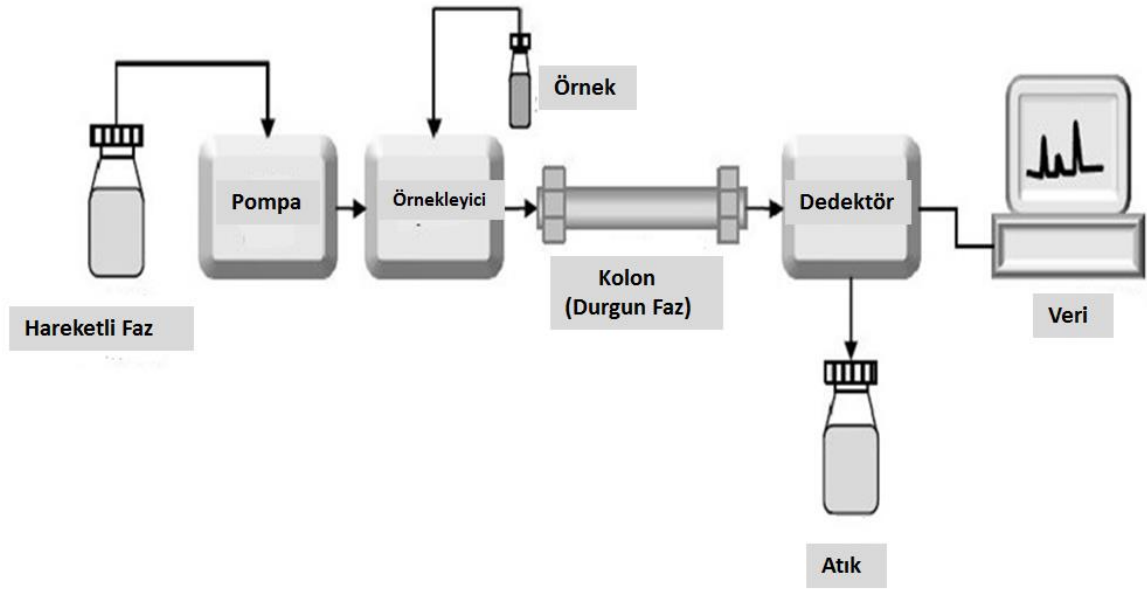
karışımı yapılabilir. Bu sayede analizin ayırım gücü artırılabilir. Günümüzde Nano ve Ultra pompaların kullanımıyla Ultra Performans Sıvı Kromatografi (UPLC) ve Nano (nHPLC) sistemleri geliştirilmiştir.

Örnekleyici

Örnekleyici, numunelerin sisteme gönderilmesini sağlar. Temel olarak iki tiptedir; Manuel (EI tipi) ve Otoörnekleyici (Otomatik). Manuel olanda, örnek bir şırıngaya çekilerek valf yardımıyla sisteme gönderilir. Otoörnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi yapabilmektedir. Numunenin temiz olması önemlidir, dikkat edilmezse sistem kirlenir veya tıkanır. Sisteme göndermeden önce analiz edilecek madde mutlaka şırınga filtresinden geçirilmelidir.

Kolon

Kolon bir karışımdaki bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlayan sabit-durgun fazdır. Genellikle çelik gibi basınca dayanıklı malzemedir yapılır, içi özel ve analiz tipine uygun dolgu maddesiyle doldurulur (Silika veya polimer gibi). Kolon fırını ise istenilen bir sıcaklığı sabit tutmak için kullanılır.



Şekil 3.6. Sıvı kromatografi sisteminin temel bileşenleri

Jel Eleme-Jel Filtrasyon Kromatografisi

Maddeleri molekül ağırlıklarına göre ayıran bu teknikte analiz edilecek örnek ve kolon dolgu maddesi arasında kimyasal değil fiziksel bir etkileşim olur. Büyük molekül ağırlıklı olanlar, dolgu maddesindeki porlara takılmadan kolonu önce terk ederler. Genellikle polimer, şeker ve protein içeren örnekler için kullanılır.

Normal Faz Kromatografisi

Sabit faz polar, hareketli faz ise non-polar ya da düşük polaritelidir. Silika jel yapısındaki bir polimer $-CN$, $-NO_2$ veya NH_2 grupları bağlanmış dolgu maddeleri kullanılır. Mobil faz, kloroform, hekzan gibi çözücüler ve bunların karışımlarından oluşur. Az polar madde kolondan önce çıkar. Benzer özellikteki maddelerin birbiri içinde dağılma özelliğinden dolayı, düşük polariteye sahip numune hareketli fazda daha iyi çözünür ve kolondan erken ayrılır. Apolar madde de yine aynı özellikten dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Ters Faz Kromatografi:

Sabit faz apolar, hareketli faz polar olan sistemlerdir. Silika jel bir polimer ve buna bağlanmış C₁₈, metil, etil vb. gruplarından oluşan dolgu maddeleri kullanılır. Polar hareketli faz olarak metanol, asetonitril gibi güçlü organik çözücülerin sulu karışımları kullanılır. Daha polar olan madde kolondan erken çıkar. Bu sistem, maddeleri hidrofobisitelere göre ayırmaya olanak sağlamaktadır.

3.4.2. Kütle Spektrometresi

Kompleks karışımları analiz edebilen hızlı ve güçlü tarama metotlarının geliştirilmesi farmasötik araştırmalar için gereklidir. Doğal ürün araştırmalarıyla ilişkili olarak, muhtemel bileşimleri ayırmak ve karakterize etmek için çok sayıda araç/alet geliştirilmiştir. Günümüzde, bu gibi modern ayırma teknikleri çeşitli olanaklar sunmaktadır. Özellikle sıvı kromatografisi (LC) anahtar rodedir ve birbirinden farklı LC teknikleri sürece önemli katkıda bulunmaktadır. Buna paralel olarak, elektropray iyonizasyon gibi, iyonizasyon tekniklerinin paralel olarak geliştirilmesi, polar biyolojik moleküllerin kütle spektrometrik (MS) analizlerine olanak vermiştir. Kütle spektrometrisinin uygulanması ve sıvı-faz ayırma teknikleriyle birlikteliği-özellikle de sıvı kromatografisi- doğal ürünlerin analiz ve karakterizasyonunda devrim niteliğinde bir ilerleme olarak tanımlanmaktadır. Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analiz etme esasına göre çalışan cihazlardır [130]. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler [130]–[132].

Kütle spektrumu, numunenin iyonlara (çoğunlukla pozitif) ayrılması ve bu iyonların kütle/yük oranlarına göre sıralanmasıyla elde edilir. İyonizasyonda, kütle dağılımı çoğunlukla ana maddeye özgü olan, pozitif tanecikler dizisi meydana gelir. Kütle spektrometresi de bu temele dayanarak geliştirilmiştir. Bir kütle spektrumu kimyasal yapı hakkında önemli veriler sunar. Kütle spektrometresi karışımların kantitatif analizlerinde de kullanılır. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütle ve yüke sahiptir ve elektromanyetik alan içinde kütle dedektörüne itilirken kütleleri (m) oranında elektrik yükü (z) kazanırlar. Kütle spektrometrelerde ölçülen

parametre bu şekilde oluşan kütleye karşılık olan elektrik yüküdür (m/z). Her bir iyonun yoğunluğu dedektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır.

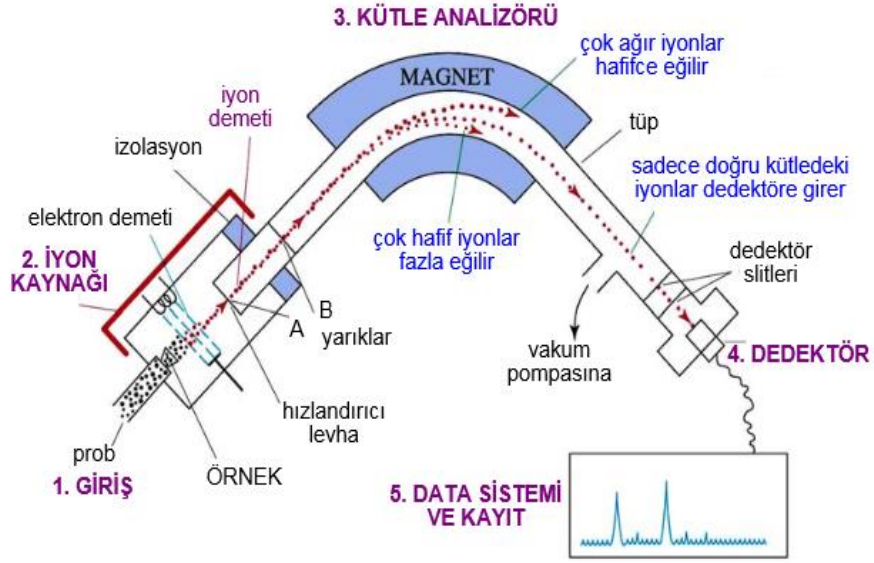
LC-MS sistemlerinde, iyonlaşma tekniği olarak genel olarak elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullanılırken, atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) gibi diğer alternatifler de mevcuttur. Son jenerasyon cihazlarda her iki iyonlaşma tipi için eş zamanlı sonuç alma teknolojisi mevcuttur. Genel olarak elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) iki analitik alet arasında köprü görevi görür. LC-MS, doğal ürün araştırmalarında; prelininer tarama, izolasyon ve karakterizasyon, kalite kontrol/parmak izi ve metabolizma ve farmakokinetik çalışmalar gibi çok çeşitli alanlarda etkin bir performans sergilemektedir.

LC MS' de numune bir adet kütle dedektöründen geçirilir, dolayısıyla ana iyonun fragmentlerini (daughter iyonlarını) tanımlamak ve tespit etmek mümkün değildir. Bunun için en uygun yöntemlerden birisi, iki veya daha fazla analitik tekniğin ard arda (tandem) bağlanmasıdır. Ardışık Kütle Spektrometrisi (Tandem Mass Spectrometry, TMS), kullanımında ise, birden fazla kütle dedektörü ardışık olarak birbirine entegredir. TMS'de karışım birinci MS'nin iyon kaynağına verilir. Burada karışımın iyonizasyonu bileşiğin kendine has karakteristik iyonlarının oluşmasını sağlar, bunlara "parent" iyonlar denir. Bilinmeyen örneğin karakteristik "parent" iyonu böylelikle seçilir ve tanımlanır. Bu işlem, incelenecek olan bileşimi karışımın diğer bileşenlerinden ayırır. Böylece ayrılmış olan "parent" iyon ikinci MS analizöre gönderilir ve burada ikincil iyon fragmentlerine ayrışır. Bunlara "daughter" iyon denir. "Daughter" iyonun ikinci MS analizör tarafından kütle analizi, incelenen "parent" iyonun kendine has ve oldukça yüksek özgünlükte tanımlanmasını sağlar. Özet olarak, birinci MS bir karışımdan tek bir bileşiği ayırmak için kullanılır.

Kütle spektrometreleri genel olarak,

- Numune girişi
- İyonlaştırma kaynağı
- Kütle filtresi

- Detektör
- Vakum Sistemi
- Data sistemi kısımlarından oluşmaktadır.



Şekil 3.7. Bir kütle spektrometrenin şematik diyagramı [133]

4.MATERYAL VE METOD

4.1. Akrepler

Protoiurus kraepelini türü akrepler Kadir Boğaç Kunt tarafından Alanya Taşatan, Gündoğmuş-Akseki ve Avşallar civarından toplanmıştır.

4.2. Akreplerin Bakımı

Akrepler araziden toplandıktan sonra plastik kutular içerisinde laboratuvar koşullarında beslenmiştir. Kutuların zemini cocopeat ile kaplanmıştır. Akrepler haftalık olarak un kurdu, hamam böceği ve çekirgelerle beslenmiştir. Kutular periyodik olarak su ile nemlendirilmiştir. Şekil 4.1.' de *P.kraepelini* türleri beslenmekteyken görülmektedir.



Şekil 4.1. *P.kraepelini* bireyleri beslenirken (Fotoğraf:K.B.Kunt).

4.3. Zehir Sağımı, Liyofilizasyon ve Saklama

Zehir sağımından önce akrepler CO₂ ile uyuşturulmuş ve zehir sağımı yapılacak düzeneğe-panoya (Şekil 4.2) sabitlenmişlerdir. Telson kısmı polipropilen PCR tüpüne yerleştirilmiştir. Telsona uygulanan elektrostimulasyon (15V) yoluyla sağılan zehir, polipropilen tüplerde toplanarak, distile su içinde çözülmüş ve 15000 g de 15 dakika 4°C'de santrifüje edilerek, süpernatant alınmıştır. Zehir sağılacak tüplerin önceden darası alınarak, liyofilizasyon sonrasında içindeki toz halinde bulunan zehir ile tekrar tartılmıştır. Böylece zehrin kuru ağırlığa göre içerdiği protein miktarının hesaplanmasında kullanılacak olan ağırlığı saptanabilmiştir.

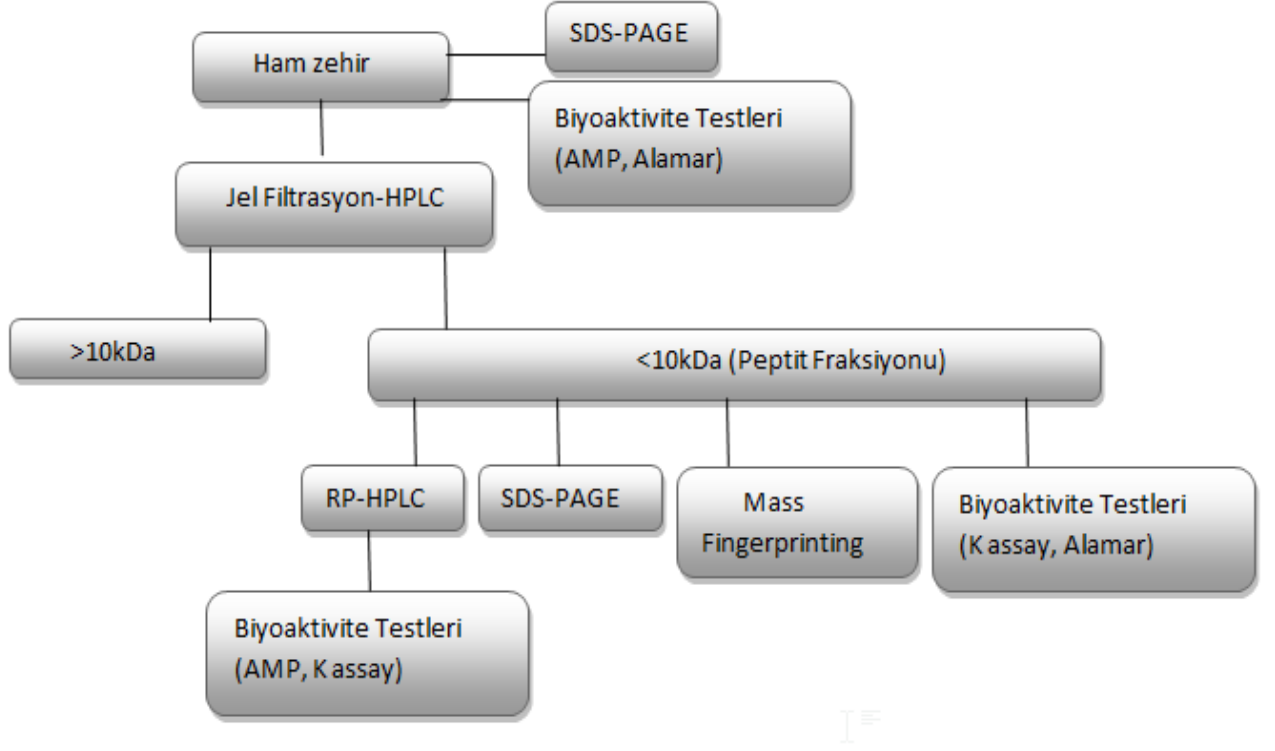


Şekil 4.2. Sağım sırasında laboratuvarımızda kullanılan düzenek

Sağılan zehirler liyofilize edildikten sonra kullanıma kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Ayrıca toplanan peptit fraksiyonları da liyofilize edilerek muhafaza edilmiştir. Liyofilizasyon için örneğin öncelikle dondurulması gerekmektedir, örneğin bulunduğu tüp/falkon kapağı açılarak üzeri parafilmle kapatılır ve iğne ile delikler açılarak hazırlanır. Burada amaç toz haline gelen peptitlerin cihazdaki yüksek vakumla çekilmesini engellemektir.

4.4. Zehir Karakterizasyonu ve Saflaştırılması

Zehrin peptidomik karakterizasyonu ve biyoaktivite açısından taranması amacıyla izlenen yol Şekil 4.3.'de özetlenmiştir.



Şekil 4.3. Deney iş akış şeması

4.4.1. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için Biorad Quick Start™ Bradford Protein Test Kit [134] kullanılmıştır. Öncesinde oluşturulan standart eğriden faydalanarak zehrin protein konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu işlem hem ham zehire hem de ilk saflaştırma basamağı olan jel filtrasyon kromatografisinde toplanan peptit fraksiyonları için yapılmıştır.

Test Protokolü

1. 1X boya soğutucudan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenir.
2. Kit içerisindeki protein standartları 1,5 mL tüpler içinde Çizelge 4.1.'e göre seyreltilerek hazırlanır.

Çizelge 4.1. Mikroplak mikrottest standart setindeki seyreltme miktarları

Tüp	Standart Hacmi (µl)	Standart	Seyreltme Hacmi (µl)	Final Konsantrasyon (µg/ml)
1	10	2 mg/ml	790	25
2	5	2 mg/ml	495	20
3	5	1.5 mg/ml	495	15
4	5	1 mg/ml	495	10
5	5	0.5 mg/ml	495	5
6	5	0.25 mg/ml	495	2.5
7	5	0.125 mg/ml	495	1.25
8	-	Blank	500	0

3. Örnek hazırlanır.

- Liyofilize ham zehir 200µl %0.1 TFA, %10 asetonitril içinde çözülmüştür.
- 2 µl ham zehir+18 µl %0.1 TFA, %10 asetonitril içinde →1/10 seyreltme yapılmıştır.
- 1/10 seyreltilen örnekten 2 µl + 448 µl %0.1 TFA, %10 asetonitril içinde → toplamda 1/225 seyreltme yapılmıştır.

4. Örneğe 450 µl 1X boya eklenir.

5. Hazırlanan standartlardan tüp 1'e 800 µl, tüp 2-8'e 500µl 1X boya eklenir.

6. Her tüpten mikroplak kuyucuklarına 300µl aktarılır. Her protein çözeltisi ve örnek için üçer kopya hazırlanır.

7. Mikroplak oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edilir.

8. ELISA okuyucuda 595nm'de absorbans ölçülür.

4.4.2. Jel filtrasyon Kromatografisi ile Zehrin Ön Saflaştırılması

Zehirlerin yapısı çok kompleks olduğu için bir ön saflaştırma işlemine ihtiyaç vardır. Çalışmada hedeflenen moleküller 10 kDa'un altında molekül ağırlığına sahip peptitler olduğundan, bunun üzerindeki büyük molekülleri-proteinleri uzaklaştırabilmek için jel filtrasyon kromatografisi uygulanmıştır [114], [135]. Çalışmamızda, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı için tasarlanan bir jel filtrasyon kolonu (TSK 2000SW size-exclusion chromatography (SEC)

column, 7.5 × 600 mm, 12.5 nm pore size, 10 µm particle size) kullanılmıştır. Şekil 3.4.'de görüldüğü gibi, bu kolon normal HPLC kolonlarından daha uzundur.



Şekil 4.4. Varian Prostar HPLC Sistemi ve ön saflaştırma işleminde kullanılan jel filtrasyon kolonu

Zehir ile çalışmadan önce molekül ağırlığı bilinen standartlarla aynı koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar ile bir grafik çizilerek denklem oluşturulmuştur [136]. Bu denklemden faydalanarak istenilen pikin molekül ağırlığı hesaplanabilir. Molekül ağırlığı bilinen standart proteinler olarak karbonik anhidraz (29000Da), ribonükleaz A (13700Da) ve aprotinin (6500Da) kullanılmış ve bunların karışımı ile test deneyi yapılmıştır. Standart eğri çizilerek molekül ağırlığı bilinmeyen bir protein ya da peptidin molekül ağırlığının hesaplanmasına zemin hazırlanmıştır. Bu işlem zehir ile yapacağımız kromatografi çalışmalarına hazırlık olarak yapılmıştır.

Örneklerin Jel Filtrasyon Kromatografisi İçin Hazırlanması: Önceden sağılarak liyofilize edilmiş akrep zehri mobil faz içerisinde çözülerek, 15 dakika 15 000 g'de santrifüje edilmiştir, supernatan temiz bir tüpe dikkatlice alınmıştır. HPLC'ye 50 µL yüklenmiştir. Analiz Çizelge 4.2.'de verilen metot parametrelerine göre gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında fraksiyonlar manuel olarak toplanmıştır.

Çizelge 4.2.Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan metot parametreleri

Sistem:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC- Varian Prostar)
Mobil Faz:	%10 (v/v) asetonitril, %0,1 (v/v) trifluoroasetik asit (TFA)
Dedektör:	UV
Absorbans:	210 nm ve 280 nm
Kolon:	TSK 2000SW size-exclusion chromatography (SEC) column (7.5 × 600 mm, 12.5 nm pore size, 10 µm particle size)
Akış Hızı:	0,5 mL/dak
Yükleme hacmi:	50 µl

İstenilen aralıktaki <10kDa- pik fraksiyonu manuel olarak toplanmış ve analiz sonrası dondurularak liyofilize edilmiştir; -80°C de kullanıma kadar saklanmıştır. Jel filtrasyon kolonu önerildiği şekilde kullanılmadığı dönemde %20 etanol geçirilerek saklanmıştır.

4.4.3. Ters-Faz Sıvı Kromatografisi

İkinci aşamada, jel filtrasyon kolonundan toplanan peptit fraksiyonu, ters faz sıvı kromatografi kolonundan geçirilmiş, peptitler polaritelerine göre ayrıştırılmış ve fraksiyonlar toplanmıştır. Böylece zehir yapısındaki peptitler birbirlerinden biraz daha ayrılmıştır [114], [137].

Ters-Faz Sıvı Kromatografi İçin rnek Hazırlanması: Liyofilize haldeki peptit fraksiyonu 200 µl özelti A içinde çözölerek santrifüje edilmiştir. Her deney öncesi Bradford testi ile protein miktar tayini yapılmıştır.

- Çizelge 4.3.'de verilen metot parametrelerine göre analiz gerçekleştirilmiştir.
- Fraksiyonlar her deneyde manuel olarak toplanmıştır, belirgin olarak 6 ana fraksiyon toplanmış ve analiz sonrası hemen liyofilize edilerek -80°C de saklanmıştır.
- Fraksiyonlar biyoaktivite testlerinde kullanılmak üzere çoklu runlar halinde birleştirilip liyofilize edilmiştir. Aktivite testlerinde kullanılırken, konsantrasyon tayini nanodrop ile 230 nm'deki absorbans okunarak yapılmıştır.
- Gradyent arttıkça asetonyril ve suyun karışımından doğan saçılımları engellemek için He gazı ile gaz alma (degassing) yöntemi kullanılmıştır.
- Ayrıca, kromatografi deneylerinde her analiz öncesi taze hazırlanan çözücüler 15 dakika su banyosunda bekletilerek gazı alınmıştır.
- Kolon önerildiği şekilde kullanılmadığı dönemde %50 metanol geçirilerek kaldırılmıştır.

Çizelge 4.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Metot Parametreleri

Sistem:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC- Varian Prostar)
Mobil Faz:	A: %0,1 trifluoroasetik asit (TFA), dH ₂ O B: %0,1 trifluoroasetik asit (TFA), Asetonitril
Gradient:	%60 lineer asetonitril gradiyenti kullanılmıştır.
Dedektör:	UV
Absorbans:	210 nm ve 280 nm
Kolon:	Vydac C18
Akış Hızı:	0,7 mL/dak
Yükleme hacmi:	50 µl

4.4.4. Elektroforetik Analiz

Zehir karakterizasyonu için, üç farklı elektroforetik ayırım yöntemi kullanılmıştır.

