

**AKREP VENOM PEPTİDLERİNİN KRİSTALİZASYONU,
YAPISAL KARAKTERİZASYONU VE BENZEŞİM
MODELLEMESİ**

**CRYSTALLIZATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION
AND HOMOLOGY MODELING OF SCORPION VENOM
PEPTIDES**

DAMLA KOÇAK

PROF. DR. SÜHEYLA ÖZBEY

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

ETİK

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

- 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.

16/01/2015

DAMLA KOÇAK

ÖZET

AKREP VENOM PEPTİDLERİNİN KRİSTALİZASYONU, YAPISAL KARAKTERİZASYONU VE BENZEŞİM MODELLEMESİ

Damla KOÇAK

Yüksek Lisans, Fizik Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süheyla ÖZBEY

Eş Danışman: Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

Ocak 2015, 85 sayfa

Akrep venomlarının yapılarının aydınlatılması amacıyla yapılan bu tez çalışmasında, aynı familyadan iki farklı akrep cinsinden saflaştırılan peptidler incelenmiştir. Buthidae familyasına ait bu akreplerden birisi *Androctonus crassicauda*, diğeri ise *Buthacus macrocentrus* türü akreptir. Akreplerden alınan venomlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı'nda yüksek performanslı sıvı kromatografi sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır.

Tez kapsamında incelenen peptidlerden biri olan Acra3, *A. crassicauda* cinsi akrepten saflaştırılmıştır. Peptidin molekül ve kristal yapısının X-ışınları kristalografisi ile aydınlatılabilmesi için ilk koşul X-ışınları kırınımı verebilecek tek kristallerin üretilmesidir. Bu amaçla, öncelikle, kristalizasyon deneyleri yapılmış ve tek kristal yapı oluşana kadar farklı koşullar altında deneyler tekrarlanmıştır. Fakat istenilen kristal form elde edilemediği için atomik düzeyde üç boyutlu yapı çözümü gerçekleştirilememiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, çözelti içindeki Acra3 moleküllerinin düşük çözünürlüklü (nanometre boyutunda) yapısal karakterizasyonları için küçük açı X-ışınları saçılması (SAXS) yöntemi kullanılmıştır. Hamburg'da, EMBL P12 BioSAXS demet hattında yapılan deneyde ölçülen SAXS şiddet verileri, farklı programlar üzerinden analiz edilmiştir. Peptid moleküllerinin çözeltideki dağılımına bağlı olarak, kümelenmiş birkaç molekülün jirasyon yarıçapı ve düşük çözünürlüklü moleküler yapısı bulunmuştur. Kristalizasyon ve SAXS deneyleri sadece Acra3 peptidi için uygulanmış, tez kapsamında incelenen *B. macrocentrus* cinsi akrepten saflaştırılan Bu1 peptidi için, Acra3 ile birlikte sadece biyoinformatik modelleme yapılmıştır.

Tez çalışmasının son aşamasında biyoinformatik modelleme ile iki peptidinde iki ve üç boyutlu yapılarının bulunması amaçlanmıştır. Acra3 ve Bu1 peptidinin üç boyutlu tahmini yapılarının belirlenmesi için öncelikle NCBI, EBI ve Swiss Model gibi farklı sunucular üzerinden uygun şablon yapılar bulunmuştur. UniProtKB ve ClustalW2 sunucuları kullanılarak, farklı peptidlerle aralarındaki benzerlikleri görmek için çoklu dizi eşlemesi yapılmış ve iki peptid için de yapılan benzeşim modellemesiyle, peptidlerin üç boyutlu tahmini yapıları elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akrep venomu, nörotoksik peptid, *Androctonus crassicauda*, *Buthacus macrocentrus*, protein kristalizasyonu, SAXS, çoklu dizi eşleme, benzeşim modellemesi.

ABSTRACT

CRYSTALLIZATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND HOMOLOGY MODELING OF SCORPION VENOM PEPTIDES

Damla KOÇAK

Postgraduate, Department of Physics Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Süheyla ÖZBEY

Co-supervisor: Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN

January, 2015, 85 pages

In this study, which was conducted to gather information about the structures of scorpion venoms, two peptides purified from two different types of scorpions of the same family were investigated. Of these scorpions from the Buthidae family, one belongs to the species *Androctonus crassicauda* while the other belongs to *Buthacus macrocentrus*. Venoms taken from the scorpions were purified by using high performance liquid chromatography system in Venom Search Laboratory at Eskişehir Osmangazi University.

Acra3, one of the peptides analyzed within the study, was purified from *Androctonus crassicauda*. The prerequisite for solving the molecule and crystal structure of the peptide by X-ray crystallography is a well-ordered crystal that will diffract x-ray strongly. For this reason, crystallization experiments were performed with the goal of obtaining single crystals. Experiments were repeated under different conditions until a single crystal structure was formed. However,

determination of the three dimensional structure could not be achieved since the crystal was not formed.