- Ham zehir ve jel filtrasyon kolonundan toplanan peptit fraksiyonu öncelikle Glisin-SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile elektroforetik olarak ayrılmıştır [138]. Ham zehirde peptit ve protein açısından genel profili görmek amacıyla, toplanan peptit fraksiyonunda ise molekül ağırlık aralığının doğrulanması ve yoğunlukla hangi molekül ağırlığında peptitlerin bulunduğu saptanması amaçlanmıştır.
- Peptit fraksiyonu için, klasik SDS-PAGE ile iyi bir sonuç alınamamıştır, küçük peptitlerin bu sistemde görülmesi oldukça zordur. Bu nedenle, peptitler için daha uygun olan Tris-Trisin SDS-PAGE protokolü uygulanmıştır [139]. Bu protokol 1-100 kDa aralığındaki proteinlerin elektroforezle ayırımında etkili bir şekilde kullanılır. Trisin glisine göre daha fazla negatif yüke sahip olduğundan hızlı göçe izin verir. Trisinin sahip olduğu yüksek iyonik kuvvet, daha fazla iyon hareketi-daha az protein hareketine neden olur. Bu da, düşük molekül ağırlıklı proteinlerin daha düşük yüzdedeki akrilamid jellerinde ayırımına izin verir. Dithiothreitol ve üre gibi yüksek konsantrasyonda denatürasyon ajanları kullanılır. Deterjan (SDS) ise daha düşük konsantrasyondadır. Eklenen üre de daha keskin bantlar elde edilmesini sağlamaktadır.
- Üçüncü bir teknik olarak da, daha hassas ve etkin olarak çip üzerinde elektroforez yapılmasına olanak tanıyan Bioanalyzer (MikroKapilerElektroforez) sistemi kullanılmıştır. Mikroakışkan teknolojisi ile çalışan bu alet, çip üzerinde elektroforez ve hücre çalışmaları yapmayı sağlar [140]. Her çip ile 10-12 örnek çalışma imkanı vardır. Çipte örnek kuyucukları, jel kuyucukları ve kanallar mevcuttur. Kanallara basınçla jel basılır ve elektroforetik ortam yaratılır. Ayırım molekül ağırlığına göre olmaktadır (SDS PAGE sistemi). Jelde yürüyen proteinler lazerli sistem ile saptanır. Veri pikler halinde alınır (elektroferogram) ve yazılım jel

(pseudogel) görüntüsü oluşturur. Boya ve boyadan arındırma çip üzerinde gerçekleşir.

4.4.4.1. Glisin SDS PAGE

Kullanılan Çözeltiler:

Yürütme Çözeltisi: 30,3 g Tris base, 144,1 glisin, 10 g SDS tartılır. 1 Litre distile su içerisinde hazırlanır. Kullanılmadan önce 1:10 (v/v) oranda seyreltilir.

%10 APS: 1 g APS, 10 mL bidistile su içerisinde çözülür. Taze olarak hazırlanmalıdır.

%30 akrilamit/bisakrilamit çözeltisi: 120 mL % 40 akrilamit çözeltisine 1.65 g bisakrilamit ve 45 mL bidistile su ilave edilir. Çözöldükten sonra 4°C'de saklanmalıdır.

1,5 M Tris-HCl çözeltisi: 27,23 g Tris Base 80 mL bidistile su içerisinde çözöülür. 6 N HCl ile pH 8.8'e ayarlanır. Son hacim 150 mL'ye tamamlanır.

0,5 M Tris-HCl çözeltisi: 6 g Tris Base 60 mL bidistile su içerisinde çözöülür. pH 6 N HCl ile 6.8'e ayarlanır. Son hacim 100 mL'e tamamlanır.

Yükleme tamponu: 950 µL BIORAD trisin yükleme tamponu, 50 µL β-merkaptoetanol ile karıştırılır. Küçük hacimlerde ependorflara bölüştürölerek -20 °C'de saklanır.

Coomasie Blue R250 Boyama çözeltisi: 0,25 g Coomasie Blue, 10 mL glasiyel asetik asit ve 90 mL 1:1 (v/v) oranında Metanol/Distile su içerisinde çözöülür. Oda sıcaklığında saklanır.

Boya Açma Çözeltisi: 50:40:10 (v/v/v) oranında su/metanol/asetik asit karışımı hazırlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Protokol:

1. Elektroforez sistemi kurulmadan önce camlar etil alkol ile silinmelidir.

2. Camların temiz ve çizik olmadığından emin olduktan sonra jel dökme sistemi kurulur, camlar takılır. Sızıntı olmadığından emin olduktan sonra devam edilir.
3. % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi taze olarak hazırlanır.
4. İki adet %10'luk ayırıcı jelin hazırlanması için 15 mL'lik falkon tüpe sırasıyla 4,13 mL bidistile su, 3,3 mL %30 akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, SDS içeren 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl tampon çözeltisi eklenir.
5. Polimerleşme reaksiyonu için son olarak 75 µL %10 APS ve 25 µL TEMED ilave edilir ve seri bir şekilde hazırlanan çözelti camların arasına dökülür.
6. Camlar arasında baloncuk oluşumunu engellemek, hava ile teması kesmek ve polimerleşmeyi hızlandırmak için izopropanol ilave edilir. Polimerleşmenin tamamlanması için 30 dakika beklenir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra izopropanol kaba süzgeç kağıdına emdirilerek uzaklaştırılır.
7. % 4'lük istifleme jelinin hazırlığı için sırasıyla 3 mL bidistile su, 700 µL % 30 akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, SDS içeren 1,25 mL 0.5M Tris-HCl tampon çözeltisi eklenir.
8. Ayırıcı jelle benzer şekilde polimerleşmenin gerçekleşmesi için 45 µL %10 APS ve 25 µL TEMED ilave edilir. Seri bir şekilde hazırlanan bu çözelti ayırıcı jelin üzerine dökülür, kuyucukların oluşması için tarak takılır ve 30 dakika polimerleşmenin tamamlanması için beklenir.
9. Polimerleşmesi tamamlanan jel kasetle birlikte yürütme tankına takılır. Tank glisin ve SDS içeren yürütme tamponu ile doldurulur.
10. Yüklenecek örnekler β-merkaptoetanol içeren yükleme tamponu ile hacimce 1:1 oranda karıştırılır. 95°C'de 5 dakika denatüre edilir. Hazırlanan örnekler ve standart protein çözeltisi 5 µg'dan az olmayacak hacimde kuyucuklara yüklenir.
11. Örnekler %4'lük istifleyici jeli geçene kadar sabit 100 V'da, geçtikten sonra ise sabit 150 V'da yürütülür.
12. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra bantların görüntülenmesi Coomassie Blue R250 ile boyama gerçekleştirilir [141].

4.4.4.2. Trisin SDS PAGE

1. Tris-trisin SDS jel elektroforezi, Schagger tarafından verilen prosedürlere göre gerçekleştirilmiştir [139].
2. Farklı yüzde ve içerikte üç jel tabakası kullanılmıştır. Bunlar aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla 6 M üre ile %16 ayırıcı jel,%10 boşluk jel, %4 istifleme jeli.
3. 6 M üre ile %16 ayırıcı jel çözeltisi, Çizelge 4.4'e göre stok çözeltilerden hazırlandı ve polimerizasyondan önce, daha önce işaretlenmiş seviyelerine göre cam arasına dökülür.
4. Düz bir yüzey temin etmek üzere jel üzeri izopropanol ile kapatıldı. Tam polimerizasyon için yeterli olan 30 dakikadan sonra, izopropanol uzaklaştırıldı.
5. % 10 boşluk jel çözeltisi Çizelge 4.4'e göre hazırlandı ve hızlı bir şekilde polimerize %16 jel üzerine döküldü. Yüzeyini düzleştirmek için izopropanol eklendi. 30 dakika inkübasyondan sonra, izopropanol uzaklaştırıldı.
6. % 4 istifleyici jel de yine aynı şekilde hazırlanarak döküldü. 10 kuyucuklu tarak jel üzerine yerleştirildi ve istifleyici jel içine doğru itildi.
7. 45 dakika inkübasyondan sonra, tarak çıkarıldı ve jeli tutan cam çifti jel dökme aparatından ayrılarak elektroforez tankı içine yerleştirildi. Elektroforez hücresinin iç bölmesi katod tamponu ile, dış bölme ise anot tamponu ile tamamen dolduruldu.
8. 5 µg protein içeren 5 µL örnek, % 5 2-merkaptolanol içeren Bio-Rad Trisin Sample Buffer ile karıştırıldı (1:1) ve elde edilen 10 µL numune karışımı ısıtıcı blokta 95° de 5 dakika denatüre edildi. Tüpler 10 saniye süreyle mikro spinnerda santrifüje edildi ve kuyucuklara yüklendi.
9. Örnekler istifleyici jeli geçene kadar sabit 15 mA/jel'de, analiz sonuna doğru 35 mA/gel de yürütüldü.
10. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra bantların görüntülenmesi gümüş boyama ile gerçekleştirildi.

Kullanılan Çözeltiler

%10 SDS Çözeltisi:

- 50 g SDS tartılıp 500mL dH₂O içinde çözülür. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3X Jel Tamponu: 3 M Tris Base, 1 M HCl, %0,3 SDS, pH: 8.45

- 363.2 g Tris Base 600 mL dH₂O çözülür.
- 30 mL %10 SDS eklenir.
- 86,2 mL %37 HCl eklenir.
- Hacim 1 Lye tamamlanır.
- pH kontrol edilir.
- Oda sıcaklığında saklanır.

1X Anot Tamponu

- 12,11 g Tris Base 800 mL dH₂O da çözülür.
- %37 HCl ile pH 8.9 a ayarlanır.
- Hacim 1 Lye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

1X Katot Tamponu

- 12,11 g Tris Base
- 17,92 g Trisin
- 10 mL %10 SDS Çözeltisi
- Hacim 1 Lye tamamlanır (pH: 8.25).
- Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Akrilamid / Bisakrilamid 3 (AB-3) Stok Çözelti

- 48 g Akrilamid + 1,5 g of Bisakrilamid 100mL dH₂O da çözülür.

Akrilamid / Bisakrilamid 6 (AB-6) Stok Çözelti

- 46,5 g of Akrilamid + 3 g of Bisakrilamid 100mL dH₂O da çözülür.

Trisin Örnek Tamponu

- % 2 β -merkaptotanol
- 20 μ L β -merkaptotanol + 950 μ L BioRad Trisin Örnek Tamponu

Çizelge 4.4 Jel Çözeltilerinin Stok Çözeltilerden Hazırlanması

		% 4 İstifleyici Jel	% 10 Boşluk Jel	%16 Ayırıcı Jel
AB-3 Çözeltisi	mL	0,33 / 0,4	1 / 1,2	-
AB-6 Çözeltisi	mL	-	-	3,3 / 3,8
Jel Tamponu (3X)	mL	1	1,67	3,3
Üre	g	-	-	3,6 *
Son Hacim (Su ile)	mL	4	5	10
polimerizasyon **				
APS (%10)	µL	30	25	35
TEMED	µL	6	5	7

★ Üreyi çözmek için , jel karışımı su banyosunda ısıtılır ve vorteks ile karıştırılır.

★★ Jeller dökülmeden önce, son olarak APS ve TEMED eklenir.

Gümüş Boyama:

Protein bantlarını gözlemek için gümüş boyama yapıldı. Elektroforezden sonra, jel döküm camından çıkarıldı ve istifleme jeli kesildi. Elde edilen jel, jel sabitleme çözeltisi ile dolu bir plastik tepsi üzerine yerleştirildi ve 4 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Jel sabitleme çözeltisi uzaklaştırılarak jel %50 etanol çözeltisi ile üç kez-her biri 20 dakika-yıkandı. % 50 etanol çözeltisi uzaklandıktan sonra jel ön-muamele (pre-treatment) çözeltisi ile 1 dakika işleminden geçirildi. Ön-muamele çözeltisi uzaklaştırılarak jel dH₂O ile üç kez-her biri 20 saniye-durulandı. Gümüş nitrat çözeltisi jel üzerinde ilave edildi ve 20 dakika inkübe edildi. Gümüş nitrat çözeltisi döküldü ve jel her biri 20 saniye süreyle dH₂O ile üç kez durulandı. Developing Çözeltisi (Çizelge 4.5.) ilave edildi ve jel bantları gözlemlendi. Yaklaşık olarak 1-2 dakika sonra, bantlar görünür hale geldi. Jel hemen dH₂O ile 3 kez durulandı ve durdurma solüsyonu (Çizelge 4.5.) içine yerleştirildi. Jel görüntüleri Vilber Lourmat jel dökümantasyon Sistemi (Fransa) tarafından elde edildi.

Çizelge 4.5. Gümüş Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması

<i>Jel Sabitleme Çözeltisi</i>	<i>% 50 Etanol Çözeltisi</i>
150 mL metanol 36 mL asetik asit 150 µL formaldehit 114 mL dH ₂ O Oda sıcaklığında muhafaza edilir.	500 mL etanol 500 mL dH ₂ O Oda sıcaklığında muhafaza edilir.
<i>Ön-Muamele Çözeltisi</i>	<i>Gümüş Nitrat Çözeltisi</i>
50 mg sodyum tiyosülfat dH ₂ O ile çözülerek son hacim 200 mL'ye tamamlanır, oda sıcaklığında muhafaza edilir. Kullanımdan önce taze hazırlanır.	500 mg gümüş nitrat 188 µL formaldehit dH ₂ O ile son hacim 250 mL ye tamamlanır, taze hazırlanır.
<i>Developing Çözeltisi</i>	<i>Durdurma Çözeltisi</i>
5.625 g potasyum karbonat 5 mL ön muamele çözeltisi 188 µL formaldehit dH ₂ O ile son hacim 250 mL tamamlanır. Kullanımdan önce taze hazırlanır.	200 mL Metanol 30 mL Asetik asit 170 mL dH ₂ O Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

4.4.4.3. Biyoanalizör (MikroKapilerElektroforez)

Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi ve Protein 80 kiti kullanılarak zehrin analizi yapıldı. Bu kit, 5-80 kDa büyüklüğündeki proteinlerin ayırımı için uygundur. Deney kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi [140]. Jel matriksi, boya, örnek tamponu ve ladder kit içerisinde mevcuttur. Proteinleri denatüre etmek ve sadece molekül ağırlıklarına göre jelde yürümelerini sağlamak amacıyla denatürasyon ajanları (DTT ve β -merkaptotanol) kullanıldı.

4.4.5. Kütle Spektrometresi

Zehrin yapısında bulunan peptitlerin kütlelerini belirlemek ve zehrin peptit fraksiyonunun moleküler kompozisyonunu saptamak amacıyla kütle spektrometre teknolojisi kullanıldı. Bu aşamada iki farklı cihaz ile iki farklı metot kullanıldı.

4.3.5.1. LC/MS/TOF Sistemi İle Yapılan Fingerprinting Analizi

Zehir peptit fraksiyonu Agilent marka 1200/6530 model LC/MS/TOF cihazında (UNAM, Bilkent Üniversitesi'nde) analiz edildi.

Çizelge 4.4. LC/MS/TOF metot parametreleri

Mobil Faz:	A Çözeltisi: Su içerisinde % 0.1 Formik Asit B Çözeltisi: Asetonitril içerisinde % 0.1 Formik Asit									
Kolon:	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 µ m)									
Analiz Süresi:	90 dk									
Akış hızı:	0,7 ml/dk									
Mode:	Pozitif iyonizasyon									
m/z range:	100-3200									
Kapiler Voltaj:	5000 V									
Lineer gradient:	<table><thead><tr><th><u>Dakika</u></th><th><u>A</u></th><th><u>B</u></th></tr></thead><tbody><tr><td>0.01</td><td>% 100</td><td>% 0</td></tr><tr><td>90</td><td>% 40</td><td>% 60</td></tr></tbody></table>	<u>Dakika</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	0.01	% 100	% 0	90	% 40	% 60
<u>Dakika</u>	<u>A</u>	<u>B</u>								
0.01	% 100	% 0								
90	% 40	% 60								

Örnek Hazırlama: Liyofilize haldeki kuru peptit fraksiyonu (jel filtrasyon kolunundan toplanan fraksiyon) buffer A (%0.1 formik asit-dh₂O) ile çözülmüştür.

Otomatik örnekleyiciye konulan örnek, kolona yüklendi ve ESI iyonizasyon modülü ile analiz edildi. Çizelge 4.4.'de metot parametreleri sunulmuştur. Veriler MassHunter Workstation Qualitative Analysis yazılımı kullanılarak analiz edildi, zehirde bulunan peptitlerin kütleleri, kazadıkları yükler dikkate alınarak saptandı.

4.4.5.2. MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon-Uçuş Süresi) Sistemi İle Yapılan Fingerprinting Analizi

Fingerprinting ile daha fazla peptit kütlesi belirleyebilmek amacıyla zehir peptit fraksiyonu bir de MALDI-TOF-MS sisteminde analiz edilmiştir.

Örneğin Hazırlanması ve Analizi:

1. Liyofilize peptit fraksiyonu, 100 µl % 50 asetonitril, %0,1 TFA içinde çözüldü.
2. Peptit karışımı eşit hacimde α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) (60% asetonitrile ve %0,3 TFA içinde) karıştırılmış ve plak üzerine dry-droplet metodu ile spotlandı.
3. Kütle spektrometri analizi MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) (Micromass, Waters, UK) sisteminde pozitif iyon modunda yapıldı.
4. B zinciri oksitlenmiş sığır insulini (monoisotopic mass = 3494.6513 Da) kullanılarak oluşturulan dış kalibrasyon uygulandı. Datalar MassLynx 4.0 (Waters) yazılımı ile işlendi.

4.4.6. Biyoinformatik Çalışmaları

İyon kanalları çeşitli alt tiplere ayrılarak karakterize edildi. Literatürden faydalanarak bir biyoinformatik çalışması yapıldı ve hedef iyon kanal tipi seçildi. Bu amaçla, Uniprot veri tabanından faydalanıldı [45]. Uniprot sayfasında, “Scorpion peptides” anahtar kelimeleri ile tarama yapılmış ve elde edilen sonuçlar da yine tek tek incelenerek, iyon kanal inhibitörü olanların tiplerine göre sayıları belirlendi. Çalışma manuel olarak yapılmıştır. Akrep zehirlerinin en yaygın hedefi olan K iyon kanalı belirlenerek, K iyon kanalı testi ve sitotoksisite testlerinde kullanılmak üzere uygun hücre hattı seçildi.

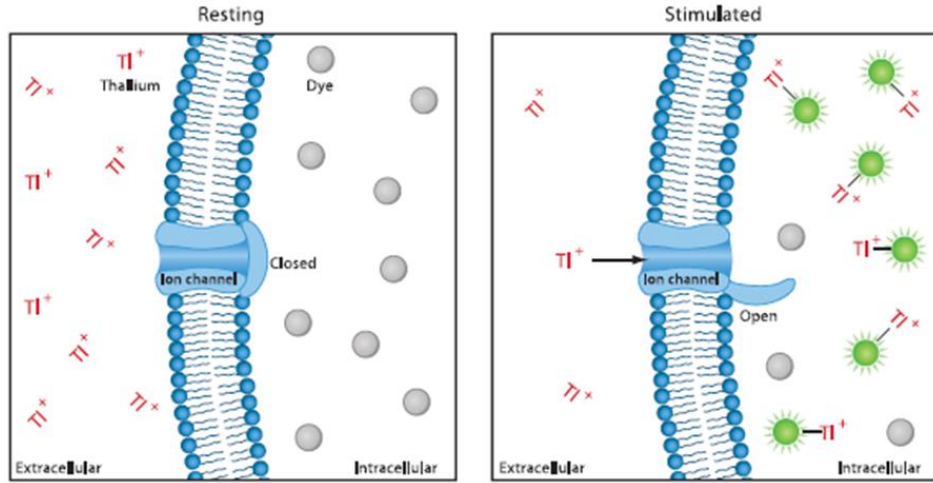
4.4.7. Biyoaktivite Testleri

4.4.7.1. Potasyum İyon Kanal Testi

Potasyum iyon kanalı aktivitesi, potasyum iyonunun yerine geçen Tl^+ iyonunun akışıyla gözlemlendi. Tl^+ akışı için FluxOR Potasyum İyon Kanal Testi (İnvitrogen)

kullanıldı. Tl^+ temelli floresan test protokolün önerdiği doğrultuda gerçekleştirilmiştir [142]. Bu uygulamada, peptit fraksiyonu ile ters faz kolondan toplanan 6 fraksiyon kullanıldı.

Test Prensipleri: Potasyum iyon kanalları Tl^+ iyonları için de geçirgendir. Kanalları açan bir uyarı ile hücre-dışı çözeltiye talyum eklendiğinde, bu iyon konsantrasyon gradienti yönünde hücre içine doğru akar. Kanal ya da transportür aktivitesi sitozolik floresansı artıran indikatör bir boya ile saptanır. Ön floresan boya olan FluxOR, hücrelere yüklenir (Şekil 4.5). Talyum iyonları hücre zarından açık potasyum kanallarından hücre içine taşınır. Talyum iyonu FluxOR boyaya bağlandığında parlak bir floresan yayar (emission 525 nm, excitation 490 nm) [143].



Şekil 4.5. FluxOR Potasyum İyon Kanalı Testinin Çalışma Prensipleri

Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

- Yükleme Tamponu (toplam: 1500 μ L)

15 μ L PowerLoad Concentrate (Component C)

1.5 μ L FluxOR Reagent

1320 μ L ddH₂O

150 µL FluxOR Test tamponu (Component B)

15 µL Probenecid

- Test Tamponu (Toplam: 2500 uL)

2225 µL ddH₂O

250 µL FluxOR Test tamponu (Component B)

25 µL Probencid

- Uyarı Tamponu (Toplam: 500 µL)

200 µL ddH₂O

100 µL FluxOR klor içermeyen tampon (Component E)

100 µL K₂SO₄ konsantre (Component F)

100 µL TI₂SO₄ konsantre (Component G)

Test Protokolü

- Test, 96 kuyucuklu mikropakta gerçekleştirilir. Mikroplağın her bir kuyucuğu için 200.000 hücre (hücre hattı: Jurkat klon E6-1 hücreleri) olacak şekilde 100 µL/kuyucuk ekim yapıldı.
- Yükleme tamponu hazırlandı.
- Hücreler 480 rcf de santrifüj edildi ve besi ortamı uzaklaştırıldı (10% (v/v) fetal bovine serum ve %1 (v/v) Pen-Strep).
- Her kuyucuğa 80 µl yükleme tamponu eklendi ve 60-90 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
- Test tamponu, stimulus tamponu ve pozitif kontrol olarak kullanılan Klofazimin çözeltisi (20 µL 10 mM stoktan+ 380 µL Test tamponu: 1/20 : 500 µM) hazırlandı.
- 45 µl 500 µM Klofazimin + 405 µL test tamponu: 1/10 : 50 µM hazırlandı.
- Mikroplak 480 rcf de santrifüj edilir ve yükleme tamponu uzaklaştırıldı.
- Uygulama dozları ve test tamponu (her kuyucuğa 100 µL) eklendi ve 30 dakika inkübe edildi.
- Mikroplak okunarak baseline görüldü (30 saniye, 3 dak).
- Her kuyucuğa çok kanallı pipet yardımıyla hızlı bir şekilde 20 µL stimulus-uyarı tamponu(K₂SO₄ ve TI₂SO₄ içeren) eklendi ve (SpectraMax Paradigm

Multi-Mode Mikroplak Okuyucu-Molecular Devices, Sunnyvale, CA) floresan okuma yapıldı ve stimulus kaydedildi (5 dak, 10 saniye).

- İntegrasyon zamanı : 50 ms **Sıcaklık: 22-24°C
- Pozitif kontrol: Klofazimin (10 uM) Negatif kontrol: test tamponu
- Her deneyde her örnek için üç kopya çalışıldı.

4.4.7.2. Sitotoksisite Testi

Ham zehir ve peptit fraksiyonunun Jurkat hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri AlamarBlue® test kullanılarak araştırıldı. Hücrenin canlı olup olmadığı çeşitli yöntemler aracılığı ile izlenebilir. Plazma membran bütünlüğü, DNA sentezi, DNA içeriği, enzim aktivitesi, ATP varlığı gibi durumlar hücre canlılığı ve hücre ölümünün göstergeleri olarak bilinmektedir. AlamarBlue® testi metabolik aktiviteyi saptayan florometrik/kolorimetrik büyüme indikatörü içermektedir. Bu indikatör, besi ortamında hücre büyümesinden kaynaklanan kimyasal redüksiyona cevap olarak floresan ışımaya yapan ve renk değiştiren oksidasyon-redüksiyon indikatörüdür. AlamarBlue® hücre canlılığı reaktifi, kantitatif olarak çeşitli insan ve hayvan hücre hatları, bakteri, bitki ve mantarların çoğalmasını ölçmek için canlı hücrelerin indirgeme gücünü kullanır ve çeşitli kimyasal maddelerin göreceli sitotoksisiteleri hakkında fikir edinmemize olanak sağlar. Hücreler hayatta oldukları zaman, sitoplazmaları içinde indirgeyici bir ortam sağlarlar. AlamarBlue® reaktifinin aktif bileşeni olan Resazurin, mavi renkte ve floresan ve toksik olmayan bir bileşiktir. Bu bileşik hücre içine girdikten sonra, kırmızı renkli ve yüksek floresan özelliğine sahip olan resorufine indirgenir [144].

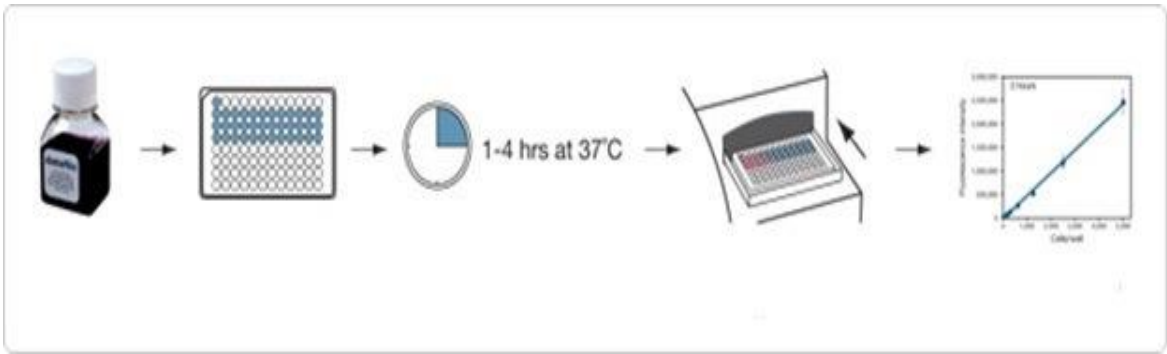
Hücre hattı: Jurkat Klon E6-1 hücreleri Pozitif Kontrol: 50 µM Klofazimin

Negatif Kontrol: hücre+medium+boya Kör: medium+boya

Test Protokolü

1) Deney şeffaf tabanlı siyah mikroplak üzerinde negatif kontrol, pozitif kontrol ve farklı konsantrasyonlarda uygulanacak örnekler göz önünde bulundurularak tasarlandı. Her bir parametre için en az üç tekrar yapıldı.

- 2) Her kuyucuğa 100.000 Jurkat hücresi ekildi.
- 3) Kuyucuklardaki Jurkat hücreleri üzerine son hacim 100 µL olacak şekilde, farklı konsantrasyonlarda pozitif kontrol (50 µM), ham zehir (0,5-1,0-2,0 mg/mL) ve peptit fraksiyonu (0,25-0,50-1,0 mg/mL) ilave edildi. Hücreler 37°C'de, % 5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi.
- 4) 24 saat sonunda kör ve kontroller dahil olmak üzere tüm kuyucuklara 10 µL Alamar mavisi eklendikten sonra 3 saat inkübatör içerisinde bekletildi.
- 5) İnkübasyon süresinin sonunda 565 nm uyarım, 595 nm emisyon basamaklarında floresans okuyucuda (SpectraMax Paradigm mikroplak okuyucu-Molecular Devices) okuma yapıldı.



Şekil 4.6. AlamarBlue® hücre canlılık test protokolü

4.4.7.3. Antimikrobiyal Aktivite Testi

Antimikrobiyal ve antifungal peptit aktivitesinin araştırılması için; *Staphylococcus aureus*-ATCC6538, *Escherichia coli*-ATCC25922 ve *Candida albicans*-DSMZ1386 standart mikroorganizmaları kullanıldı. Antimikrobiyal aktivite testi, 96 kuyucuklu polipropilen plaklarda gerçekleştirilmiş, ampisilin ve kanamisin pozitif kontrol olarak kullanılarak yapıldı. Ham zehir ve ters faz kolondan elde edilen 5 adet fraksiyon antimikrobiyal aktivite açısından test edildi. Ham zehrin ve HPLC fraksiyonlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri, büyüme inhibisyonunu belirleyecek şekilde,

sıvı besiyeri seyreltme metodu ile test edildi. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* suşları sırasıyla, Luria Bertani Broth (LB), Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Tripton Dekstroz Broth (TDB) agar plaklarda bir gece boyu üretildi. Üreyen koloniler sıvı LB, MHA ve TDB besiyerlerine ekilerek bir gece boyu 37°C'de inkübe edildi. Hazırlanan süspansiyonlar, 1:200 oranında uygun besiyeri ile seyreltilerek 37°C'de 3-4 saat ($OD_{600}=0,6$ olacak şekilde) inkübe edildi.

Uygun yoğunlukta üretilen kültürler 1:100.000 oranında seyreltildi. Liyofilize haldeki ham zehir ve peptit fraksiyonları su ile çözülerek 10 µL'si mikroplak kuyucuklarındaki 90 µL kültüre eklendi. Negatif kontrol olarak ddH₂O; pozitif kontrol olarak *S.aureus* için ampisilin, *E.coli* için kanamisin ve *C. albicans* için DMSO, kullanıldı. Mikroplak 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi ve Elisa okuyucuda 600 nm'de absorbans okunarak büyüme inhibisyonu sonuçları saptandı [114], [145].

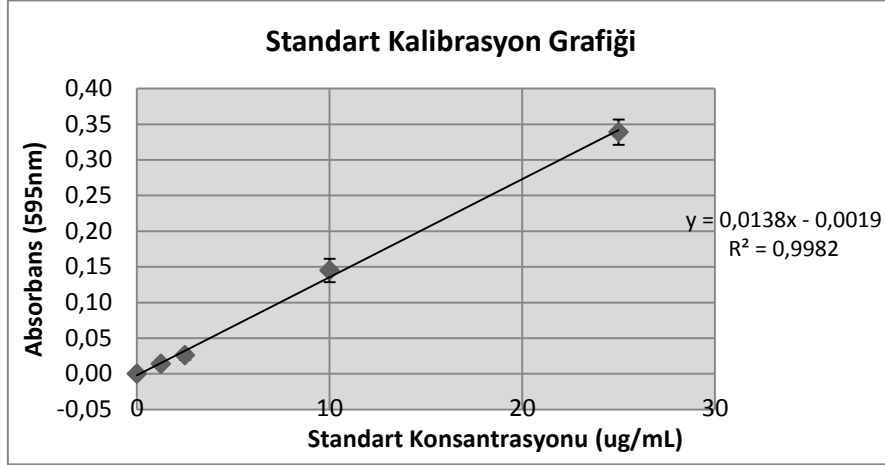
5.SONUÇLAR ve TARTIŞMA

5.1. *P.kraepelini* Zehrinin Protein İçeriği

Bradford testi protokolüne göre çizilen standart kalibrasyon grafiği Şekil 5.1’de verilmiştir. Grafiğin eğimini hesaplamak için Excel tabanlı grafikten yararlanılmıştır. Eğim çizgisi eklendikten sonra, grafik üzerinde $y = 0,0138x - 0,0019$ eşitliği belirlenmiştir (Şekil 5.1). Bu eşitlikten yararlanılarak farklı zamanlarda sağılmış ve liyofilize edilmiş üç ayrı ham zehir örneğinin konsantrasyonu x (konsantrasyon) örneğin absorbansına (y) göre “mg/ml” cinsinden hesaplanmıştır. Protein konsantrasyonları, dilüsyon faktörü ile çarpılarak 20-30 mg/ml arasında olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak ham zehirin protein konsantrasyonu kuru ağırlığa göre yaklaşık % 70 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.1. Protein içeriği için Bradford testi ile belirlenen standart kalibrasyon eğrisi verileri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbans (AU)	Ortalama	Standart Sapma
0	0,00	0,00	0,00
1,25	0,01	0,01	0,00
2,5	0,02	0,03	0,01
10	0,13	0,15	0,02
25	0,32	0,33	0,02

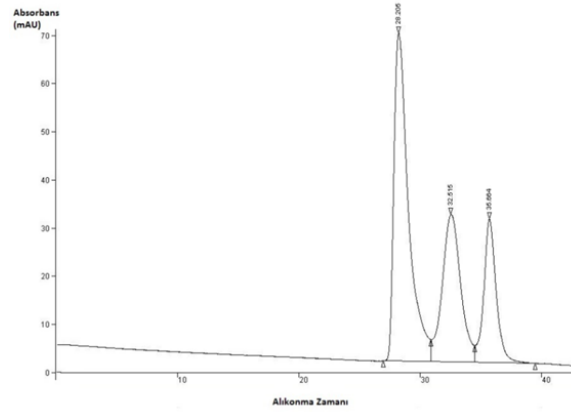


Şekil 5.1. Protein içeriğinin Bradford test ile belirlenen standart kalibrasyon grafiği. y: absorbans, x: konsantrasyon, R^2 : Hata değeri.

5.2. Kromatografi Sonuçları

5.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografisi Sonuçları

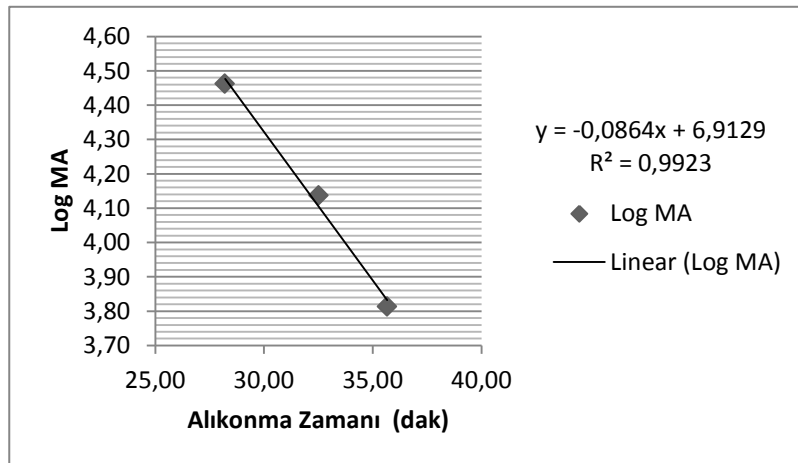
Ham zehirin ön saflaştırılması için kullanılan jel filtrasyon kromatografi tekniği, karışımlardaki bileşenleri molekül ağırlıklarına göre ayırmaktadır. Jel matriks kolonun gözenekli durağan fazını oluşturur. Daha büyük moleküller gözeneklere girmeden daha hızlı göç ederken, küçük moleküller gözeneklere takıldıkları için gecikmeli olarak kolondan daha sonra ayrılırlar. Bu nedenle, kolondan önce yüksek molekül ağırlığına sahip proteinlerin, arkasından peptitlerin, son olarak da küçük organik moleküller ve iyonların çıkması beklenmektedir. Bu işlem, ham zehir yapısındaki büyük molekülleri-proteinleri uzaklaştırabilmek için uygulanmıştır [114], [137]. Çalışmada hedeflenen moleküller olan peptitlerin molekül ağırlığı 10kDa dan küçüktür, bu nedenle zehir kolondan geçerken hedeflediğimiz aralıktaki peptitleri toplayabilmek için öncesinde molekül ağırlığı bilinen standartlarla analiz gerçekleştirilerek standart bir eğri oluşturulmuştur. Şekil 5.2., 5.3. ve Çizelge 5.2.'de standartlar ile elde edilen sonuçlar sunulmuştur.



Şekil 5.2. Referans standartlar ile jel filtrasyon kolonunda elde edilen kromatogram. Pikler sırasıyla, karbonik anhidraz, ribonükleaz A ve aprotinin'e aittir.

Çizelge 5.2. Referans standartların molekül ağırlıkları (MA), kolondan alıkonma zamanı ve hesaplanan logMA değerleri

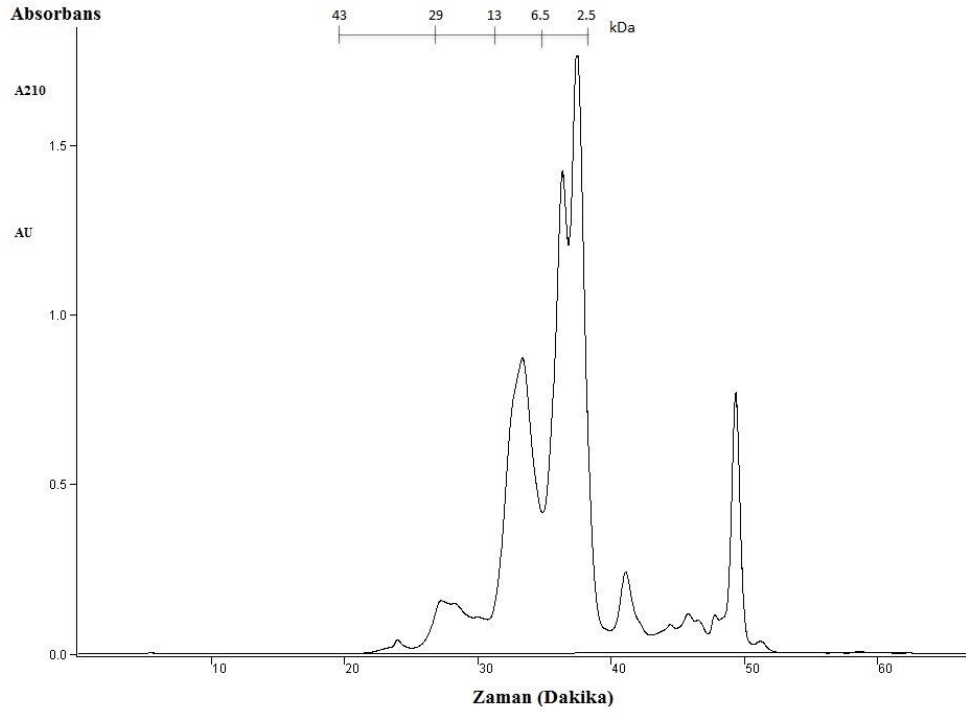
Standart	MA(Da)	Alıkonma Zamanı (dak)	Log MA
Karbonik Anhidraz	29000	28,21	4,46
Ribonukleaz A	13700	32,52	4,14
Aprotinin	6500	35,66	3,81



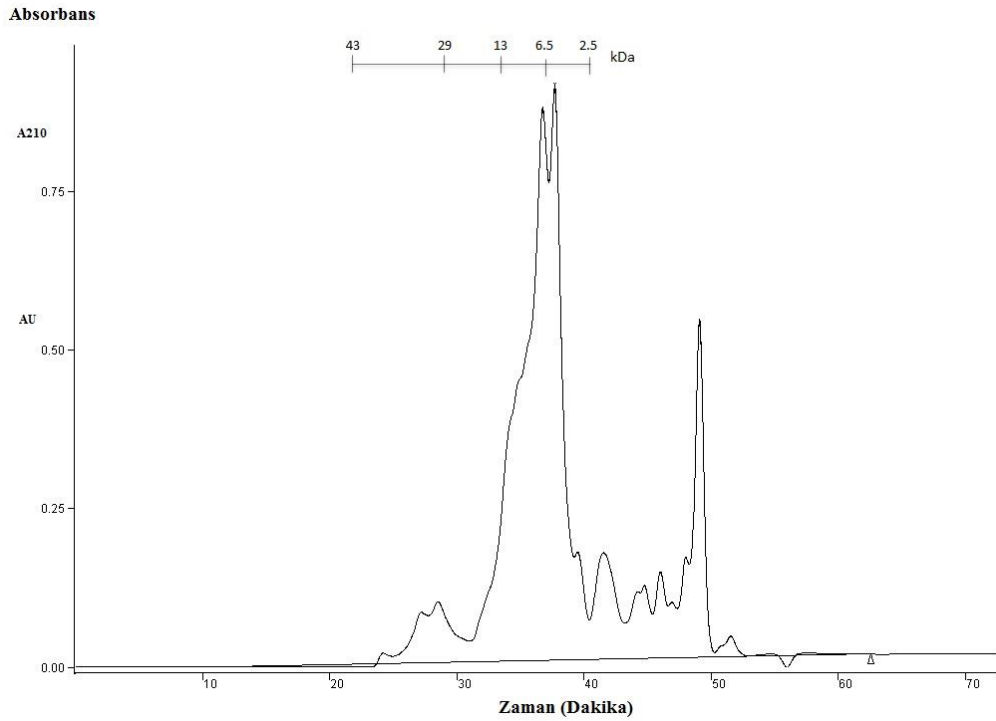
Şekil 5.3. Molekül ağırlık tayini için, jel filtrasyon kolonu için referans standartlar ile çizilen standart grafik. y: logMA, x:alıkonma zamanı R^2 : Hata değeri.

Standart grafikten faydalanarak istenilen molekül ağırlığına sahip peptitlerin kolondan hangi alıkonma zamanında (retention time) geleceği tahmin edilmiştir. Buna göre hedeflenen peptitler (<10kDa) 30-40.dakikalar arasında elüe olacaktır. Ham zehir ile yapılan jel filtrasyon kromatografisi sırasında bu sürelerde peptit fraksiyonu 15mL'lik falkon tüplere toplandı.

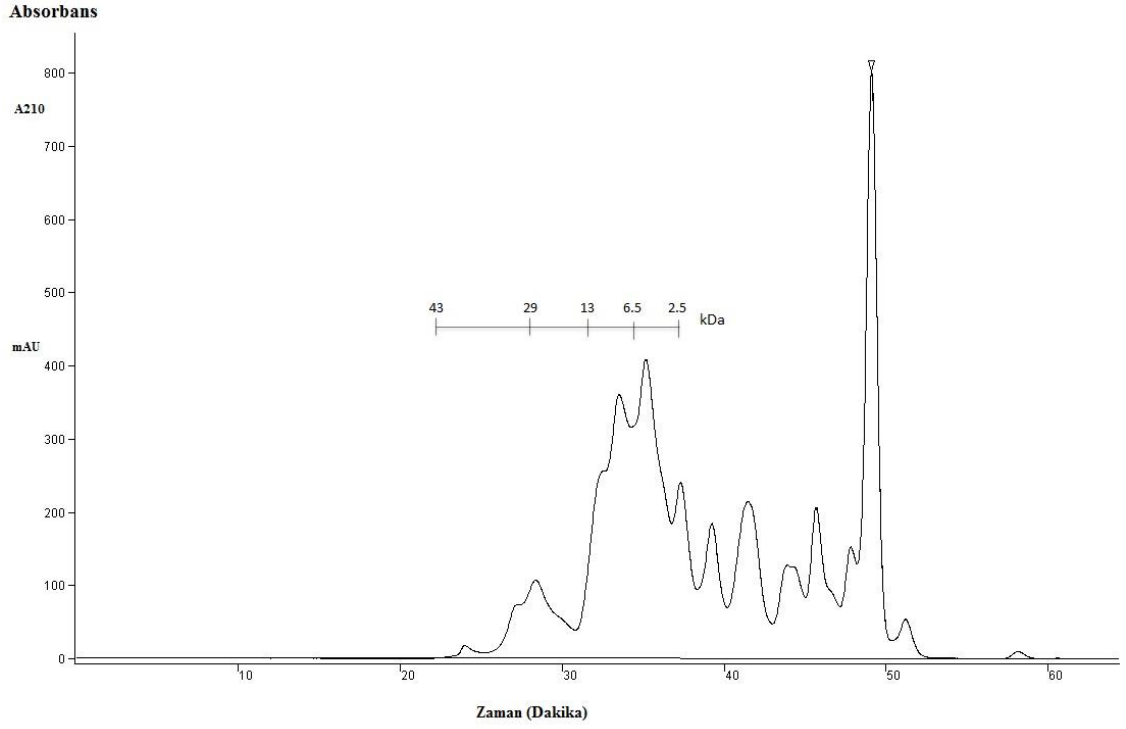
Ham zehrin jel filtrasyon kromatografisi ile analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar Şekil 5.4., 5.5, 5.6., 5.7., 5.8. ve 5.9.'da görülmektedir. Molekül ağırlığı standartları ile pik üzerinde ilgili noktalar belirtilmiştir. Beklendiği gibi, en büyük piki 10 kDa altında molekül ağırlığına sahip peptitlerin oluşturduğu gözlenmektedir. Farklı lokasyonlardan (Alanya, Taşatan, Avşallar, Gündoğmuş Akseki) toplanan akreplerden farklı zamanlarda sağımı yapılan zehirlerin jel filtrasyon ayrımı sonuçları farklı profiler vermiş olup, peptit miktarları da değişik bulunmuştur. Bununla birlikte, elde edilen ana pik, bizim ilgilendiğimiz alıkonma zamanına denk gelmiştir.



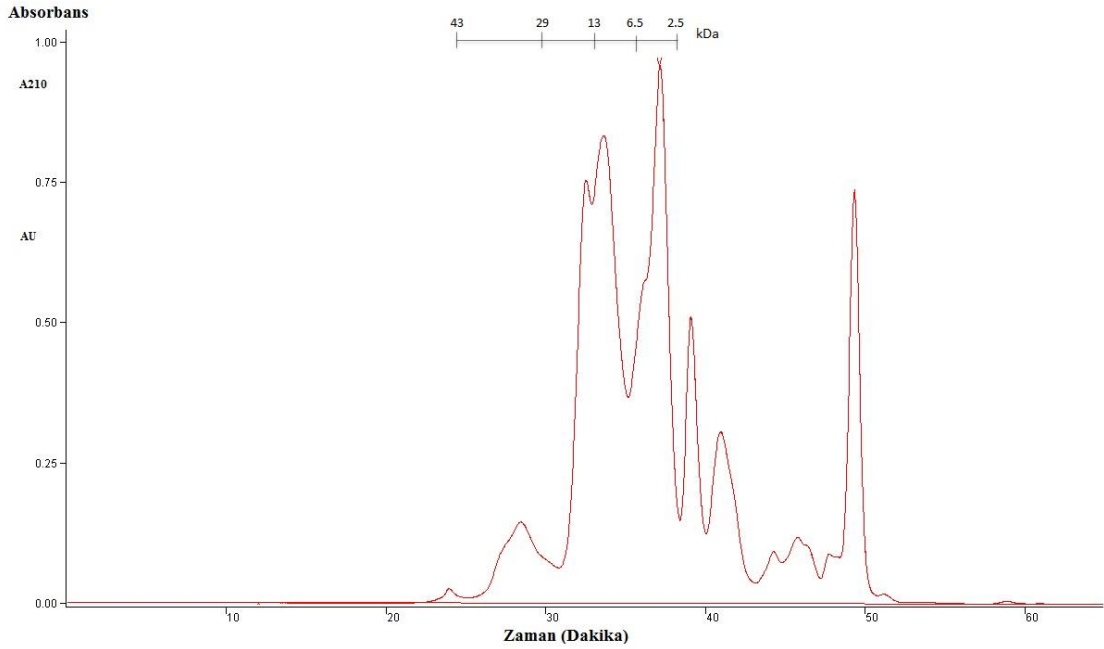
Şekil 5.4. *P.kraepelini* (lokasyon: Gündoğmuş-Akseki) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.