As the second part of the study, small angle X-ray scattering (SAXS) method was used for the characterization of low-resolution structure (nanometer size) of Acra3 molecules in solution. SAXS intensity data measured from the experiment which was performed on EMBL P12 BioSAXS beamline in Hamburg were analyzed via different programs. Due to the aggregation in solution, gyration radius and molecular shape of a few aggregated molecules were determined.

For Acra3 peptide, bioinformatics modeling along with crystallization and SAXS experiments were also carried out. On the other hand, for Bu1 peptide only bioinformatics modeling was performed. As the final part of the thesis, it was aimed to estimate these secondary and tertiary structures of both peptides by using bioinformatics approaches. Firstly, convenient template structures were found via different servers such as NCBI, EBI and Swiss model. To see the similarities between our peptides with others, multiple sequence alignment was performed by employing UniProtKB and ClustalW2 servers. Secondly, secondary structures of the peptides were determined by homology modeling performed for each of them.

Key Words: Scorpion venom, neurotoxic peptide, *Androctonus crassicauda*, *Buthacus macrocentrus*, protein crystallization, SAXS, multiple sequence alignment, homology modeling.

TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans tez çalışmamda tüm süreç boyunca bana engin bilgi birikimiyle her konuda yardımcı olan, yol gösteren ve destekleyen danışmanım Prof. Dr. Süheyla ÖZBEY'e,

bana laboratuvarını açtığı için ve peptidlerin saflaştırma çalışmaları süresince yaptığı tüm yardımlardan dolayı Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN ve ekibine,

pozitif yaklaşımından ve verilerin analizleri yapılırken desteğini ve yardımını esirgemeyen Prof. Dr. F. Betül KAYNAK'a,

Hacettepe Üniversitesinde yapılan SAXS çalışmalarında Hecus SWAXS sisteminde alınan ölçümler sırasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Yusuf ÖZCAN'a ve çalışma sırasında teşvikinden dolayı Prof. Dr. Semra İDE'ye,

sinkrotron SAXS deneylerinin yapıldığı EMBL-P12 BioSAXS demet hattından sorumlu Dr. Dmitri SVERGUN'a, bu hatta yapılan deneylerde ölçümleri alan Dr. Anne TUUKKANEN'e,

her an sevgisi ve sıcaklığıyla yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

<u>Sayfa</u>	
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜRLER	v
İÇİNDEKİLER	vi
RESİMLER	viii
GRAFİKLER	ix
ÇİZELGELER	x
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. PEPTİDLERİN SAFLAŞTIRMA ÇALIŞMALARI	3
2.1. Protein Saflaştırma Amacı	3
2.2. Kromatografik Saflaştırma Yöntemleri	3
2.3. Deneysel Çalışmalar	4
2.3.1. Akrep Venomlarının Saflaştırılmasında Kullanılan Kromatografik Yöntemler	4
2.3.2. Akrelerin Toplanması	6
2.3.3. Akrelerin Beslenmesi ve Ham Venomun Eldesi	7
2.3.4. Acra3 Peptidinin Saflaştırılması	9
2.3.5. Bu1 Peptidinin Saflaştırılması	16
3. KRİSTALİZASYON ÇALIŞMALARI	17
3.1. Protein Kristalizasyonunun Temel İlkeleri	17
3.2. Kristalizasyon Teknikleri	19
3.2.1. Batch Kristalizasyonu	19
3.2.2. Sıvı-Sıvı Difüzyonu	19
3.2.3. Buhar Difüzyonu	20

3.2.4. Diyaliz.....	21
3.3. Acra3 Peptidi İle Yapılan Kristalizasyon Deneyleri	22
3.3.1. Icl13 Morpheus Ve Icl14 Pga Tarama Kitleri İle Yapılan Kristalizasyon Denemeleri.....	22
3.3.2. Diğer Kristalizasyon Denemeleri	25
4. KÜÇÜK AÇI X-IŞINI SAÇILMASI (SAXS) YÖNTEMİ İLE YAPISAL ÇALIŞMALAR.....	27
4.1. SAXS Yönteminin Temel İlkeleri.....	27
4.2. SAXS Verilerinin Ölçümü.....	29
4.3. Saçılma Grafiğinin (SAXS Eğrisinin) İncelenmesi	31
4.4. Acra3 Peptidi İle SAXS Deneyleri Ve Analizi.....	36
4.4.1. Hecus SWAXS Sisteminde Yapılan Deneyler	36
4.4.2. PETRAIII P12 BioSAXS Demet Hattında Yapılan Deneyler	47
5. BİYOİNFORMATİK MODELLEME ÇALIŞMALARI.....	54
5.1. Biyoinformatik ve Biyolojik Veri Bankaları.....	54
5.2. Proteinlerin Yapısı ve Temel Özellikleri.....	56
5.2.1. Proteinlerin Birincil ve İkincil Yapıları.....	59
5.2.2. Proteinlerin Üçüncül ve Dördüncül Yapıları	61
5.3. Moleküler Kütle ve Aminoasit Diziliminin Saptanması	61
5.4. Acra3 İçin Çoklu Dizi Eşleme (Multiple Sequence Alignment).....	62
5.5. Bu1 İçin Çoklu Dizi Eşleme (Multiple Sequence Alignment).....	67
5.6. Acra3 ve Bu1 İçin Homolojik Modelleme	69
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ	85