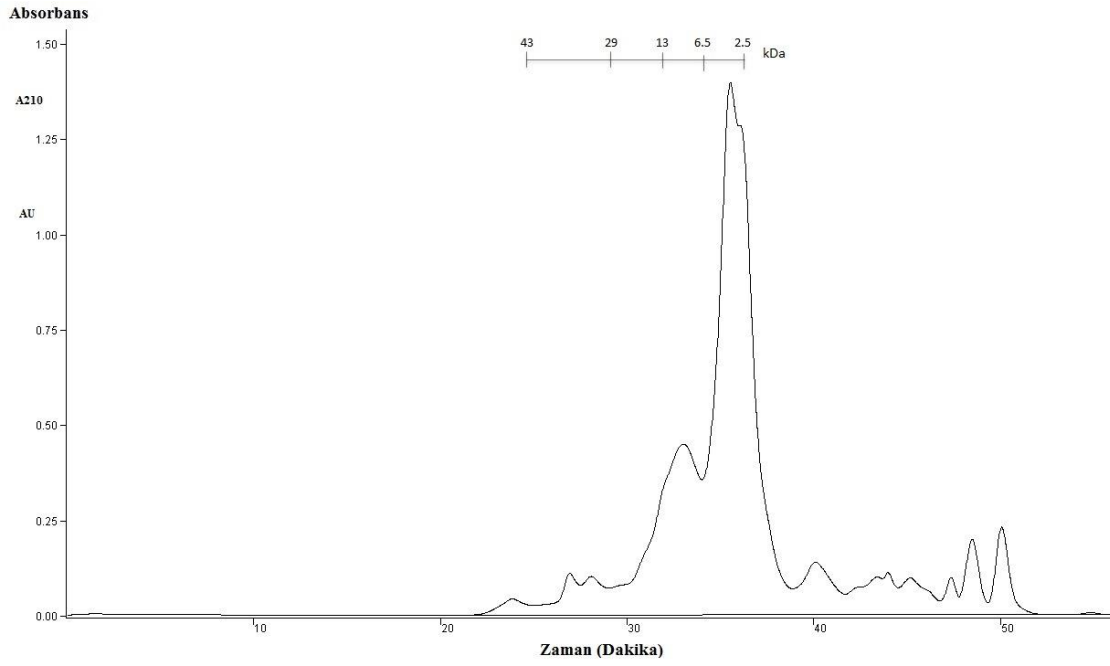
Şekil 5.5. *P.kraepelini* (lokasyon:Alanya) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.



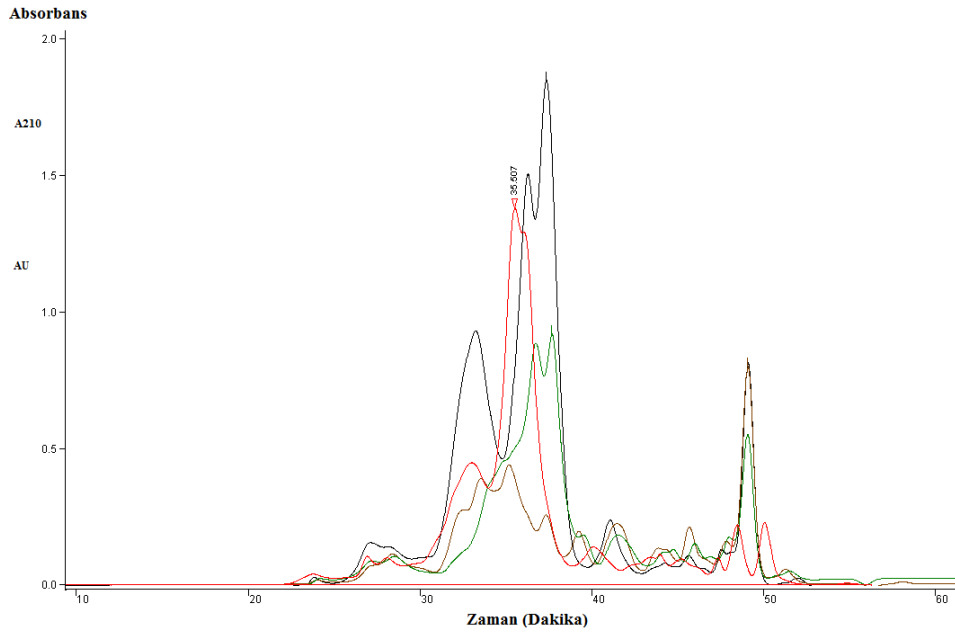
Şekil 5.6. *P.kraepelini* (lokasyon:Taşatan) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı



Şekil 5.7. *P.kraepelini* (lokasyon:Avşallar) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı.



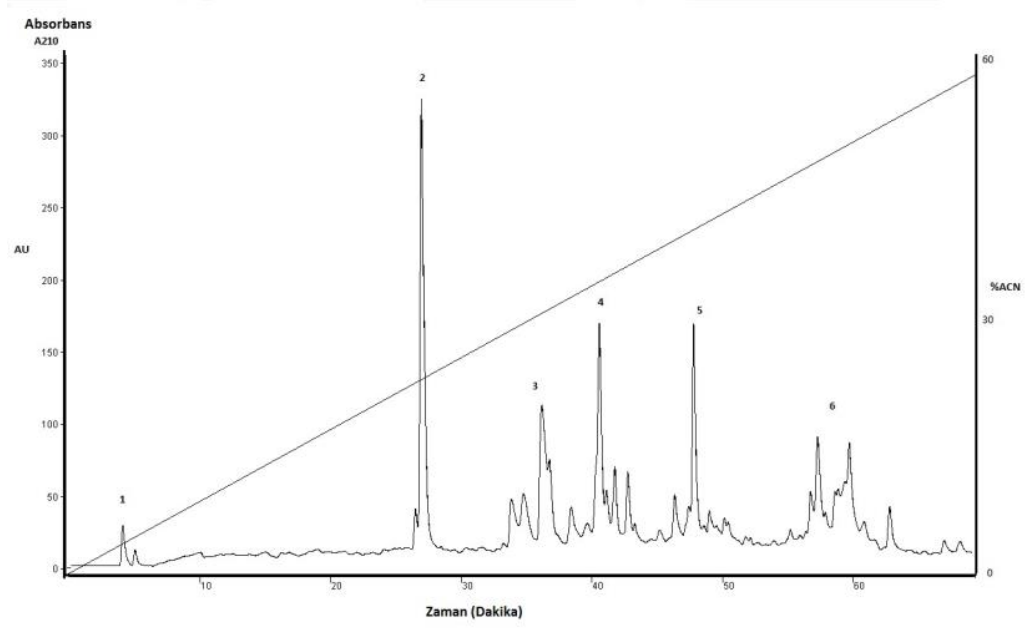
Şekil 5.8. *P.kraepelini* (lokasyon:Taşatan) ham zehirinin jel filtrasyon kromatogramı



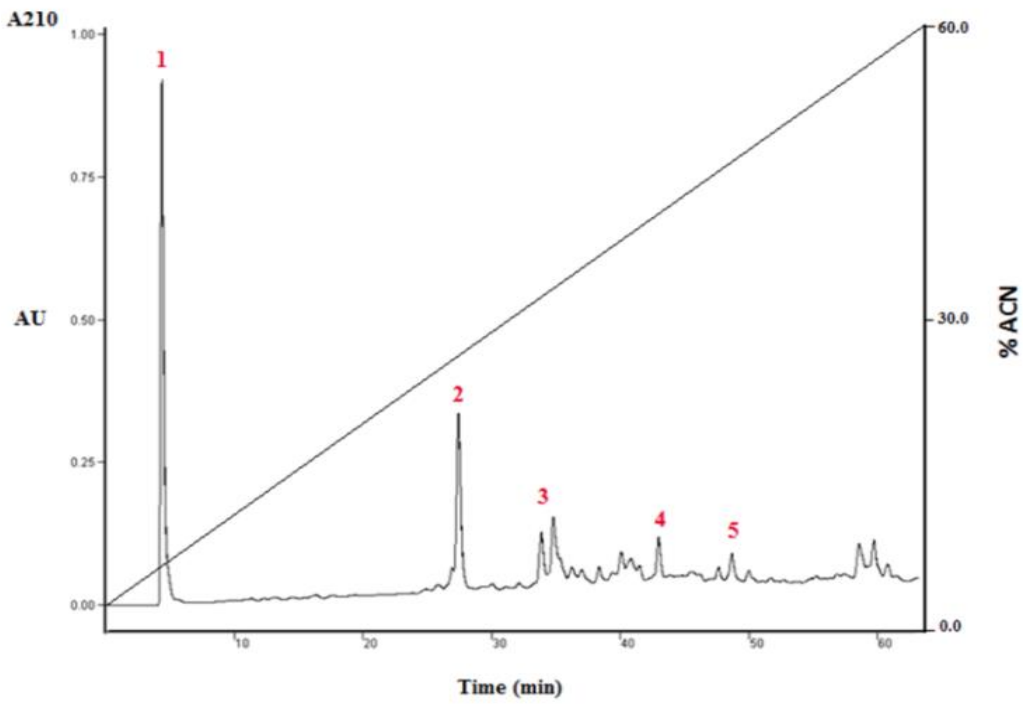
Şekil 5.9. Farklı lokasyonlardan toplanan *P.kraepelini*'lere ait zehirlerin jel filtrasyon kromatogramlarının karşılaştırılması.Hepsinde ana pikin 30-40.dakikalar arasında çıkan fraksiyona ait olduğu gözlenmektedir.

5.2.1.Ters Faz Kromatografi Sonuçları

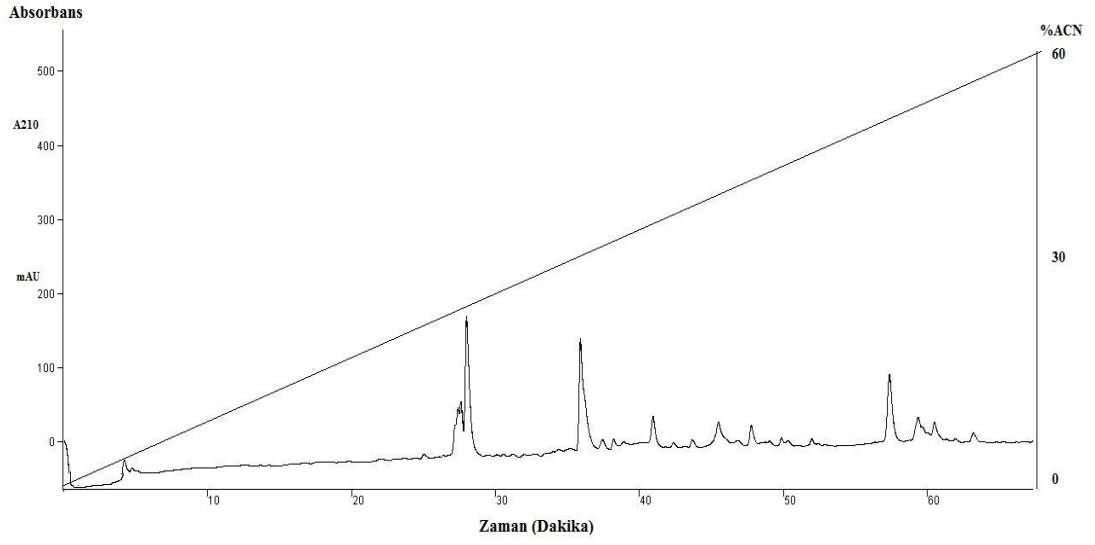
Daha önce belirtildiği gibi, akrep zehirlerinin kısa zincirli ve uzun zincirli peptid toksinlerinin bimodal dağılımı, peptid karışımının jel filtrasyon kromatografisi ile ileri fraksiyonlanmasını imkansız kılar. Ters faz sıvı kromatografi tekniği, aynı molekül ağırlığına sahip peptitlerin boyutlarına göre değil de, fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılmasını sağlayan değerli bir araçtır. Bu teknikte durgun faz olarak kullanılan, ters fazlı kolon C-18 matrisi bağlanma yüzeyleri sağlar ve mobil faz olan organik çözücünün artan gradiyenti ile moleküller seri olarak elüe olurlar. Prensipte olarak, daha hidrofilik moleküller gradientin düşük konsantrasyonlarında sabit fazdan ayrılırken daha hidrofobik olanlar kolondan daha geç çıkarlar. RP-HPLC sistemi ile, zehrin genel peptid kitlesindeki peptidleri bireysel ya da küçük gruplar halinde ayrımı gerçekleştirilmiştir. Jel filtrasyon kolondan toplanan peptid fraksiyonu ters fazlı kolona yüklenerek 90 dakika boyunca artan bir asetonitril gradiyenti ile *P.kraepelini* zehir peptidlerin HPLC-RP kromatogramı oluşturulmuştur. Sonuçta, 6 ana peptid grubu gözlenmiş ve belirgin olarak görülen piklere ait 6 fraksiyon toplanmıştır. Jel filtrasyon kromatografisinde de gözlemlendiği şekilde, farklı lokasyonlardan toplanan ve farklı zamanlarda sağımı yapılan akrep grupları arasında (Alanya, Taşatan, Avşallar, Gündoğmuş Akseki), ters faz kromatografisinde de, temel profilde büyük bir fark olmamakla beraber, farklı peptitlerin konsantrasyonlarında değişiklikler olduğu görülmüştür (Şekil 5.10., 5.11., 5.12., 5.13).



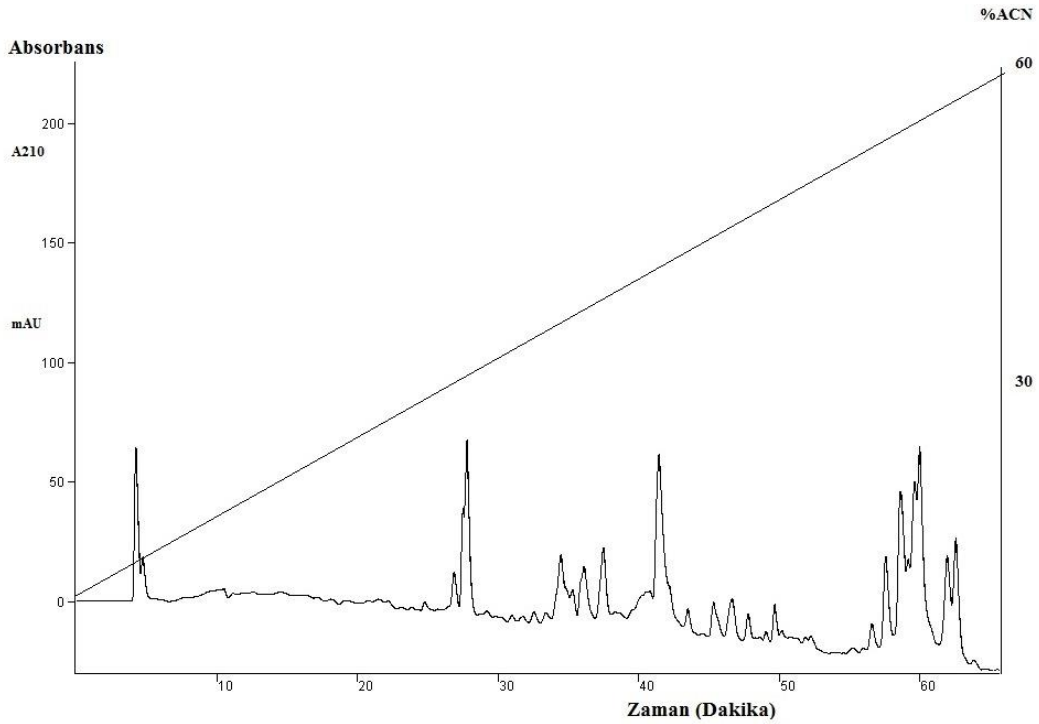
Şekil 5.10. *P.kraepelini* (lokasyon:Alanya) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.



Şekil 5.11. *P.kraepelini* (lokasyon:Gündoğmuş-Akseki) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.



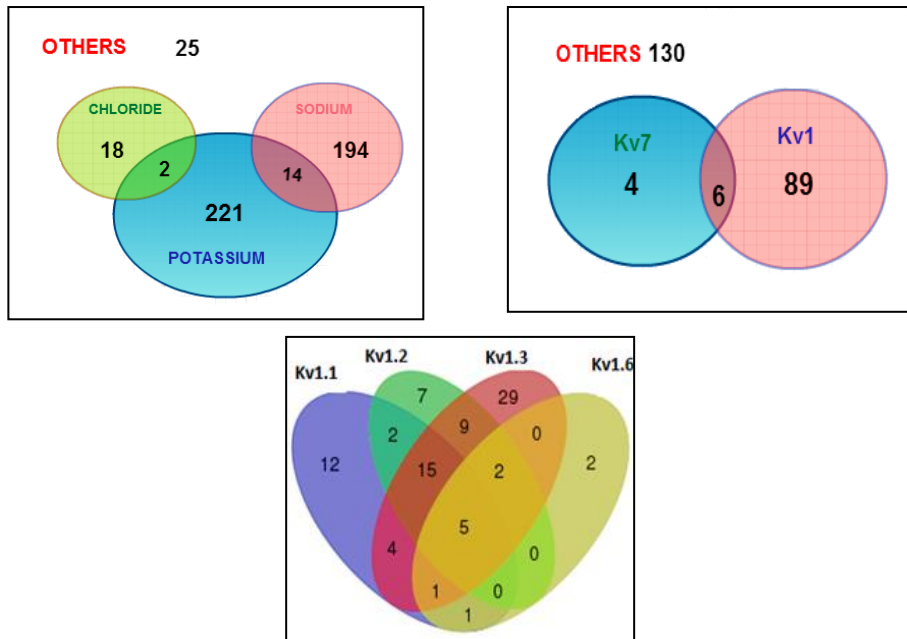
Şekil 5.12. *P.kraepelini* (lokasyon:Avşallar) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.



Şekil 5.13. *P.kraepelini* (lokasyon:Taşatan) zehir peptit fraksiyonunun ters faz kolondaki kromatogramı.

5.3. Biyoinformatik Çalışma Sonuçları

Biyoinformatik çalışması sonuçlarına göre, akrep zehirlerinin %50 si potasyum kanallarını hedeflemektedir. Potasyum kanallarını, sodyum kanalları izlemektedir. Potasyum kanalları içinde de Kv1 alt kanal tipinin daha çok hedeflendiği saptanmıştır. Voltaj bağımlı Kv1 iyon kanal tipinin de birçok alt tipi bulunmaktadır [111]. Bunlar arasından, Kv1.3 tipi iyon kanalının zehirler için en genel hedef olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, aktivite testlerinde kullanmak üzere, Kv1.3 iyon kanalının fazla eksprese edildiği Jurkat klon E6-1 (*Homo sapiens* akut T hücreli lösemi) hücreleri seçilmiştir.



Şekil 5.14. Veri tabanlarına göre, zehirlerin hedeflediği iyon kanal tiplerinin sayısal karşılaştırılmasını gösteren grafikler.

5.4. Elektroforetik Analiz Sonuçları

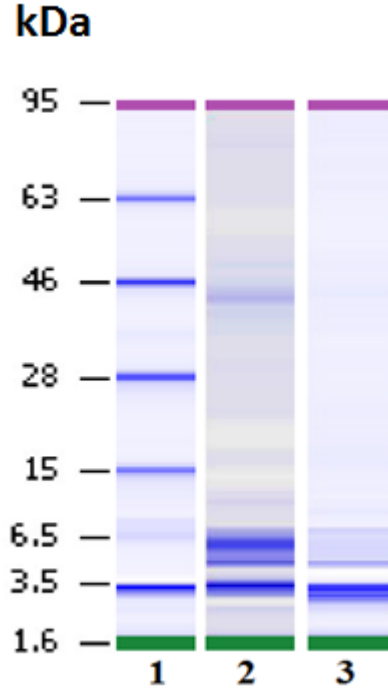
Tris-Glisin SDS-PAGE büyük molekül ağırlıklı proteinleri iyi bir şekilde ayırabilme avantajına sahiptir. Bu nedenle, bu teknik esas itibarıyla, ham zehir protein

içeriğinin saptanması için kullanılmıştır. Akrep zehirlerinin büyük molekül ağırlıklı proteinleri fosfolipaz ve hiyaluronidaz ailesinden enzimleri içerir. Normalde, akrep zehiri profillerinde zengin protein bantları bulunmaktadır. Ham zehir örneği için yapılan Glisin-SDS PAGE jelinde yaklaşık 240 kDa'a kadar protein bantları gözlenmektedir. Büyük proteinler kapsamında 70 ve 240 kDa'luk bantlar daha belirgindir. Bunlar zehir yapısında en bol bulunan enzimlere ait olabilir. Protein bantları dışında, 15 kDa'nın altında molekül ağırlığına sahip, çok yoğun ve kalın bir bant halindeki peptit grubu görülmektedir. Beklendiği gibi, Tris-Glisin SDS-PAGE ayırım kapasitesi tek tek peptit bantlarının ayrılması için yeterli değildir. *P.kraepelini* zehrinin peptit profilini aydınlatmak amacıyla, 10 kDa altındaki peptitler için daha iyi bir rezolüsyon sağlayan Tris-Trisin SDS-PAGE metodu seçilmiştir.

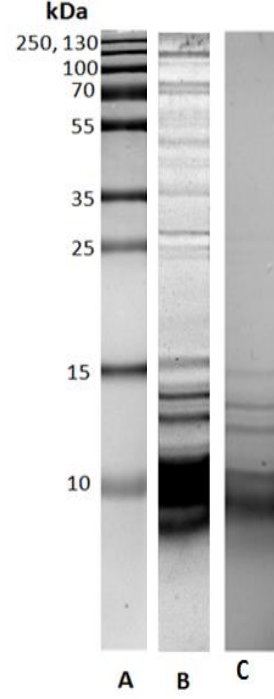
Karmaşık ve sıkı yapıya sahip peptitler için tavsiye edildiği üzere, peptit toksinlerin sistein bakımından zengin doğaları bilgisine dayanarak, jelde denatürasyonu kolaylaştırmak için ayırıcı jel 6 M üre ile hazırlanmıştır. Ayrıca daha iyi bir rezolüsyon elde etmek amacıyla %4, %10 ve %16 olmak üzere farklı konsantrasyonlarda üç tabaka jel kullanılmıştır [139]. Ham zehirde 40 kDa'dan daha büyük molekül ağırlıklı proteinler %10 ve %16'lık jeller arasındaki bağlantıda yığılmış olarak gözlenmişler ve ayırıcı jelle geçememişlerdir. Yığılmış haldeki yüksek molekül ağırlıklı proteinler jelin üst kısmında yoğun bir bant olarak görülebilir. Tris-Trisin jel, Tris-Glisin SDS jelinde gözlenen 10 kDa bandı daha ileri bir çözünürlükle ayırabilmiş ve 2-10 kDa aralığında peptit bantları gözlemlenmiştir. Bu bantlar yoğunluklu olarak 7-10 kDa arasında toplanmıştır.

Mikrokapiler elektroforez (MCE) sonucu da PAGE dataları ile uygunluk göstermektedir. Agilent 2100 Biyoanalizör sistemi, 3,5 kDa bantlık kısımda sistem pikine sahip olduğundan, o kısımdaki protein bantları net değildir. Tüm örnekler için 1,6 ile 95 kDa arasında belirteç bantları (1) görülmektedir. Ham zehir için, yaklaşık 4,5-80 kDa aralığında bantlar elde edilmiştir. Ana protein bandı, yaklaşık 44 kDa da; çoklu peptit bantları ise 4,5-7,5 kDa aralığında saptanmıştır. Aynı şekilde, zehrin jel filtrasyon kolonundan toplanan peptit fraksiyonunda da 4,5-7,5 kDa çoklu peptit bantları gözlenmiştir. Kısa zincirli nörotoksinler sistem piki ile çakıştığı için, tam olarak gözlemlenememiştir. Bununla birlikte, sistem pikleri

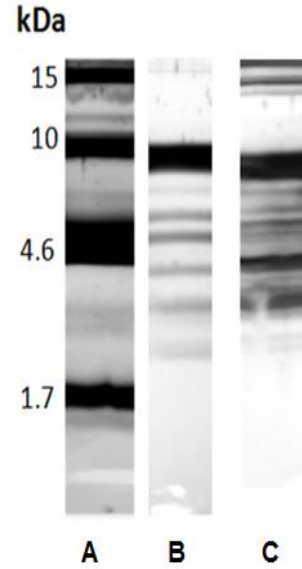
normal durumuna göre daha yoğun olduğu farkedilmektedir. Bu durum 3-4 kDa'luk kısa zincirli peptit toksinlerin varlığına işaret etmektedir (Şekil 5.15).



Şekil 5.15. *P. kraepelini* (lokasyon:Alanya) zehri mikrofluidik kapiller elektroforez sonuçları. 1.sıra: belirteç, 2.sıra: ham zehir, 3.sıra:peptit fraksiyonu.



Şekil 5.16. *P.kraepelini* (lokasyon:Alanya) ham zehir ve peptit fraksiyonunun Tris-Glisin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı. (A) Geniş aralıklı ladder, (B) Ham zehir, (C) Jel filtrasyondan toplanan peptit fraksiyonu

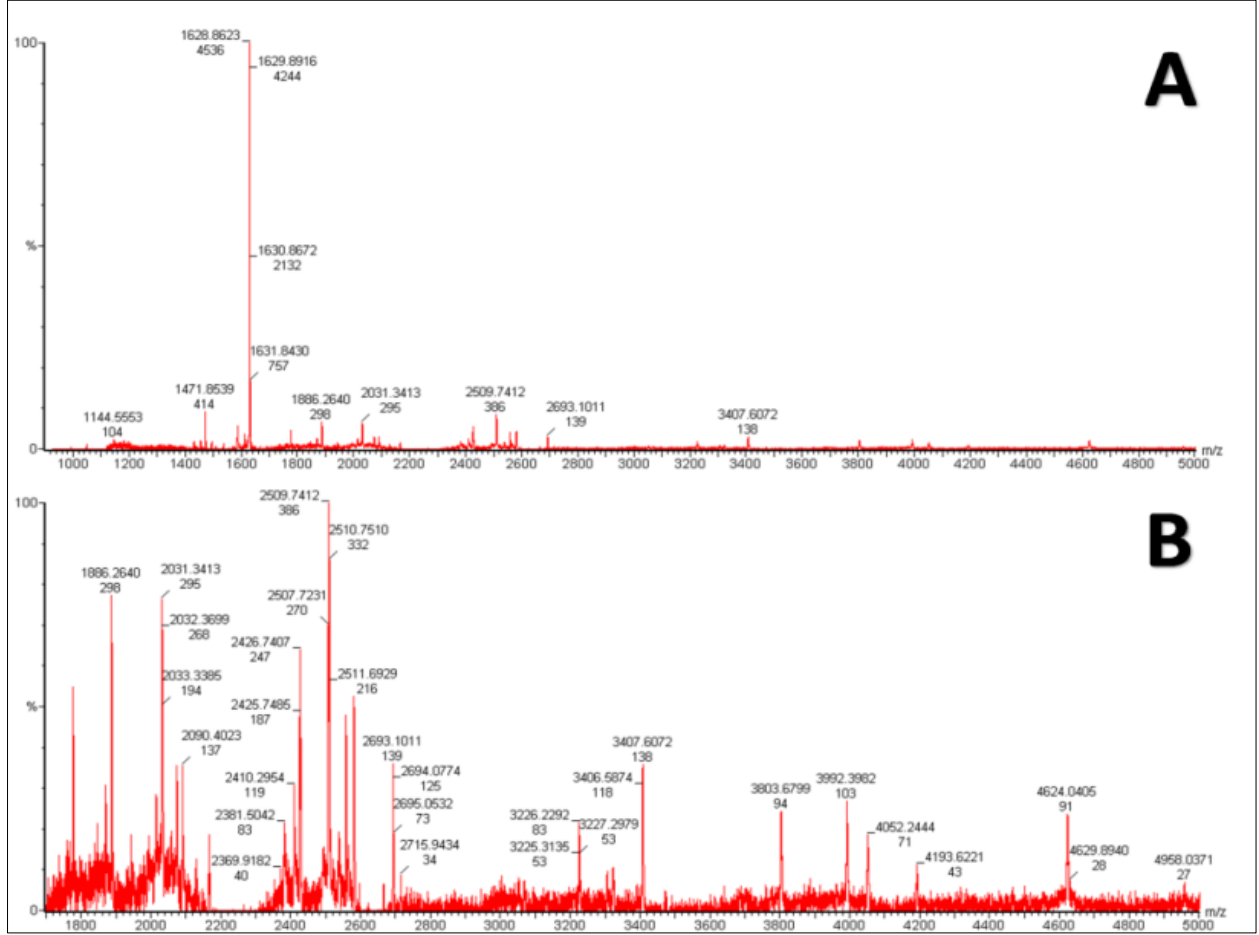


Şekil 5.17. *P.kraepelini* (lokasyon:Alanya) ham zehir ve peptit fraksiyonunun Tris-Trisin SDS-PAGE ile elektroforetik ayrımı (A) Küçük molekül ağırlıklı ladder, (B) Ham zehir, (C) Jel filtrasyondan toplanan peptit fraksiyonu

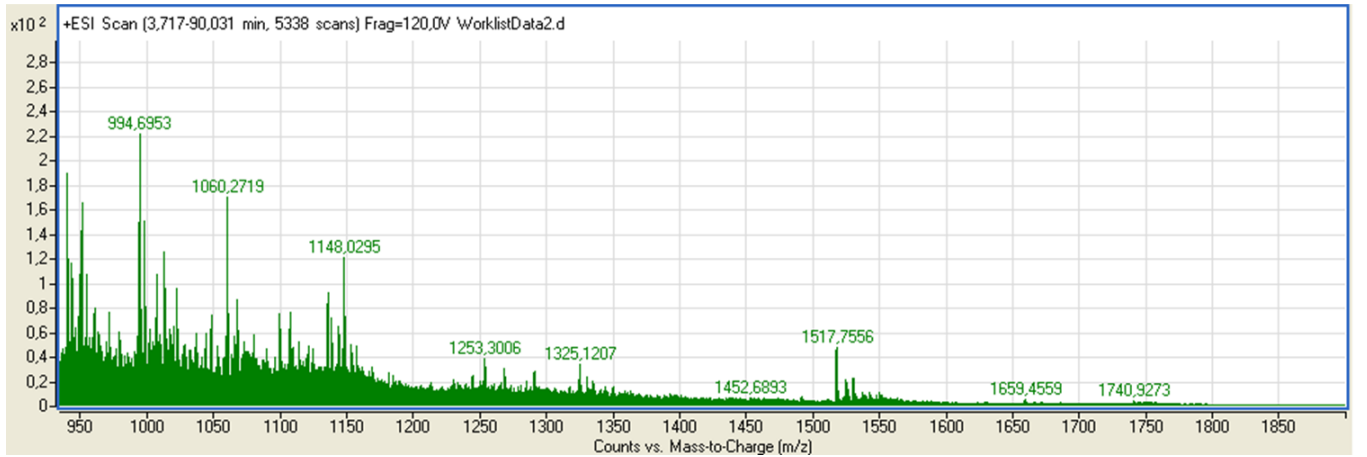
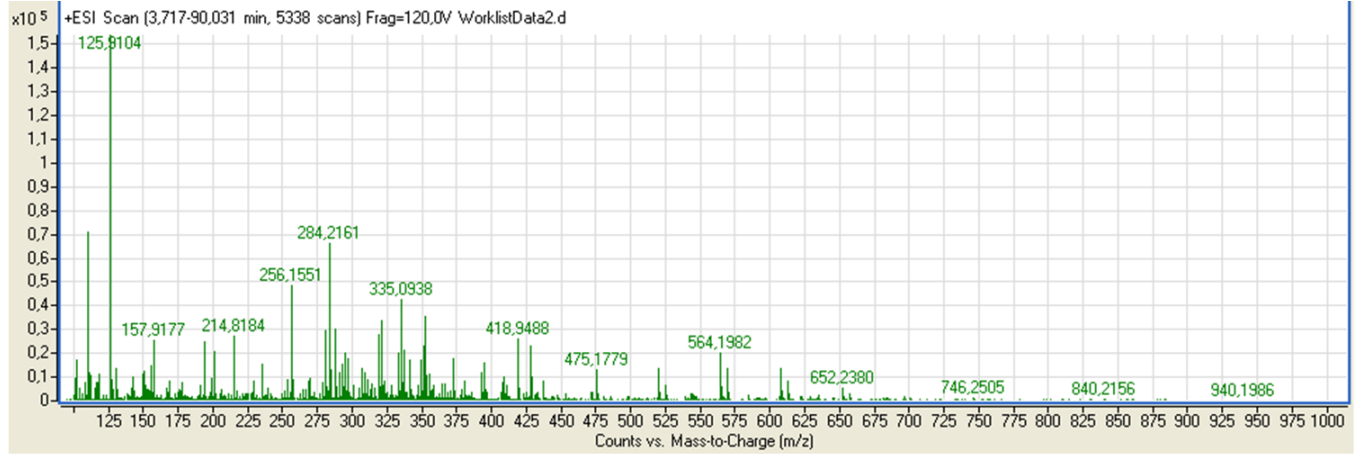
5.5.Kütle Spektrometre Analiz Sonuçları

P.kraepelini zehrinin biyokimyasal ve peptidomik karakterizasyonu için, yapısında bulunan peptit kütlelerinin belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla, jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen zehir peptit fraksiyonu kütle spektrometresi cihazı ile analiz edilmiş ve parmak izi sonuçları elde edilmiştir. Peptit kütleleri, oluşan izotop pikleri arasındaki kütle farkı dikkate alınarak, peptitlerin kazandıkları yüklerin saptanmasıyla hesaplanmıştır.

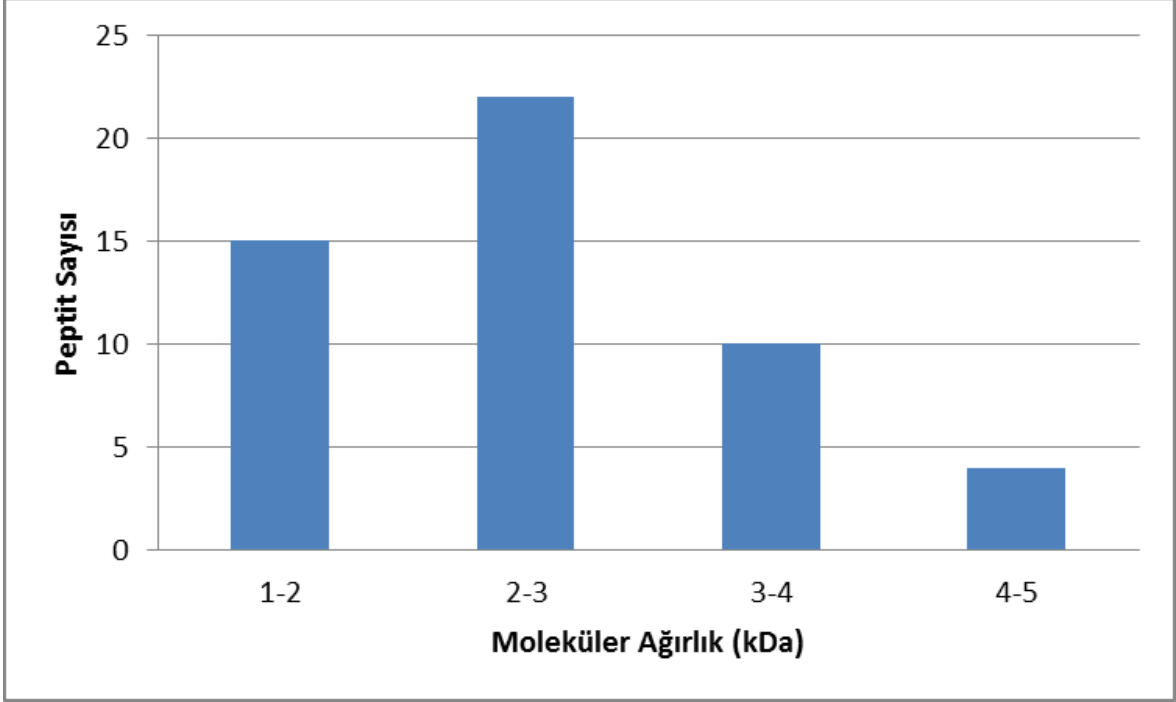
Maldi-TOF-MS sonucunda elde edilen spektrum Şekil 5.18'de görülmektedir, *P.kraepelini* zehir peptit fraksiyonunda 1000 ile 5000 Da arasında 25 adet peptit kütlesi tespit edilmiştir. LC/MS TOF analiz sonucunda elde edilen spektrum ise Şekil 5.19'da verilmektedir. 1000 ile 5000 Da arasında 27 adet peptit saptanmıştır. MALDI-TOF MS analizinde tespit edilemeyen bazı kütleler de bulunmuştur. İki teknik ile daha fazla peptit kütlesi saptamak mümkün olmuştur, sonuçlar birbirini desteklemiştir. İyonizasyon farkından dolayı, LC/TOF/MS ile saptanamayan kütleler, MALDI ile görülebilmıştır. Zehir bileşimde saptanan peptitlerin kütleleri Çizelge 5.3'de belirtilmiştir. Her iki kütle spektrometre analizi sonucunda saptanan bu peptitlerin kütleleri Çizelge 5.3'de sunulmuştur. Her iki analizde, büyük oranda uyumlu datalar elde edilmiştir.



Şekil 5.18. *P.kraepelini* (lokasyon:Alanya) zehir peptit fraksiyonunun MALDI-TOF MS ile analizi sonuçları 1000-5000 Da arasında MALDI-TOF MS spektrumu (A) yakınlaştırılmış 1800-5000 Da bölgesi (B).



Şekil 5.19. *P.kraepelini* (lokasyon:Alanya) zehir peptit fraksiyonunun LC/MS TOF spektrumu



Şekil 5. 20. *P.kraepelini* zehir peptitlerinin moleküler ağırlık dağılım histogramı

Şekil 5.20'de *P.kraepelini* zehir peptit fraksiyonunun, LC-MS-TOF ve MALDI-TOF-MS teknolojisi ile analizi sonucunda saptanan peptitler, kütle dağılımlarına göre gruplandırılmıştır. En çok 2-3 kDa aralığında peptit kütlesi saptanmıştır.

Çizelge 5.3. *P.kraepelini* zehir peptit fraksiyonunda 1000 ve 5000 Da arasında gözlemlenen monoizotopik peptit kütleleri. Kütle toleransı $\pm 0,5$ Da

MA(Da)		
MALDI-TOF MS	LC-TOF-MS	
Kütle	Kütle	Alıkonma Zamanı(dak)
1470,8759	1059, 2719	25,191
1584,8524	1147,0295	21,180
1628,8623	1252,3006	25,191
1776,6049	1471,8430	21,180
1869,9739	1512,8981	28,050
1886,2640	1629,9841	25,191
2030,3732	1657,9872	35,361
2073,3103	1990,9458	46,874
2089,4204	2072,9160	19,580
2128,2654	2129,9294	41,247
2165,5317	2157,3640	34,553
2380,5864	2382,1809	30,284
2409,3728	2458,2230	28,050
2425,7485	2536,2876	30,284
2507,7231	2580,3730	30,996
2557,0613	2604,3609	30,996
2579,9326	2648,2414	33,308
2692,0559	2722,8975	30,284
3224,3982	2903,3786	30,996
3405,8816	2979,8244	45,791
3802,0227	3033,5112	29,476
3990,5300	3316,9118	28,050
4050,1055	3383,6172	32,160
4191,1846	3408,9628	46,874
4623,2178	3479,8546	29,476
	3571,7598	34,553
	4393,2680	52,404

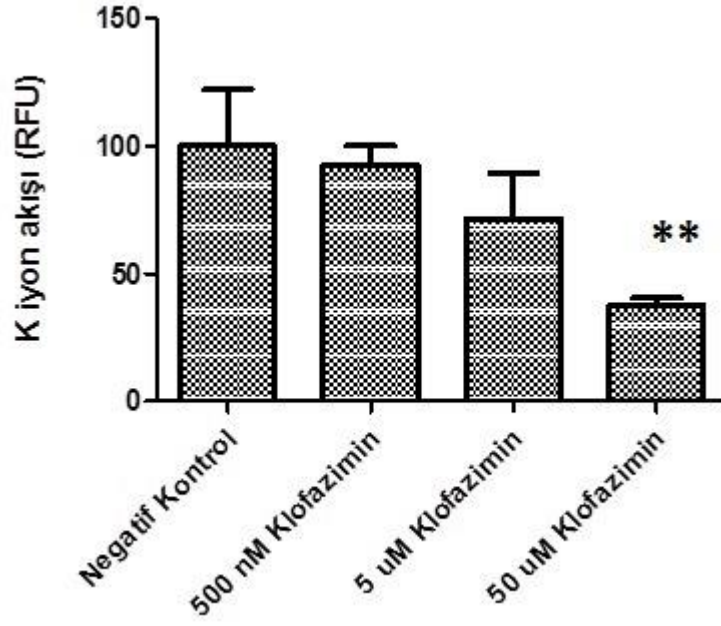
5.6.Biyoaktivite Testlerinden Elde Edilen Sonuçlar

5.6.1. Potasyum İyon Kanalı Testi Sonuçları

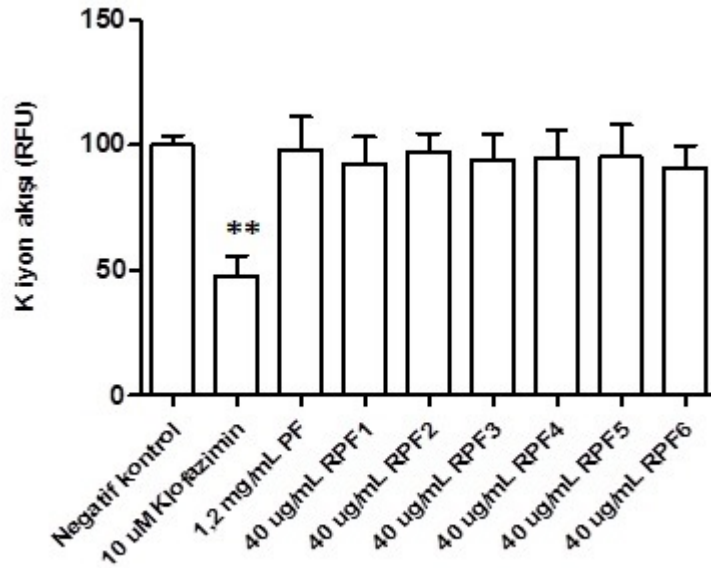
Çalışmamızda elde edilen biyoinformatik verilerine göre, akrelerin en genel hedefinin Kv1.3 alt tipi olduğu saptanmıştı. Bu nedenle, aktivite testlerinde bu kanal tipi hedeflenmiştir. K⁺iyon akışını ölçmek için floresan temelli bir test kullanılarak, zehir peptit fraksiyonları analiz edilmiştir.

Negatif ve pozitif kontrol ile baseline okuması ve uyarıdan sonraki iyon akışı değişiminin floresan okuma sonuçları Şekil 5.23'de verilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan klofazimin'in Jurkat hücreleri üzerindeki etkisi Şekil 5.21.'de görülmektedir. Beklenildiği üzere, klofaziminin K⁺ iyon kanallarını bloke ettiği doğrulanmıştır. Bu bileşik artan konsantrasyonla doğru orantılı olarak K⁺ iyon akışını engellemiştir. Literatürde klofaziminin IC50 değeri 300 nM olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu değer yaklaşık 50 µM bulunmuştur. 300 nM, patch clamp çalışması ile alınan sonuçtur, çalışmada kullanılan testin hassasiyeti düşük olduğundan bu değer daha yüksek bulunmuş olabilir. Diğer potasyum kanallarının da TI⁺ iyonu akışına katkısı aradaki bu farka neden olmuş olabilir.

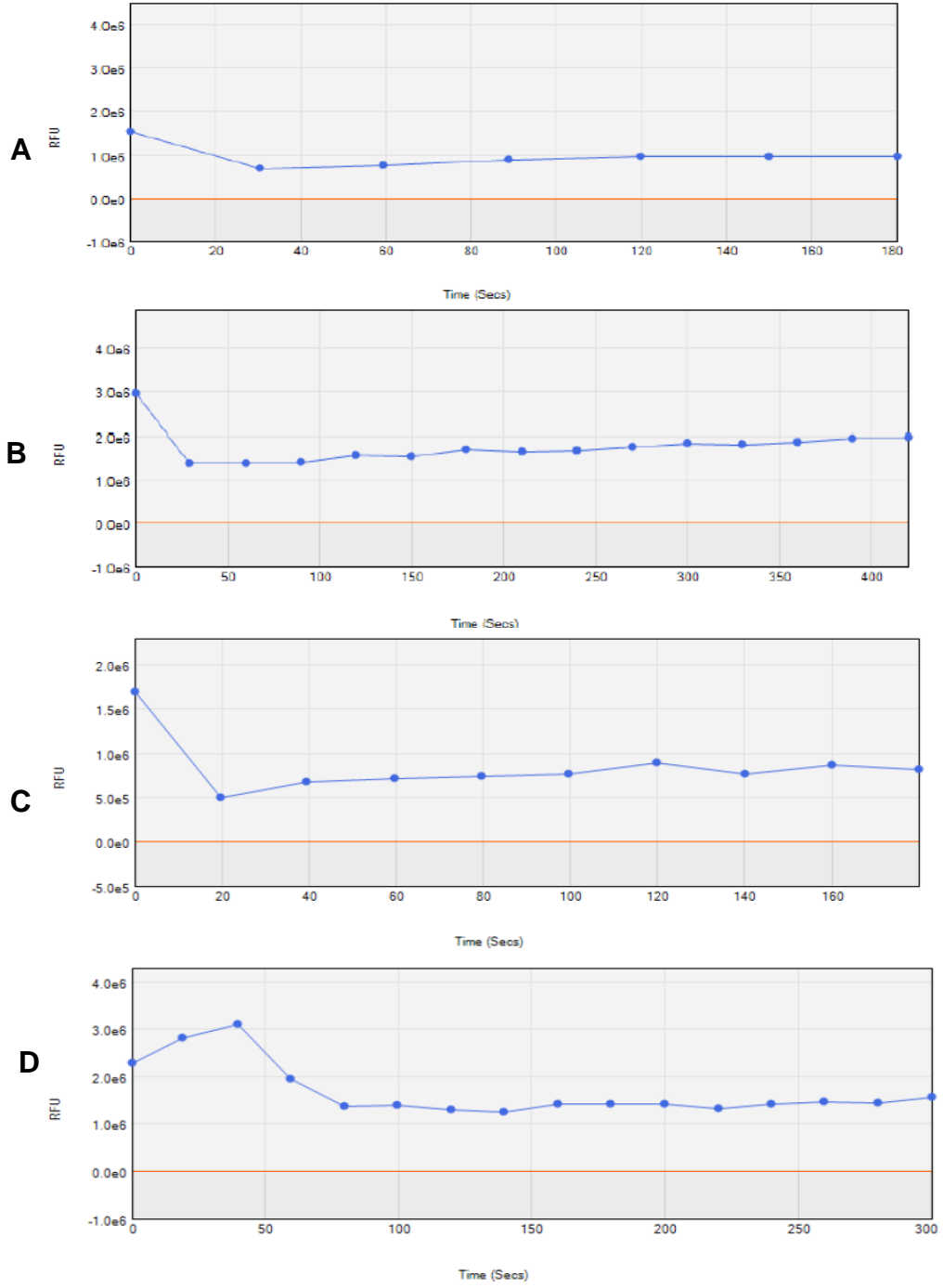
P.kraepelini peptit fraksiyonlarıyla yapılan K iyon kanal testi sonuçlarına göre, peptit fraksiyonu (PF) ve ters faz kromatografi fraksiyonlarının (RPF) Jurkat hücreleri üzerinde herhangi bir bloke edici etki gözlenmemiştir (Şekil 5.22). Bunun iki sebebi olabilir: ya zehir yapısında bulunan peptitler bu aktivite açısından yeterince güçlü değildir, ya da bu tarz peptitler yoktur. Bir diğer ihtimal testin hassasiyetinin yeterli olmaması olabilir.



Şekil 5.21. Pozitif kontrol olan klofazimin'in Jurkat hücreleri K⁺ iyon kanalları üzerindeki etkisi.



Şekil 5. 22. *P.kraepelini* peptit fraksiyonlarıyla yapılan K iyon kanalı testi sonuçları. PF: peptit fraksiyonu, RPF: ters faz kromatografi fraksiyonları



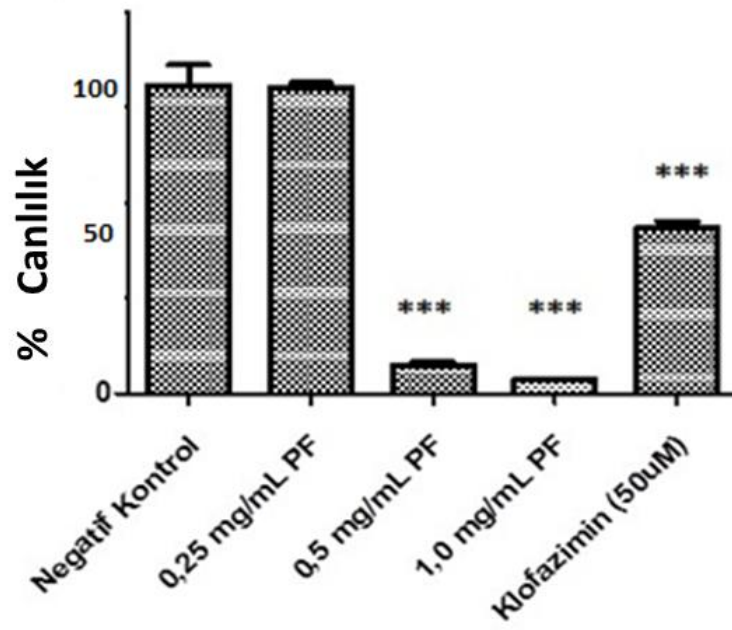
Şekil 5.23. Negatif ve pozitif kontrol ile iyon akışı değişiminin floresan okuma sonuçları. A: Baseline Okuma (Negatif kontrol), B: Uyarıdan sonraki okuma (Negatif kontrol), C: Baseline Okuma (Klofazimin 500 nM), D: Uyarıdan sonraki okuma (Klofazimin 500 nM)

5.6.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları

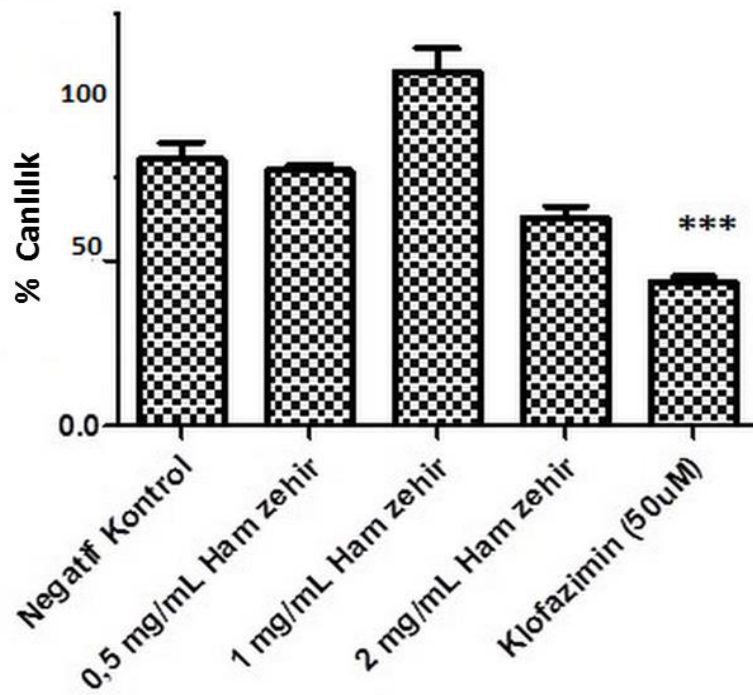
P.kraepelini zehrinin sitotoksik etkisini araştırmak üzere, hücre canlılığını saptamamıza olanak sağlayan floresans temelli AlamarBlue® testi kullanılmıştır. Bu testte ham zehir ve peptit fraksiyonu için 3'er farklı doz denenmiştir. Ham zehirden (0,5mg/mL-2mg/mL) elde edilen sonuçlara göre Jurkat hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmezken, peptit fraksiyonu (0,25mg/mL-1mg/mL) doza bağımlı bir etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.24. ve 5.25.'de grafiklenmiştir.

Ham zehirle elde edilen veriler çok anlamlı sonuç vermemiştir. Bunun nedeni zehrin karmaşık yapısının floresan okuma sırasında girişim yapmış olması olabilir. AlamarBlue® test ham zehrin etkisine bakmak için çok uygun olmayabilir.

Ön saflaştırma işleminden geçirilerek içeriğindeki diğer bileşenlerden arındırılmış peptit fraksiyonu ile Jurkat hücreleri üzerinde sitotoksik etki saptanmıştır. Bu fraksiyon 0,5 mg/mL konsantrasyonda hücrelerin %50 sinden fazlasını öldürmüştür.



Şekil 5.24. *P.kraepelini* zehir peptit fraksiyonunun Jurkat hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren grafik.PF:Peptit Fraksiyonu



Şekil 5.25. *P.kraepelini* ham zehrinin Jurkat hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren grafik.

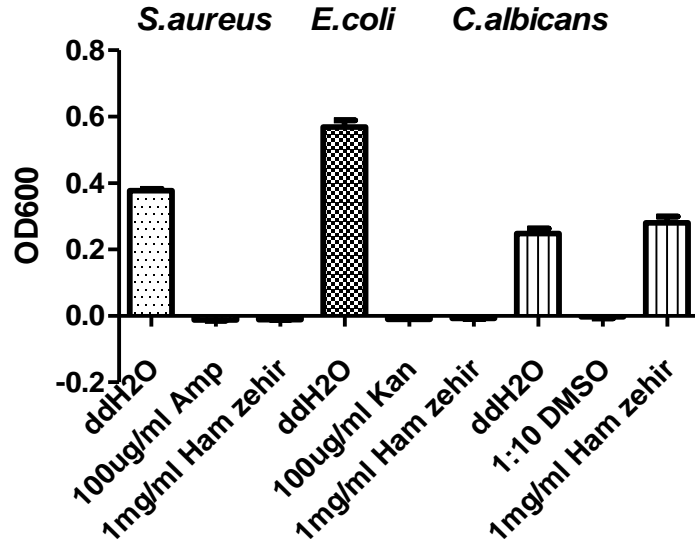
5.6.3. Antimikrobiyal Aktivite Test Sonuçları

Sıvı besi yeri seyreltme metodu kullanılarak gerçekleştirilen antimikrobiyal test sonuçlarına göre; ham zehir 1mg/mL konsantrasyonda *C.albicans* kültüründe büyümeyi indüklerken, *E.coli* ve *S.aureus* suşları üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir (Şekil 5.26). Doza bağlı etki görebilmek amacıyla 1 mg/ml, 0,5 mg/mL ve 0,1 mg/mL olmak üzere üç konsantrasyon denenmiştir. 1 mg/mL ham zehir *S.aureus* üremesini engellemiş, diğer iki konsantrasyonda ise bakteriler üremiştir (Şekil 5.27). *E.coli* için ise 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL ham zehir konsantrasyonlarında üreme inhibe olmuş, 0,1 mg/mL de üreme gözlenmiştir (Şekil 5.28).

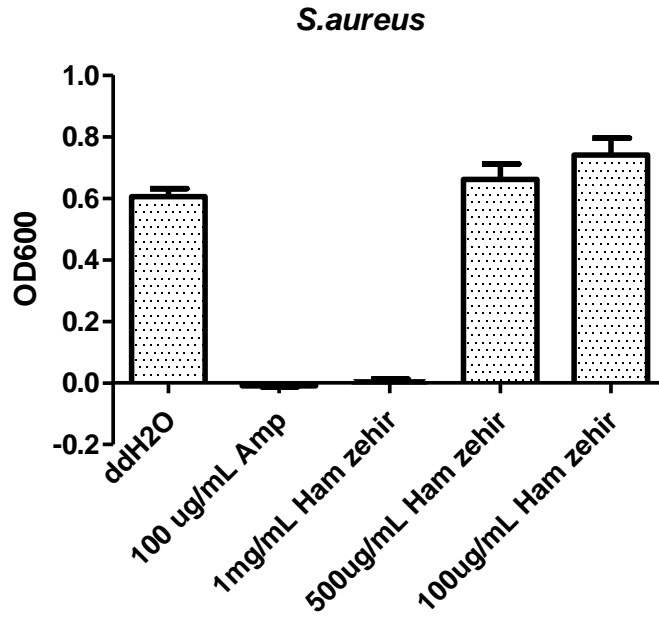
Ters faz sıvı kromatografisinden elde edilen fraksiyonlardan 6 numaralı (80 µg/mL) ve 3 numaralı (58 µg/mL) fraksiyonlar, sırasıyla *E.coli* ve *S.aureus* suşlarında, negatif kontrol ile kıyaslandığında üremeyi inhibe edici etki göstermişlerdir. 5 (55 µg/mL) ve 6 (80 µg/mL) numaralı fraksiyonlar *S.aureus* bakterilerinin üremesini indüklemişlerdir. 2 numaralı fraksiyon (40 µg/mL) ise *E.coli* üzerinde aynı şekilde üremeyi indükleyici etki göstermiştir.

3 ve 6 numaralı fraksiyonların üremeyi inhibe edici etki gösterdiği saptandığında, antimikrobiyal aktivitenin varlığından net bir şekilde emin olmak ve bunu kanıtlamak amacıyla, elimizde bulunan bütün 3 ve 6 numaralı fraksiyonlar birleştirilmiş, maksimum konsantrasyonlar uygulanarak test tekrarlanmıştır. 3 numaralı fraksiyonda her kuyucukta 219 µg/mL doz uygulanmış, antimikrobiyal etki görülmemiştir, hatta bakteriler negatif kontrole göre daha yüksek absorbans vermişlerdir, yani yüksek dozda 3 numaralı ters faz kromatografi fraksiyonu (RPF3) ile üreme indüklenmiştir.

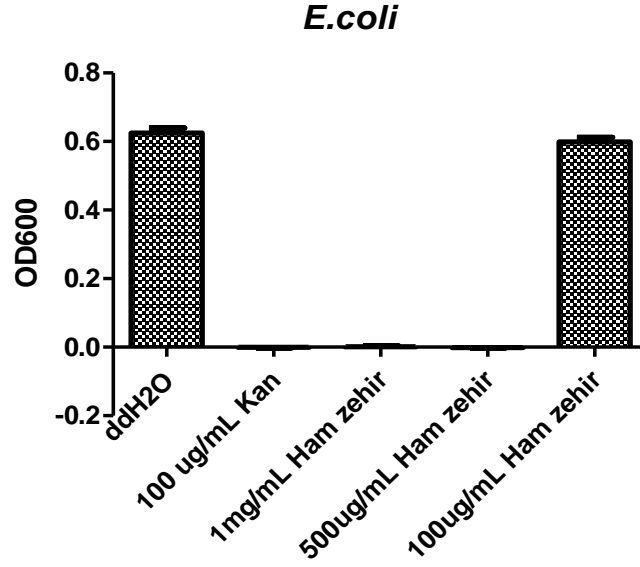
300 ug/mL dozda uygulanan 6 numaralı fraksiyon ise, *E.coli* üremesini tamamen inhibe ederek güçlü bir antimikrobiyal etki göstermiştir. Zehir miktarının sınırlı olmasından dolayı doza bağımlı etki çalışılmadan, tek doz uygulanmıştır ve bu fraksiyonun *E.coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisi kanıtlanmıştır.



Şekil 5.26. *P.kraepelini* ham zehrinin antimikrobiyal aktivite testi sonuçları



Şekil 5.27. Üç farklı konsantrasyonda ham zehrin *S.aureus* üremesi üzerindeki etkileri



Şekil 5.28. Üç farklı konsantrasyonda ham zehrin *E.coli* üremesi üzerindeki etkileri

Çizelge 5.4. Ham zehir ve peptit fraksiyonlarının antimikrobiyal aktiviteleri

Mikrobiyal Suş	Ham zehir	RPF2	RPF3	RPF4	RPF5	RPF6
<i>E.coli</i>	+	-	-	-	-	+
	(0,5mg/mL)	(20 µg/mL)	(58 µg/mL)	(40 µg/mL)	(55 µg/mL)	(300 µg/mL)
<i>S.aureus</i>	+	-	-	-	-	-
	(1mg/mL)	(20 µg/mL)	(219 µg/mL)	(40 µg/mL)	(55 µg/mL)	(80 µg/mL)
<i>C.albicans</i>	-					
	(1mg/mL)					

(+) Aktivite var, (-) Aktivite yok, RPF: Ters faz kromatografi fraksiyonları

5.7. Tartışma

Bu tez çalışması, *Protoiurus kraepelini* zehrinin detaylı ilk biyokimyasal karakterizasyonunu amaç edinmiştir. Aynı zamanda zehir içeriğinin, özellikle peptitlerin biyoaktivite açısından taraması da ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Peptidomik yaklaşımı ile, zehrin elektroforetik profili, kromatografik profilleri ve kütle profili çıkarılmıştır. Ham zehir ve peptit içeriğinin, memeli hücre (*Homo sapiens*, Jurkat E16 klon T hücreli lösemi hücre hattı) metabolizması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca ham zehir ve peptit fraksiyonlarının, seçilen üç farklı patojen mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır.

Protoiurus kraepelini zehrinin protein içeriği ham zehrin kuru ağırlığına oranla %70 olarak saptanmıştır. Zehir içeriğinin % 50'den fazlasının peptitler ve proteinlerden oluştuğu beklenen bir sonuçtur ve ham zehrin büyük kısmının peptit yapısındaki toksinlerden oluştuğunu göstermektedir. Literatürde akrep zehirleri için bu oran %50-90 aralığında olduğu rapor edilmiştir.

Zehrin peptit ve protein profili, üç farklı elektroforetik yöntemle çıkarılmıştır. Ham zehir örneği için yapılan Glisin-SDS PAGE jelinde yaklaşık 240 kDa'a kadar protein bantları gözlenmektedir. Büyük proteinler olarak 70 ve 240 kDa'luk bantlar daha belirgindir, bunlar zehir yapısında en bol bulunan enzimlere ait olabilir. Protein bantları dışında, 15 kDa altında çok yoğun kalın bir şekilde peptit grubu görülmektedir. Bu durum beklenen bir sonuçtur; çünkü akrep zehirlerinin yapısında proteinlere oranla peptitlerin daha bol bulunduğu bilinmektedir [117], [118], [125], [146]–[149]. Tris-Trisin jel, düşündüğümüz gibi, peptidler için, daha iyi bir çözünürlük sağlamış ve Tris-Glisin SDS-PAGE jelindeki 10 kDa bandı daha ileri bir çözünürlükle ayırabilmiştir. Trisin SDS-PAGE jelinde 2-10 kDa aralığında peptit bantları gözlenmektedir. Bu bantlar yoğunluklu olarak 7-10 kDa arasında toplanmaktadır. Yaklaşık 7 kDa molekül ağırlığındakiler uzun zincirli, 3 kDa ağırlığındakiler de kısa zincirli peptit toksinlerin varlığına işaret etmektedir. Zehir peptidlerin yüksek sistein köprüsü içeriği, moleküller arası çapraz bağlanma sorunu yaratabilir. Mikrokapiler elektroforez (MCE) sisteminde yalancı jel görüntüsü oluşturulduğu için kantitatif olarak reel bir sonuç vermemektedir. Ancak

yine de, doğal karışımların protein içeriği hakkında hızlı bir şekilde bilgi edinmemizi sağlamaktadır. Klasik SDS PAGE sistemi uzun süren ve daha uğraştırıcı bir yöntemdir. Dolayısıyla MCE bu açıdan tercih edilebilir. Protein 80 Kit başlangıçta proteinlerin incelenmesi için tasarlanmıştır, 5-80 kDa aralığındaki proteinler için uygundur, 5 kDa'dan daha büyük zehir peptitlerinin/proteinlerinin gözlemi için alternatif bir teknik olabilir [150].

Kromatografi sonuçlarında ise, ilk saflaştırma basamağı olan jel filtrasyon kromatografisinde, beklenildiği gibi, en büyük piki 10 kDa altında peptitlerin oluşturduğu gözlenmektedir. Akrep zehirlerinin büyük kısmını peptitler oluşturmaktadır. *P.kraepelini* zehrinin de büyük oranda peptit içerdiği saptanmıştır. Farklı lokasyonlardan toplanan akreplerden farklı zamanlarda sağımı yapılan zehirlerin (Alanya, Taşatan, Avşallar, Gündoğmuş Akseki) yapılan jel filtrasyon ayrımı sonuçları farklı profiller vermiş olup peptit miktarları da değişik bulunmuştur. Bununla birlikte, elde edilen ana pik bizim ilgilendiğimiz alıkonma zamanına denk gelmekteydi. Bu sonuçlara göre, zehir bileşiminin hayvanın yaşadığı çevre koşullarına, açlık-tokluk, stres, cinsiyet gibi birçok koşula bağlı olarak değişiklik gösterebildiği görülmektedir [3], [22]. Ancak türe özgü olan temel profil çok fazla değişiklik göstermemektedir, organizmada farklı koşullarda farklı peptitlerin ekspresyonu artırılıyor veya baskılanıyor olabilir. Bu nedenle de 30.-40. dakikalar arasındaki ana pik değişmemiş ancak bileşimindeki peptitlerin konsantrasyonu değiştiği için ufak farklılıklar gözlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde de gözleendiği şekilde, farklı lokasyonlardan toplanan akrep gruplarının farklı zamanlarda sağımı yapılan zehirleri ile, ters faz kromatografisinde de aynı şekilde, temel profilde büyük değişiklik olmamakla beraber farklı peptitlerin konsantrasyonlarında değişiklikler olduğu görülmüştür.

LC/MS TOF analiz sonucunda 1000 ile 5000 Da arasında 27 adet peptit saptanmıştır. Maldı-TOF-MS sonucunda ise *P.kraepelini* zehir peptit fraksiyonunda 1000 ile 5000 Da arasında 25 adet peptit kütlesi tespit edilmiştir. Literatür bilgisine göre, elde edilen peptitler kütlelerine göre gruplandırılabilir, ve bazı çıkarımlar yapılabilir. Buna göre, 1-3 kDa aralığındaki peptitlerin disülfid bağı içermeyen grupta (NDBPs) olması muhtemeldir. Bu yapıdaki peptitler genellikle antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. 3-5 kDa arasındaki kütleler, ICK motifi içeren kısa zincirli

nörotoksinler grubunda sınıflandırılabilir. Elektroforez verileri de bu grup toksinlerin varlığını doğrulamaktadır. Kütle spektrometri analizlerindeki sınırlamalar nedeniyle, elektroforetik ayırmada gözlediğimiz 5 kDa'dan büyük peptitler saptanamamıştır. Genellikle 5kDa ve üzerindeki peptitler, uzun zincirli nörotoksinlerdir. Elde edilen verilere göre, zehir yapısında antimikrobiyal etkileriyle disülfid bağı içermeyen gruptan (NDBPler) ve potasyum iyon kanal akışı üzerinde aktivite gösteren kısa zincirli nörotoksinlerin bulunduğu söylenebilir.

Akrep zehirlerinin yapısındaki toksinlerin iyon kanallarıyla özel bir etkileşimi vardır, özgün olarak hedefledikleri iyon kanal tipi mevcuttur. Avlanma ve savunmada kullandıkları zehirleri, genellikle özel olarak avını etkisiz hale getirebilmek için iyon kanalları üzerinden etki etmektedir. Önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi, akrep zehirlerinin önemli bir kısmını peptitler oluşturmaktadır. Bu peptitler, disülfid köprüsü içeren peptitler (DBPs) ve disülfid köprüsü içermeyen peptitler (NDBPs) olarak iki grup altında değerlendirilebilirler [62]. Disülfid köprülü peptitler, nörotoksin olarak aktivite gösteren, genellikle Na^+ , K^+ , Ca^{2+} veya Cl^- iyon kanal inhibitörleri olan, sistince zengin, katyonik peptitlerdir. Bu grup da kendi içinde yapılarına göre iki gruba ayrılır; kısa zincirli nörotoksinler ve uzun zincirli nörotoksinler. Kısa zincirli, 3-5 kDa, uzun zincirli ise 6-8 kDa molekül ağırlığındadırlar. Kısa zincirli nörotoksinler, potasyum iyon kanal akış düzenleyicilerini oluştururken; uzun zincirli hücre membranı boyunca sodyum iyon akışını düzenleyicileri kapsamaktadırlar. Çalışmamızda elde edilen biyoinformatik verilerine göre, akreplerin en genel hedefinin Kv1.3 alt tipi olduğu saptanmıştı. Bu nedenle, aktivite testlerinde bu kanal tipi hedeflenmiştir. K^+ iyon akışını ölçmek için floresan temelli bir test kullanılarak, zehir peptit fraksiyonları analiz edilmiştir. Kullanılan FluxOR Potasyum İyon Kanal Testi (İnvitrogen), pratikliği ile iyon kanalı çalışmalarında kullanılan patch-clamp tekniğine alternatif olarak kullanılabilir.

Ön saflaştırma işleminden geçirilerek içeriğindeki diğer bileşenlerden arındırılmış peptit fraksiyonu ile Jurkat hücreleri üzerinde sitotoksik etki saptanmıştır, 0,5 mg/mL konsantrasyonda hücrelerin %50 sinden fazlasını öldürmüştür. İleri çalışmalar ile Jurkat hücreleri üzerinde antikanser etki gösteren aktif peptit veya peptitlerin yapıları ve antikanser etki mekanizmaları hakkında daha ayrıntılı bilgi edinmek mümkündür. Zehir miktarındaki yetersizlikten dolayı çalışmamız şimdilik

bu noktada kalmıştır. Kanser tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. Çeşitli genetik ve epigenetik olayların hücrel birikimine dayanan multifaktöriyel bir hastalıktır [151], [152]. Özellikle, solid tümörler yüksek ölüm oranı ile dünya çapında en yaygındır. Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler kanser tedavisi için önemli araçlardır [153]. Ancak, bu tedaviler de ciddi sistemik yan etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle, farklı kanserlerin karmaşıklığının üstesinden gelebilmek için birçok terapötik yaklaşım vardır [154]. Aralarında, kansere karşı, özellikle doğal ürünlerden türetilen yeni ilaçlar aramak ve keşfetmek, dünya çapında yaygınlaşmıştır. Bunlardan biri olan akrep zehiri, kanser tedavisi için ilginç bir doğal kaynak olarak şimdilerde kabul görmektedir [155]. *Leiurus quinquestriatus* ve *Buthus martensii* Karsh (BMK) türlerinden elde edilen zehirlerin kanser tedavisi için doğal bir ürün olarak kullanılabilceği önceki çalışmalarda gösterilmiştir [51], [156]. BMK akrep ve zehri, kanser tedavisi ve diğer patofizyolojik durumlar için geleneksel tedavide kullanılmaktadır [13]. Buna ek olarak, Das Gupta ve arkadaşları, insan lösemi K562 ve U937 hücreleri üzerinde *Heterometrus bengalensis* türü akrep zehrinin sitotoksik aktivitesini saptamıştır [157]. Diğer çalışmalarda, akrep zehirlerinden izole edilmiş bazı peptidlerin kanserli hücrelerde apoptoz indüksiyonu ve proliferasyonun inhibisyonu ile antikanser aktivite gösterdikleri de bildirilmiştir [158]–[161].

Gerçekleştirilen antimikrobiyal test sonuçlarına göre; ham zehir 1mg/mL konsantrasyonda *C.albicans* kültüründe büyümeyi indüklerken, *E.coli* ve *S.aureus* üzerinde antimikrobiyal etkili olduğu saptanmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyon hesaplayabilmek için gereken seri dilüsyon işlemi, zehir miktarı sınırlaması nedeniyle gerçekleştirilememiştir, ancak 1 mg/ml, 0,5 mg/mL ve 0,1 mg/mL olarak üç konsantrasyonla doza bağlı etki görebilmek amacıyla test yapılmıştır. Sıvı besiyeri seyreltme metoduna göre, seri dilüsyon yapıldığında üremeyi tamamen inhibe eden, absorbansın '0' olduğu konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) olarak tanımlanır [145], [162]. *S.aureus* ile, 0,5mg/mL-0,1mg/mL ham zehir konsantrasyonlarında üreme gözlenmiş, 1 mg/mL konsantrasyonda bakteriler tamamen ölmüştür; bu nedenle *S.aureus* için ham zehirin minimum inhibisyon konsantrasyonunun 0,5mg/mL-1mg/mL arasında bir değer olduğu söylenebilir. *E.coli* için ise 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL ham zehir konsantrasyonlarında üreme inhibe olmuş, 0,1 mg/mL de üreme gözlenmiştir.

E.coli için ham zehirin minimum inhibisyon konsantrasyonununun 0,5mg/mL-0,1mg/mL arasında bir değer olduğu söylenebilir. Ters faz sıvı kromatografisinden elde edilen fraksiyonlardan 6 numaralı (80ug/mL) ve 3 numaralı (58ug/mL) fraksiyonlar, sırasıyla *E.coli* ve *S.aureus* suşlarında, negatif kontrol ile kıyaslandığında üremeyi inhibe edici etki göstermişlerdir. 5 (55 ug/mL) ve 6 (80 ug/mL) numaralı fraksiyonlar *S.aureus* bakterilerinde üremeyi indüklemişlerdir. 2 numaralı fraksiyon (40 ug/mL) ise *E.coli* üzerinde aynı şekilde üremeyi indükleyici etki göstermiştir. Zehir yapısında bulunan iyonlar, serbest amino asitler, poliaminler, biyojenik aminler ve hatta bir kısım peptitlerin *C.albicans* kültüründe üremenin artışına neden olmuş olabilir. Zehir yapısının zenginliği düşünüldüğünde, hücrelerin, zehir içeriğini besin maddesi olarak kullanmış olması güçlü bir ihtimaldir. Aynı şekilde peptit fraksiyonlarında gözlenen bu etki de peptitlerin besin olarak kullanılmış olmasından kaynaklanmış olabilir. 300 ug/mL dozda uygulanan 6 numaralı fraksiyon, *E.coli* üremesini tamamen inhibe ederek güçlü bir antimikrobiyal etki göstermiştir. Zehir miktarının sınırlı olmasından dolayı doza bağımlı etki çalışılmadan, tek bir doz uygulanmıştır ve *E.coli* bakterilerinin tamamen öldüğü gözlenmiş ve fraksiyon 6'nın antimikrobiyal etkisi kanıtlanmıştır.

Kütle spektrometre analizlerinde ve elektroforez deneylerinde varlığı saptanan 1-3 kDa aralığındaki disülfid köprüsü içermeyen kısa zincirli peptitlerin (NDBPs) antimikrobiyal etkide temel rol oynadıkları düşünülmektedir [62]. Küçük molekül ağırlıklı peptitler üzerine odaklanarak yapılacak olan ileri testler ile hangi peptit ya da peptitlerin aktiviteden sorumlu olduğu anlaşılacaktır.

Son yirmi yılda, akrep zehirlerinin, geniş bir yelpazede değişen etki mekanizmaları ile antimikrobiyal peptitler için zengin bir kaynak olduğunu kanıtlamıştır. Proteomik ve transkriptomik yaklaşımların artan kullanımı ile keşfedilen peptitler verimli ve hızlı bir şekilde artmaktadır. Akrep zehir ve hemolenflerinden [163], [164], *P.kraepelini* türü gibi luridae familyasından olan *Hadrurus aztecus* türü akrebin zehrinden elde edilen hadrurin [85] gibi daha pek çok katyonik antimikrobiyal peptit keşfedilmiştir. Scorpine [82], opistoporins [86], parabutoporin [86], IsCTs [165], [166], pandinins [46], mucroporin [167], imcroporin, Stigmurin [168] keşfedilen antimikrobiyal peptitlerden bazılarıdır. Imcroporin, *I. maculates* türü akrep zehrinden izole edilmiş doğal katyonik bir peptittir, özellikle MRSA yı da içeren

antibiyotik dirençli gram pozitif bakteriler üzerinde güçlü antimikrobiyal etkisi olduğu saptanmıştır [169].

Türkiye'nin zengin ve farklı bir akrep faunasına sahip olmasına karşılık, günümüze kadar çok az sayıda türün zehiri karakterize edilmiştir. Son on yıl öncesine kadar, zehir toksisitesi, anti-zehir üretimi ve akrep sokmasına bağlı klinik durumlara dayalı bazı ön çalışmalar belirli ölçüde gerçekleştirilmiştir [170]–[172]. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi (RSHM, şimdi Halk Sağlığı Enstitüsü) akrep zehri araştırmalarını gerçekleştiren ve devlet tarafından desteklenen ana kurumdur [21]. Son on yılda Türkiye'de bulunan üç buthid türünün tüm biyokimyasal karakterizasyonu venomik yaklaşımı ile elde edilmiştir. Bu çalışmalar kronolojik olarak, *A. crassicauda*, *B. macrocentrus* ve *M. gibbosus* türlerine aittir. Bu çalışmaların tümü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde Figen Çalışkan ve araştırma grubu tarafından yürütülmektedir. *A. crassicauda* zehir karakterizasyon çalışmaları 2006 yılında başlamış ve Acra1- Acra8 adında sekiz adet uzun zincirli yeni peptid tanımlanmıştır [173]–[175]. *B. macrocentrus* zehri karakterize edilmiş ve 65 amino asitlik, BU1 adı verilen memeli Na⁺ kanalına spesifik bir α -toksin keşfedilmiştir [176]. *M. Gibbosus* zehrinden MegTx1, MegTx2 ve MegTx3 adlı yeni α -KTX tipi K⁺ kanal inhibitörleri tanımlanmıştır, bunlar zehir bezinde ifade edilen mRNA'lardan üretilen cDNA kütüphanesinin taranması ile keşfedilmiştir. Bu toksinlerin sırasıyla α -KTx3.x, α -KTx9.x, α -KTx16.x farklı α -ktx ailelerine ait olduğu görülmüştür [118]. Ayrıca, *M. gibbosus* türlerinin Ege popülasyonundan bir dizi bireyin, zehir protein profili tespit edilmiştir [170].

Türkiye'de daha önce, *lurus dufourei* *asiaticus* olarak isimlendirilen endemik akrep alt türünün zehri ile ilgili iki çalışma yapılmıştır. Alpagut Keskin ve Koç tarafından yapılan çalışmada, Aydın'dan toplanan akreplerden elde edilen zehir örneğinin Tris-Trisin SDS-PAGE ile elektroforetik olarak analiz edilmiştir [177]. Özkan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, Muğla'dan toplanan *I. d. asiaticus* örneklerinin zehir ekstraktları Tris-trisin SDS-PAGE metoduyla analiz edilmiştir ve bu zehrin lethalitesini ve *in vivo* etkileri çalışılmıştır. 29-116 kDa aralığında bantlar belirlenmiştir. Bu çalışmalarda zehir bileşenleri hakkında detaylı herhangi bir veri bulunmamaktadır [178]. Ancak, daha sonraki yapılan sistematik çalışmalarla, adı geçen alt türün Aydın popülasyonları *Protoiurus kinzelbachi*,

Muğla popülasyonu ise *Protoiurus kraepelini* olarak tanımlanmıştır [60]. Bu açıdan bizim sonuçlarımız, Özkan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile karşılaştırılabilir. Bu çalışmada yayınlanan zehrin elektroforetik profili, bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumludur. Bu tez çalışması ile *P. kraepelini* zehri biyokimyasal ve biyoaktivite açılarından çok daha detaylı olarak incelenmiştir.

Literatürden yine ülkemizde akrep zehirleriyle ilgili yapılan bir diğer çalışmada, *Mesobuthus gibbosus* türü akrebinin zehri izole edilip kromatografik yöntemlerle saflaştırılmış ve elde edilen 5 fraksiyondan ikisi *in vivo* toksisite testlerinde fare ve *Musca domestica* larvaları üzerinde letal etki göstermiştir. Letal fraksiyon 5'in tekrar bir HPLC ayrımı sonucu elde edilen 7 fraksiyondan yalnızca birinde letal etki gözlenmiş ve letal fraksiyon SDS-PAGE'de 28,000 Da molekül ağırlığında tek bir peptit olarak belirlenmiştir. Yine başka iki çalışmada, aynı türün zehir peptitlerinin kolinesteraz ve monoamin oksidaz enzimlerini inhibe edici aktivitesi saptanmıştır [179], [180].

Ülkemiz flora ve fauna açısından oldukça zengindir. Böyle bir coğrafyada, keşfedilmeyi bekleyen çok sayıda doğal ilaç etken maddesi bulunabilir. Bu doğal kaynakların yapısında bulunan biyoaktif maddelerin yapıları belirlenerek, yapılarından ilham alınarak yeni, güçlü ve aktif ilaçların geliştirilmesi mümkündür. Ülkemizde hali hazırdaki bilimsel araştırmalar, bu önemli noktayı görerek yol almaktadır. Bu çalışmalar, ilaç keşfi ve tasarımı konusunda temeller oluşturmaktadırlar. İleri çalışmalar ile, doğal kaynaklardan yeni ve güçlü ilaçların keşfi mümkün olacaktır. Yeni teknolojilerin kullanımı ile bitkisel ya da hayvansal-doğal kaynaklardan aktif madde keşfi daha hızlı ve verimli ilerlemektedir. Bu tarz doğal ürün araştırmalarının yaygınlaştırılarak desteklenmesi ile ülkemiz kendi ilacını üretme noktasında daha hızlı hedefe ulaşabilecektir.

Bu tez çalışması ile ülkemiz için endemik bir akrep olan *P.kraepelini* türünün zehir bileşimi ilk kez karakterize edilmiştir. Elde edilen verilerin, daha sonra yapılacak çalışmalara öncülük etmesi umulmaktadır. Biyoaktivite testlerinde, olumlu sonuç veren peptit ya da peptitlerin tanımlanması, karakterizasyonu ve moleküler mühendisliği ile üretimi yeni bir tanı ya da tedavi ajanının keşfine kadar uzanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Patrick L.Graham, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, FIFTH EDIT. Oxford University.
- [2] K. I. Pungercar J, "Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2," *Toxicon*, vol. 7, pp. 871–892, **2007**.
- [3] R. J. Lewis and M. L. Garcia, "Therapeutic potential of venom peptides.," *Natural Review of Drug Discovery*, vol. 2, no. 10, pp. 790–802, **2003**.
- [4] A. Ménez, R. Stöcklin, and D. Mebs, "'Venomics' or: The venomous systems genome project," *Toxicon*, vol. 47, no. 3, pp. 255–259, **2006**.
- [5] G. N. and A. C. M. C. Jorge Hernandez Fernandez, "Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugstle," vol. 4, pp. 554–563, **2004**.
- [6] M. McIntosh, L. J. Cruz, M. W. Hunkapiller, W. R. Gray, and B. M. Olivera, "Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*," *Archive of Biochemistry and Biophys.*, vol. 218, no. 1, pp. 329–334, Oct. **1982**.
- [7] R. B. Cunha, *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*. InTech, **2013**.
- [8] A. E. Paterson I, "Replies to The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates," *Science (New York, N.Y.)*, 2005. [Online]. Available: <https://www.sciencemag.org/content/310/5747/451/reply>. [Accessed: 01-Jun-**2015**].
- [9] I. Vetter, J. L. Davis, L. D. Rash, R. Anangi, M. Mobli, P. F. Alewood, R. J. Lewis, and G. F. King, "Venomics: A new paradigm for natural products-based drug discovery," *Amino Acids*, vol. 40, no. 1, pp. 15–28, **2011**.
- [10] T. E. Heinen and A. B. Gorini da Veiga, "Arthropod venoms and cancer," *Toxicon*, vol. 57, no. 4, pp. 497–511, 2011.
- [11] P. L. Harrison, M. a. Abdel-Rahman, K. Miller, and P. N. Strong, "Antimicrobial peptides from scorpion venoms," *Toxicon*, vol. 88, pp. 115–137, **2014**.

- [12] E. Ortiz, G. B. Gurrola, E. F. Schwartz, and L. D. Possani, "Scorpion venom components as potential candidates for drug development," *Toxicon*, vol. 93, no. 0, pp. 125–135, Jan. **2015**.
- [13] C. Goudet, C.-W. Chi, and J. Tytgat, "An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch," *Toxicon*, vol. 40, no. 9, pp. 1239–1258, Sep. **2002**.
- [14] J. Shao, N. Kang, Y. Liu, S. Song, C. Wu, and J. Zhang, "Purification and characterization of an analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch.," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 21, no. 12, pp. 1266–71, Dec. **2007**.
- [15] Polis G.A., *The Biology of Scorpions*. Palo Alto, California: Stanford University Press, **1990**.
- [16] H. W. Tedford, B. L. Sollod, F. Maggio, and G. F. King, "Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists.," *Toxicon*, vol. 43, no. 5, pp. 601–18, Apr. **2004**.
- [17] B. G. Fry, K. Roelants, D. E. Champagne, H. Scheib, J. D. A. Tyndall, G. F. King, T. J. Nevalainen, J. A. Norman, R. J. Lewis, R. S. Norton, C. Renjifo, and R. C. R. de la Vega, "The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms.," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 10, pp. 483–511, Jan. **2009**.
- [18] J. A. Veiga, A.B.G., Bergeri, M., Guimarães, *Animal Toxins: State Of The Art: Perspectives In Health And Biotechnology*. UFMG: Belo Horizonte, **2009**.
- [19] N. Marsh and V. Williams, "Practical applications of snake venom toxins in haemostasis.," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1171–81, Jun. **2005**.
- [20] L. D. Possani and R. C. Rodríguez de la Vega, "Scorpion Venom Peptides," in *Handbook of Biologically Active Peptides*, 1st ed., A. J. Kastin, Ed. San Diego, pp. 339–35, **2006**,
- [21] F. Caliskan, "Scorpion Venom Research Aroun the World: Turkish Scorpions," in *Scorpion Venoms*, P. Gopalakrishnakone, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1–19. , **2014**
- [22] "What ' S in a Venom ? Venoms : Cocktails of Toxic How Do Venom."
- [23] H. E.-D. M. Omar, "The biological and medical significance of poisonous animals," *Journal of Biology and Earth Sciences*, vol. 3, no. 1. pp. M25–M41, 24-Apr-**2013**.

- [24] N. R. Casewell, W. Wüster, F. J. Vonk, R. a. Harrison, and B. G. Fry, "Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 28, no. 4, pp. 219–229, **2013**.
- [25] "Animal Venom." [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/?title=venom>. [Accessed: 01-Jan-**2015**].
- [26] L. J. Cruz, W. R. Gray, B. M. Olivera, R. D. Zeikus, L. Kerr, D. Yoshikami, and E. Moczydlowski, "Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels," *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 16, pp. 9280–9288, **1985**.
- [27] R. S. Norton, "Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel," *Toxicon*, vol. 29, no. 9. pp. 1051–1084, **1991**.
- [28] W. A. Catterall, "Binding of scorpion toxin to receptor sites associated with sodium channels in frog muscle. Correlation of voltage-dependent binding with activation.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 74, no. 3, pp. 375–391, **1979**.
- [29] G. M. Nicholson, M. Willow, M. E. Howden, and T. Narahashi, "Modification of sodium channel gating and kinetics by versutoxin from the Australian funnel-web spider *Hadronyche versuta*," *Pflugers Arch.*, vol. 428, no. 3–4, pp. 400–409, **1994**.
- [30] D. O. Omecinsky, K. E. Holub, M. E. Adams, and M. D. Reilly, "Three-dimensional structure analysis of mu-agatoxins: further evidence for common motifs among neurotoxins with diverse ion channel specificities.," *Biochemistry*, vol. 35, no. 9, pp. 2836–2844, **1996**.
- [31] K. J. Shon, B. M. Olivera, M. Watkins, R. B. Jacobsen, W. R. Gray, C. Z. Floresca, L. J. Cruz, D. R. Hillyard, A. Brink, H. Terlau, and D. Yoshikami, "mu-Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes.," *J. Neurosci.*, vol. 18, no. 12, pp. 4473–4481, **1998**.
- [32] "World' deadliest scorpion." [Online]. Available: <http://myscienceacademy.org>. [Accessed: 01-Jan-**2015**].
- [33] "Disulfide Linkage Why Venomics ? From Venoms To Drugs." **2015**
- [34] D. Legros, D. Ochola, N. Lwanga, and G. Guma, "Antibiotic sensitivity of endemic *Shigella* in Mbarara, Uganda.," *East Afr. Med. J.*, vol. 75, no. 3, pp. 160–1, Mar. **1998**.
- [35] E. A. Yağmur, "Güneydoğu Anadolu Akrep (Scorpiones) Faunasi: Sistematığı Ve Zoocoğrafyası," Ege Üniversitesi, **2011**.

- [36] J. L. Cloudsley-Thompson and C. Constantinou, "How does the scorpion *Euscorpium flavicaudis* (Deg.) manage to survive in Britain?," *Int. J. Biometeorol.*, vol. 27, no. 2, pp. 87–92, Jun. **1983**.
- [37] "Scorpion anatomy." [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki>. [Accessed: 01-Jan-**2015**].
- [38] F. STAHLAVSKY, "BOOK REVIEW: Stockmann R. & Ythier E. 2010: *Scorpions of the World*," *Eur. J. Entomol.*, vol. 110, no. 3, pp. 400–400, Jul. **2013**.
- [39] G. Dupré, "Conspectus Genericus Scorpionorum 1758-2006 (Arachnida: Scorpiones)."
- [40] Stahnke HL, "Arizona's lethal scorpion," *Arizona Medicinal*, **1972**.
- [41] C. T. Kloock, A. Kubli, and R. Reynolds, "Ultraviolet light detection: a function of scorpion fluorescence," *J. Arachnol.*, vol. 38, no. 3, pp. 441–445, Dec. **2010**.
- [42] V. Frost, L., Butler, D. R., O'Dell B. & Fet, "A coumarin as a fluorescent compound in scorpions," *Scorpions*, pp. 365–368, **2001**.
- [43] Ö. Özkan and K. Z. Karaer, "The Biology of Scorpions," *Türk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.*, vol. 64, no. 1, pp. 51–60, **2007**.
- [44] Ş. Oytun, *Tıbbi Entomoloji*, 3rd ed. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, **1969**.
- [45] "No Title." [Online]. Available: www.uniprot.org. [Accessed: 01-Jan-**2015**].
- [46] G. Corzo, P. Escoubas, E. Villegas, K. J. Barnham, W. He, R. S. Norton, and T. Nakajima, "Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*," *Biochem. J.*, vol. 359, no. Pt 1, pp. 35–45, Oct. **2001**.
- [47] A. Verdonck, S. Bosteels, J. Desmet, L. Moerman, W. Noppe, J. Willems, J. Tytgat, and J. van der Walt, "A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: buthidae)," *Cimbebasia*, vol. 16, pp. 247–260, Jan. **2000**.
- [48] B. Gao, J. Xu, M. del C. Rodriguez, H. Lanz-Mendoza, R. Hernández-Rivas, W. Du, and S. Zhu, "Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion *Mesobuthus eupeus*," *Biochimie*, vol. 92, no. 4, pp. 350–9, Apr. **2010**.
- [49] M. Veiseh, P. Gabikian, S.-B. Bahrami, O. Veiseh, M. Zhang, R. C. Hackman, A. C. Ravanpay, M. R. Stroud, Y. Kusuma, S. J. Hansen, D. Kwok, N. M. Munoz, R. W. Sze, W. M. Grady, N. M. Greenberg, R. G.

- Ellenbogen, and J. M. Olson, "Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 14, pp. 6882–8, Jul. **2007**.
- [50] V. Chi, H. Lui, S. Sin, S. A. I. Lung, J. Kan, S. Pu, K. N. Hung, G. Kat, and K. Leung, "Invasion of Human Glioma Cells Is Regulated by Multiple Chloride Channels Including ClC-3," *Anticancer Res.*, vol. 30, pp. 4515–4524, **2010**.
- [51] J. A. DeBin, J. E. Maggio, and G. R. Strichartz, "Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 264, no. 2, pp. C361–C369, Feb. **1993**.
- [52] G. Gimenez-gallego, M. A. Naviat, J. P. Reuben, G. M. Katz, G. J. Kaczorowski, and M. L. Garcia, "Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels," *PNAS*, vol. 85, no. May 1988, pp. 3329–3333, **1988**.
- [53] J. Eng, W. A. Kleinman, L. Singh, G. Singh, and J.-P. Raufman, "Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 11, Apr. **1992**.
- [54] R. Göke, H. C. Fehmann, T. Linn, H. Schmidt, M. Krause, J. Eng, and B. Göke, "Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 26, pp. 19650–5, Sep. **1993**.
- [55] A. Bond, "Exenatide (Byetta) as a novel treatment option for type 2 diabetes mellitus.," *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)*, vol. 19, no. 3, pp. 281–4, Jul. **2006**.
- [56] T. Perry and N. H. Greig, "The glucagon-like peptides: a new genre in therapeutic targets for intervention in Alzheimer's disease.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 4, no. 6, pp. 487–496, **2002**.
- [57] V. Marx, "Watching peptide drugs grow up," *Chem. Eng. News*, vol. 83, no. 11, pp. 17–24, **2005**.
- [58] F. Yağmur, E.A., Söleğlad, M.E., Fet, V., Kovarik, "Etudes on iurids, VIII. A new Protoiurus species from the Hıdırellez Cave in Antalya, Turkey (Scorpiones: Iuridae)," *Euscorpius*, **2015**.
- [59] Özkan, Ö., Karaer, Z.K., "The Scorpions In Turkey," *Türk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.*, pp. 55–62, **2003**.

- [60] M. E. Sologlad, V. Fet, F. Kovařík, and E. A. Yağmur, "Etudes on iurids, V. Further revision of *Iurus* Thorell, 1876 (Scorpiones: Iuridae), with a description of a new genus and two new species," *Euscorpius*, no. 143, **2012**.
- [61] "Taxonomical updates in The Scorpion Files for Iuridae (2008)." [Online]. Available: http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/iuridae_updates.pdf. [Accessed: 30-May-2015].
- [62] X.-C. Zeng, G. Corzo, and R. Hahin, "Scorpion venom peptides without disulfide bridges.," *IUBMB Life*, vol. 57, no. 1, pp. 13–21, Jan. **2005**.
- [63] G. F. King and M. C. Hardy, "Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests.," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 58, pp. 475–96, Jan. **2013**.
- [64] N. L. Daly and D. J. Craik, "Bioactive cystine knot proteins," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 15, no. 3. pp. 362–368, Jun-**2011**.
- [65] N. J. Saez, S. Senff, J. E. Jensen, S. Y. Er, V. Herzig, L. D. Rash, and G. F. King, "Spider-venom peptides as therapeutics," *Toxins (Basel)*., vol. 2, no. 12, pp. 2851–2871, **2010**.
- [66] M. C. Gwee, S. Nirathanan, H.-E. Khoo, P. Gopalakrishnakone, R. M. Kini, and L.-S. Cheah, "Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins," *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 29, no. 9, pp. 795–801, Sep. **2002**.
- [67] Martin-Eauclaire, M.F, Couraud, F., *Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms*. New York: In Handk Neurotoxicology, **1995**.
- [68] G. J. Müller, "Scorpionism in South Africa. A report of 42 serious scorpion envenomations.," *S. Afr. Med. J.*, vol. 83, no. 6, pp. 405–11, Jun. **1993**.
- [69] D. D. Simard, J.M., Watt, *Venoms and toxins*. Stanford, CA: Stanford University Press, **1990**.
- [70] M. a. Abdel-Rahman, V. Quintero-Hernandez, and L. D. Possani, "Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae)," *Toxicon*, vol. 74, pp. 193–207, **2013**.
- [71] C. Beeton, G. A. Gutman, and K. G. Chandy, "Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides," in *Handbook of Biologically Active Peptides*, pp. 403–414, **2006**

- [72] H.-W. (Ben) Liu, L. Mander, G. Appendino, G. Fontana, and F. Pollastro, "Natural Products Drug Discovery," in *Comprehensive Natural Products II*, **2010**, pp. 205–236.
- [73] K. . Lam, "New aspects of natural products in drug discovery.," *Trends Microbiol.*, vol. 15, no. 6, pp. 279–89, **2007**.
- [74] J. Pan, "New paradigm for drug discovery based on network pharmacology," *Zhongguo Xinyao yu Linchuang Zazhi*, vol. 28, no. 10, pp. 721–726, **2009**.
- [75] L. D. Possani, E. Merino, M. Corona, F. Bolivar, and B. Becerril, "Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels.," *Biochimie*, vol. 82, no. 9–10, pp. 861–8, Jan. **2000**.
- [76] M. D. L.D Possani, B Becerril, J Tytgat, "High affinity scorpion toxins for studying potassium and sodium channels," in *Ion Channel Localization, Methods and Protocols*, Totowa, New Jersey: Humana Press, **2001**, pp. 145–165.
- [77] M. J. Jablonsky, P. L. Jackson, and N. R. Krishna, "Solution structure of an insect-specific neurotoxin from the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing.," *Biochemistry*, vol. 40, no. 28, pp. 8273–82, Jul. **2001**.
- [78] M. J. Windley, V. Herzig, S. A. Dziemborowicz, M. C. Hardy, G. F. King, and G. M. Nicholson, "Spider-venom peptides as bioinsecticides.," *Toxins (Basel)*, vol. 4, no. 3, pp. 191–227, Mar. **2012**.
- [79] M. Zasloff, "Antimicrobial peptides of multicellular organisms.," *Nature*, vol. 415, no. 6870, pp. 389–95, Jan. **2002**.
- [80] "The Antimicrobial Peptides Database." [Online]. Available: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. [Accessed: 01-Jan-**2015**].
- [81] G. Wang, X. Li, and Z. Wang, "APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. SUPPL. 1, pp. 933–937, **2009**.
- [82] R. Conde, F. Z. Zamudio, M. H. Rodríguez, and L. D. Possani, "Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom," *FEBS Lett.*, vol. 471, no. 2–3, pp. 165–168, Apr. **2000**.
- [83] L. Kuhn-Nentwig, "Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, no. 12, pp. 2651–68, Dec. **2003**.

- [84] X.-C. Zeng, L. Zhou, W. Shi, X. Luo, L. Zhang, Y. Nie, J. Wang, S. Wu, B. Cao, and H. Cao, "Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*," *Peptides*, vol. 45, pp. 28–34, Jul. **2013**.
- [85] A. Torres-Larios, G. B. Gurrola, F. Z. Zamudio, and L. D. Possani, "Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 16, pp. 5023–5031, Aug. **2000**.
- [86] L. Moerman, S. Bosteels, W. Noppe, J. Willems, E. Clynen, L. Schoofs, K. Thevissen, J. Tytgat, J. Van Eldere, J. Van Der Walt, and F. Verdonck, "Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa," *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 19, pp. 4799–810, Oct. **2002**.
- [87] P. Escoubas, "Mass spectrometry in toxinology: A 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms," *Toxicon*, vol. 47, no. 6, pp. 609–613, **2006**.
- [88] P. Favreau, L. Menin, S. Michalet, F. Perret, O. Cheneval, M. Stöcklin, P. Bulet, and R. Stöcklin, "Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen," *Toxicon*, vol. 47, no. 6, pp. 676–687, **2006**.
- [89] W. R. Lourenço, "Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities," *Biogeographica*, pp. 155–160, **1994**.
- [90] J. Deshane, C. C. Garner, and H. Sontheimer, "Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 6, pp. 4135–44, Feb. **2003**.
- [91] J. L. Arbiser, T. Kau, M. Konar, K. Narra, R. Ramchandran, S. A. Summers, C. J. Vlahos, K. Ye, B. N. Perry, W. Matter, A. Fischl, J. Cook, P. A. Silver, J. Bain, P. Cohen, D. Whitmire, S. Furness, B. Govindarajan, and J. P. Bowen, "Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis," *Blood*, vol. 109, no. 2, pp. 560–5, Jan. **2007**.
- [92] J. A. DeBin and G. R. Strichartz, "Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*," *Toxicon*, vol. 29, no. 11, pp. 1403–8, Jan. **1991**.
- [93] G. Lippens, J. Najib, S. J. Wodak, and A. Tartar, "NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels," *Biochemistry*, vol. 34, no. 1, pp. 13–21, Jan. **1995**.

- [94] A. N. Mamelak and D. B. Jacoby, "Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601).," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 4, no. 2, pp. 175–86, Mar. **2007**.
- [95] L. Soroceanu, T. J. . J. Manning, and H. Sontheimer, "Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl⁻ and K⁺ Ion Channel Blockers," *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 14, pp. 5942–5954, Jul. **1999**.
- [96] M. B. McFerrin and H. Sontheimer, "A role for ion channels in glioma cell invasion.," *Neuron Glia Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 39–49, Feb. **2006**.
- [97] D. B. Jacoby, E. Dyskin, M. Yalcin, K. Kesavan, W. Dahlberg, J. Ratliff, E. W. Johnson, and S. A. Mousa, "Potent pleiotropic anti-angiogenic effects of TM601, a synthetic chlorotoxin peptide.," *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 39–46, Jan. **2010**.
- [98] W. Y. Chueng, "Calmodulin: an overview, Fed.," *Fed. Proc*, pp. 2253–2257, **1982**.
- [99] L. Holle, W. Song, E. Holle, Y. Wei, T. Wagner, and X. Yu, "A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin/avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro and in vivo.," *Int. J. Oncol.*, vol. 22, no. 1, pp. 93–8, Jan. **2003**.
- [100] D.-O. Moon, S.-Y. Park, M.-S. Heo, K.-C. Kim, C. Park, W. S. Ko, Y. H. Choi, and G.-Y. Kim, "Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 6, no. 12, pp. 1796–807, Dec. **2006**.
- [101] S. Ghavami, A. Asoodeh, T. Klonisch, A. J. Halayko, K. Kadkhoda, T. J. Krocak, S. B. Gibson, E. P. Booy, H. Naderi-Manesh, and M. Los, "Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 1005–22, Jul. **2008**.
- [102] J. G. McGivern, "Advantages of voltage-gated ion channels as drug targets.," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 11, no. 3, pp. 265–71, Mar. **2007**.
- [103] N. A. Castle, "Pharmacological modulation of voltage-gated potassium channels as a therapeutic strategy.," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 20, no. 11, pp. 1471–503, Nov. **2010**.
- [104] J. Daniel L. Minor, "Overview- Function and Three dimensional structures of ion channels," in *Handbook of Cellular Signaling*, San Francisco: University of California, **2011**.

- [105] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, **2001**.
- [106] S. K. Bagal, a D. Brown, P. J. Cox, K. Omoto, R. M. Owen, D. C. Pryde, B. Sidders, S. E. Skerratt, E. B. Stevens, R. I. Storer, and N. a Swain, "Ion channels as therapeutic targets: A drug discovery perspective," *J. Med. Chem.*, vol. 56, pp. 593–624, **2013**.
- [107] F. et al. Lang, *Cell. Physiol. Biochem.* **2000**.
- [108] B. Dallaporta, T. Hirsch, S. A. Susin, N. Zamzami, N. Larochette, C. Brenner, I. Marzo, and G. Kroemer, "Potassium leakage during the apoptotic degradation phase.," *J. Immunol.*, vol. 160, no. 11, pp. 5605–15, Jun. **1998**.
- [109] E. Andersson, U. Tryggvason, Q. Deng, S. Friling, Z. Alekseenko, B. Robert, T. Perlmann, and J. Ericson, "Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons.," *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 393–405, Jan. **2006**.
- [110] S. Wang, G. Fusaro, J. Padmanabhan, and S. P. Chellappan, "Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression.," *Oncogene*, vol. 21, no. 55, pp. 8388–96, Dec. **2002**.
- [111] S. Wang, B. Zhang, and D. V Faller, "Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth.," *EMBO J.*, vol. 21, no. 12, pp. 3019–28, Jun. **2002**.
- [112] C. V Remillard and J. X.-J. Yuan, "Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 286, no. 1, pp. L49–67, Jan. **2004**.
- [113] E. Diego-García, S. Peigneur, S. Debaveye, E. Gheldof, J. Tytgat, and F. Caliskan, "Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae).," *Toxicon*, vol. 61, pp. 72–82, Jan. **2013**.
- [114] A. Vassilevski, "Purification and Characterization of Biologically Active Peptides from Spider Venoms," in *Peptidomics Methods and Protocols*, M. Soloviev, Ed. New York: Humana Press.
- [115] Y. Ma, Y. Zhao, R. Zhao, W. Zhang, Y. He, Y. Wu, Z. Cao, L. Guo, and W. Li, "Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis.," *Proteomics*, vol. 10, no. 13, pp. 2471–85, Jul. **2010**.
- [116] E. Diego-García, S. Peigneur, E. Clynen, T. Marien, L. Czech, L. Schoofs, and J. Tytgat, "Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavimanus* (Scorpionidae Latreille 1802):

- transcriptome, venomics and function.," *Proteomics*, vol. 12, no. 2, pp. 313–28, Jan. **2012**.
- [117] J. Xu, X. Zhang, Z. Guo, J. Yan, L. Yu, X. Li, X. Xue, and X. Liang, "Short-chain peptides identification of scorpion *Buthus martensi* Karsch venom by employing high orthogonal 2D-HPLC system and tandem mass spectrometry.," *Proteomics*, vol. 12, no. 19–20, pp. 3076–84, Oct. **2012**.
- [118] K. Luna-Ramírez, V. Quintero-Hernández, L. Vargas-Jaimes, C. V. F. Batista, K. D. Winkel, and L. D. Possani, "Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity.," *Toxicon*, vol. 63, pp. 44–54, Mar. **2013**.
- [119] L. L. Valdez-Velázquez, V. Quintero-Hernández, M. T. Romero-Gutiérrez, F. I. V Coronas, and L. D. Possani, "Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*.," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e66486, Jan. **2013**.
- [120] E. F. Schwartz, E. Diego-Garcia, R. C. Rodríguez de la Vega, and L. D. Possani, "Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones).," *BMC Genomics*, vol. 8, p. 119, Jan. **2007**.
- [121] A. Kozminsky-Atias, A. Bar-Shalom, D. Mishmar, and N. Zilberberg, "Assembling an arsenal, the scorpion way.," *BMC Evol. Biol.*, vol. 8, no. 1, p. 333, Jan. **2008**.
- [122] G. D'Suze, E. F. Schwartz, B. I. García-Gómez, C. Sevcik, and L. D. Possani, "Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*.," *Biochimie*, vol. 91, no. 8, pp. 1010–9, Aug. **2009**.
- [123] Y. Ma, R. Zhao, Y. He, S. Li, J. Liu, Y. Wu, Z. Cao, and W. Li, "Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal.," *BMC Genomics*, vol. 10, p. 290, Jan. **2009**.
- [124] E. C. N. Silva, T. S. Camargos, A. Q. Maranhão, I. Silva-Pereira, L. P. Silva, L. D. Possani, and E. F. Schwartz, "Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*.," *Toxicon*, vol. 54, no. 3, pp. 252–61, Sep. **2009**.
- [125] Z. Ruiming, M. Yibao, H. Yawen, D. Zhiyong, W. Yingliang, C. Zhijian, and L. Wenxin, "Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components.," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, p. 452, Jan. **2010**.

- [126] D. Morgenstern, B. H. Rohde, G. F. King, T. Tal, D. Sher, and E. Zlotkin, "The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*," *Toxicon*, vol. 57, no. 5, pp. 695–703, Apr. **2011**.
- [127] Y. Ma, Y. He, R. Zhao, Y. Wu, W. Li, and Z. Cao, "Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal.," *J. Proteomics*, vol. 75, no. 5, pp. 1563–76, Feb. **2012**.
- [128] M. Rendón-Anaya, L. Delaye, L. D. Possani, and A. Herrera-Estrella, "Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species.," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e43331, Jan. **2012**.
- [129] D. D. Almeida, K. C. Scortecchi, L. S. Kobashi, L. F. Agnez-Lima, S. R. B. Medeiros, A. A. Silva-Junior, I. de L. M. Junqueira-de-Azevedo, and M. de F. Fernandes-Pedrosa, "Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey.," *BMC Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 362, Jan. **2012**.
- [130] "Mass Spectrometry." [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry. [Accessed: 18-Jun-**2015**].
- [131] "Kütle Spektrometresi." [Online]. Available: http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle_1.pdf. [Accessed: 18-Jun-**2015**].
- [132] "Kütle Spektrumun Tanımlanması ve Uygulanması." [Online]. Available: http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle_2.pdf. [Accessed: 18-Jun-**2015**].
- [133] "mass spectrometry." [Online]. Available: http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/340/348272/Instructor_Resources/Chapter_12/Wade12.ppt. [Accessed: 01-Jan-**2015**].
- [134] Alfred Nobel Dr.Hercules, "Quick Start™Bradford Protein Assay," CA, **2000**.
- [135] L. Songping, "Protocols for Peptidomic Analysis of Spider Venoms," in *Peptidomics Methods and Protocols*, M. Soloviev, Ed. New York: Humana Press, **2010**.
- [136] M.-I. Aguilar, *HPLC of Peptides and Proteins*, vol. 251. New Jersey: Humana Press, **2003**.
- [137] a a Vassilevski, S. a Kozlov, and E. V Grishin, "Molecular diversity of spider venom.," *Biochemistry. (Mosc)*, vol. 74, no. 13, pp. 1505–1534, **2009**.

- [138] "BioRad." [Online]. Available: <http://www.bio-rad.com>. [Accessed: 07-Dec-**2014**].
- [139] H. Schägger, "Tricine-SDS-PAGE.," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 1, pp. 16–22, Jan. **2006**.
- [140] "Agilent Technologies." [Online]. Available: <http://www.chem.agilent.com>. [Accessed: 07-Dec-**2014**].
- [141] N. Temizkan, G.Arda, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevi, **2007**.
- [142] "FluxOR Potassium Ion Channel Assay." [Online]. Available: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/fluxor_potassium_ion_channel_assay_man.pdf. [Accessed: 19-Jun-**2015**].
- [143] "FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay." [Online]. Available: <https://www.lifetechnologies.com/tr/en/home/life-science/drug-discovery/target-and-lead-identification-and-validation/ion-channel-biology/cell-based-ion-channel-assays/fluorescent-fluxor-trade-.html>. [Accessed: 19-Jun-**2015**].
- [144] "alamarBlue® Cell Viability Assay Protocol." [Online]. Available: <https://www.lifetechnologies.com>. [Accessed: 01-Jan-**2015**].
- [145] I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. W. Hancock, "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 2, pp. 163–75, Jan. **2008**.
- [146] B. Rates, K. K. F. Ferraz, M. H. Borges, M. Richardson, M. E. De Lima, and A. M. C. Pimenta, "Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity.," *Toxicon*, vol. 52, no. 5, pp. 611–8, Oct. **2008**.
- [147] R. C. Rodríguez de la Vega, E. F. Schwartz, and L. D. Possani, "Mining on scorpion venom biodiversity.," *Toxicon*, vol. 56, no. 7, pp. 1155–61, Dec. **2010**.
- [148] J. J. Smith, A. Jones, and P. F. Alewood, "Mass landscapes of seven scorpion species: The first analyses of Australian species with 1,5-DAN matrix.," *J. Venom Res.*, vol. 3, pp. 7–14, Jan. **2012**.
- [149] M. Delepierre, J. Boisbouvier, and L. D. Possani, "Pi7 , an Orphan Peptide from the Scorpion *Pandinus imperator* : A ¹H-NMR Analysis Using a Nano-NMR Probe," *Biochemistry*, vol. 38, no. 51, pp. 16756–16765, **1999**.

- [150] E. Erdeş, "PEPTIDOMIC CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITY SCREENING OF LEIURUS ABDULLAHBAYRAMI (SCORPIONES: BUTHIDAE) VENOM," *METU*, **2015**.
- [151] M. V Blagosklonny, "Molecular theory of cancer.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 4, no. 6, pp. 621–7, Jun. **2005**.
- [152] A. Díaz-García, L. Morier-Díaz, Y. Frión-Herrera, H. Rodríguez-Sánchez, Y. Caballero-Lorenzo, D. Mendoza-Llanes, Y. Riquenes-Garlobo, and J. A. Fraga-Castro, "In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines.," *J. Venom Res.*, vol. 4, pp. 5–12, Jan. **2013**.
- [153] K. DA Fritz H, Seely D, "Green Tea and Lung Cancer: A Systematic Review," *Integr Cancer Ther*, pp. 7–74, **2013**.
- [154] E. Meiyanto, A. Hermawan, and Anindyajati, "Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents.," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 13, no. 2, pp. 427–36, Jan. **2012**.
- [155] A. Gomes, P. Bhattacharjee, R. Mishra, A. K. Biswas, S. C. Dasgupta, and B. Giri, "Anticancer potential of animal venoms and toxins.," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 48, no. 2, pp. 93–103, Feb. **2010**.
- [156] Xiao GY., "Advance of research on antitumor activity of scorpion venom," *Chin J Cancer biother*, vol. 6, pp. 161–163, **1990**.
- [157] S. Das Gupta, A. Debnath, A. Saha, B. Giri, G. Tripathi, J. R. Vedasiromoni, A. Gomes, and A. Gomes, "Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562.," *Leuk. Res.*, vol. 31, no. 6, pp. 817–25, Jun. **2007**.
- [158] Z. L. Yang CX, Dai SM, "Effect of polypeptide purified from *Buthus martensi kirsch*(PBMK) on proliferation and apoptosis in human hepatoma cell line," *Cancer Res. Prev. Treat.*, pp. 184–186, **2002**.
- [159] Y.-F. Liu, J. Hu, J.-H. Zhang, S.-L. Wang, and C.-F. Wu, "Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch.," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 32, no. 4, pp. 317–27, Nov. **2002**.
- [160] H. Ouadid-Ahidouch, M. Roudbaraki, A. Ahidouch, P. Delcourt, and N. Prevarskaya, "Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 316, no. 1, pp. 244–51, Mar. **2004**.
- [161] R. Gao, Y. Zhang, and P. Gopalakrishnakone, "Purification and N-terminal sequence of a serine proteinase-like protein (BMK-CBP) from

- the venom of the Chinese scorpion (*Buthus martensii* Karsch).,” *Toxicon*, vol. 52, no. 2, pp. 348–53, Aug. **2008**.
- [162] J. M. Andrews, “Determination of minimum inhibitory concentrations,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, no. suppl 1, pp. 5–16, Jul. **2001**.
- [163] S. Cociancich, M. Goyffon, F. Bontems, P. Bulet, F. Bouet, A. Menez, and J. Hoffmann, “Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 194, no. 1, pp. 17–22, Jul. **1993**.
- [164] L. Ehret-Sabatier, D. Loew, M. Goyffon, P. Fehlbaum, J. A. Hoffmann, A. van Dorsselaer, and P. Bulet, “Characterization of Novel Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Scorpion Blood,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 47, pp. 29537–29544, Nov. **1996**.
- [165] L. Dai, G. Corzo, H. Naoki, M. Andriantsiferana, and T. Nakajima, “Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 293, no. 5, pp. 1514–22, May **2002**.
- [166] K. . S. S. Y. . K. K. . L. S. S. . H. K. S. . K. Y. Lee, “Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 323, pp. 712–719, **2004**.
- [167] C. Dai, Y. Ma, Z. Zhao, R. Zhao, Q. Wang, Y. Wu, Z. Cao, and W. Li, “Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 11, pp. 3967–72, Nov. **2008**.
- [168] E. T. de Melo, A. B. Estrela, E. C. G. Santos, P. R. L. Machado, K. J. S. Farias, T. M. Torres, E. Carvalho, J. P. M. S. Lima, A. A. Silva-Júnior, E. G. Barbosa, and M. de F. Fernandes-Pedrosa, “Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin,” *Peptides*, vol. 68, pp. 3–10, Jun. **2015**.
- [169] Z. Zhao, Y. Ma, C. Dai, R. Zhao, S. Li, Y. Wu, Z. Cao, and W. Li, “Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 8, pp. 3472–7, Aug. **2009**.
- [170] O. Ozkan and G. Ciftci, “Individual variation in the protein profile of the venom of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832, Scorpiones: Buthidae) from Turkey,” *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 16, no. 3, pp. 505–508, **2010**.

- [171] O. Ozkan and A. Carhan, "The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom.," *Toxicon*, vol. 52, no. 2, pp. 375–9, Aug. **2008**.
- [172] O. Ozkan, S. Adiguzel, S. Kar, M. Kurt, S. Yakistiran, Y. Cesaretli, M. Orman, and Z. Karaer, "Effects of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) (scorpiones: buthidae) venom on rats: correlation among acetylcholinesterase activities and electrolytes levels," *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 69–81, **2007**.
- [173] F. Caliskan, E. Ergene, I. Sogut, I. Hatipoglu, A. Basalp, H. Sivas, and G. Kanbak, "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 specific monoclonal antibodies.," *Toxicon*, vol. 76, pp. 350–61, Dec. **2013**.
- [174] F. Caliskan, B. I. García, F. I. V Coronas, C. V. F. Batista, F. Z. Zamudio, and L. D. Possani, "Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes.," *Toxicon*, vol. 48, no. 1, pp. 12–22, Jul. **2006**.
- [175] F. Caliskan, V. Quintero-Hernández, R. Restano-Cassulini, F. I. Coronas-Valderrama, G. Corzo, and L. D. Possani, "Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na(+)-channel α -type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom.," *Biochimie*, vol. 95, no. 6, pp. 1216–22, Jun. **2013**.
- [176] F. Caliskan, V. Quintero-Hernández, R. Restano-Cassulini, C. V. F. Batista, F. Z. Zamudio, F. I. Coronas, and L. D. Possani, "Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: general characterization of the venom and description of Bu1, a potent mammalian Na⁺-channel α -toxin.," *Toxicon*, vol. 59, no. 3, pp. 408–15, Mar. **2012**.
- [177] N. A. Keskin and H. Koç, "A study on venom proteins of *lurus dufourei* asiaticus Birula, 1903 (Scorpiones: luridae).," *Turkiye Parazitol. Derg.*, vol. 30, no. 1, pp. 59–61, Jan. **2006**.
- [178] K. Z. Ozkan, Ö., Ciftci, G., Pekmezci, Z.P., Kar, S., Uysal, H., Karaer, "Proteins, lethality and in vivo effects of *lurus dufourei* asiaticus scorpion venom," *Toxicon*, pp. 394–399, **2007**.
- [179] G. Ucar, C. Tas, and A. Tümer, "Monoamine oxidase inhibitory activities of the scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) venom peptides.," *Toxicon*, vol. 45, no. 1, pp. 43–52, Jan. **2005**.
- [180] C. Uçar, G., Taş, "CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITIES OF THE SCORPION *MESOBUTHUS GIBBOSUS* (BUTHIDAE) VENOM PEPTIDES," *FABAD J. Pharm. Sci.*, pp. 65–67, **2003**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Tuğba DOĞAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 14.01.1983

Medeni Hali : Evli, bir çocuk

E-posta : tsomay@metu.edu.tr

Adresi : Serhat Mah.1284.sk 3A/16 Yenimahalle-Ankara

Eğitim

Lisans : Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programı, 2001-2006.

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD.(Moleküler Biyoloji), Tez başlığı: “*Detection of Genotoxic Potentials of Some Nitro Compounds Which Are Designed As Drug Agents By Umu-Test System*”, 2006-2009.

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD.(Moleküler Biyoloji), Tez başlığı: “*Protoiurus kraepelini (Scorpiones: Iuridae) Zehrinin Peptidomik Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Taraması*”, 2009-2015.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İleri düzey

İş Deneyimi

Uzman, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvar, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi, 2010-Halen

Deneyim Alanları

Moleküler Biyoloji ve Genetik: Genotoksisite testleri, Kısa zamanlı mutajenite testleri (UMU, Ames, REC), Antimikrobiyal testler, Biyokimya: Kromatografi (HPLC, FPLC), Kütle Spektrometresi, Peptitler, Hayvan Zehirleri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

“Studying General Mass Profile And Identification Of Antimicrobial Spider Venom By Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMSMS)”, H.Ü. BAP, 2014. Bütçe: 18,900 TL

“*Protoiurus kraepelini* Türü Akrep Zehrinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması” Hacettepe Üniversitesi, BAP, 2015. Bütçe: 20,000TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Tuğba Somay Doğan, Ayşenur Biber, Selin Gerekçi, Hazal Hüsnügil, Afife İzbirak, Can Özen (2015). “Bioactivity Of *Protoiurus Kraepelini* (Scorpione: Iuridae) Venom” (Poster Presentation). 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), 09-12 June 2015, A.Ü.

Tuğba Somay Doğan, Selin Gerekçi, Merve Ergenç, Naşit İğci, Duygu Özel Demiralp, Kadir Boğaç Kunt, Can Özen (2014). Molecular Characterization and Peptidomic Analysis of *Protoiurus kraepelini* (Scorpiones:Iuridae) Venom (Poster Presentation). 3.International Congress of the Molecular Biology Association, 10-12 Eylül 2014, İYTE, İZMİR

***Protoiurus kraepelini* (Scorpiones: Iuridae) ZEHRİNİN
PEPTİDOMİK KARAKTERİZASYONU VE BİYOAKTİVİTE
TARAMASI**

**PEPTIDOMIC CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITY
SCREENING OF *Protoiurus kraepelini* (Scorpiones:
Iuridae) VENOM**

TUĞBA DOĞAN

**Prof.Dr.Afife İzbırak
Tez Danışmanı
Doç.Dr.Can ÖZEN
İkinci Danışman**

Hacettepe Üniveristesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015