RESİMLER

Sayfa

Resim 2.1. Androctonus crassicauda laboratuvar ortamında	7
Resim 2.2. a) Tenebrio molitor yaşam döngüsü b) Tenebrio molitor	8
Resim 2.3. Elektrostimülasyonla ham venom sağma işlemi	9
Resim 2.4. a) WP300-C18 kolonu b) TSK-jel sülfopropil kolonu.....	10
Resim 3.1. a) Protein çözeltisinin yüklenmesi, b) TTP Labtech Mosquito kristal robotu	23
Resim 3.2. a) Sealing işlemi b) etiketlenen plate	24
Resim 3.3. Kristalizasyon sürecinde karşılaşılan farklı oluşumlar a) berrak damla, b) çökelti.....	25
Resim 3.4. Damla içinde 50 µm boyutundaki kristal yapıya benzer oluşum	26
Resim 4.1. a) Hecus SWAXS sistemi b) Sıvı, toz ve plaka şeklindeki örnekler için kullanılan örnek tutucular	37
Resim 4.2. İkinci SAXS deneylerinin yapıldığı P12 demet hattı [39]	48

GRAFİKLER

Sayfa

Grafik 2.1. 5mg ham venomun ters faz kromatogramı (%0-60).....	13
Grafik 2.2. 31,9 dakika alıkonma süreli peptidin iyon değişim kromatogramı	14
Grafik 2.3. Tuz arıtımı için yapılan Acra3 peptidine ait ters faz kromatogramı.....	15
Grafik 2.4. Acra3 peptidine ait HPLC'den ait alınan kromatogramın saflık gösterimi	15
Grafik 4.1. Acra3_228 saçılma grafiği.....	37
Grafik 4.2. Acra3_229 saçılma grafiği.....	38
Grafik 4.3. Acra3_230 saçılma grafiği.....	38
Grafik 4.4. Acra3_231 saçılma grafiği.....	39
Grafik 4.5. Acra3'e ait dört farklı konsantrasyonun saçılma eğrileri	39
Grafik 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Acra3 örneklerinin Guinier fit grafikleri	41
Grafik 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki Acra3 örneklerinin uzaklık dağılım fonksiyonları	46
Grafik 4.8. a) Acra3 için SR saçılma grafiği PRIMUS b) Acra3 LogI-s GNOM.....	49
Grafik 4.9. Acra3_0009 SR verisinin IGOR üzerinde hesaplanmış uzaklık dağılım fonksiyonu	50
Grafik 4.10. a) Acra3 Guinier analiz PRIMUS b) Acra3 uzaklık dağılım fonksiyonu GNOM	51
Grafik 4.11. DAMMIN programından bulunan Acra3'ün düşük çözünürlüklü modeli	53

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Acra3 peptidinin saflaştırma adımları.....	11
Çizelge 3.1. Kristalizasyon deneyinde kullanılan örneklerin miktarları.....	22
Çizelge 4.1. Acra3 peptidinin örnek ve konsantrasyon değerleri	36
Çizelge 5.1. Acra3'ün NCBI protein-protein blast taraması.....	63
Çizelge 5.2. Acra3'ün EBI-UniProt Blast tarama sonuçları	66

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 3.1. Protein kristalizasyonunun faz diyagramının şematik gösterimi	18
Şekil 3.2. Batch kristalizasyon yöntemi.....	19
Şekil 3.3. Protein kristalizasyonu için asılı damla yöntemi	20
Şekil 3.4. Protein kristalizasyonu için oturan damla yöntemi	21
Şekil 3.5. Diyaliz yöntemiyle protein kristalizasyonu	21
Şekil 4.1. Bir SAXS analizinin şematik gösterimi. Saçılma vektörü olan q saçılan dalga vektörü k_1 ve gelen dalga vektörü k_0 'ın farkı olarak tanımlanır.	28
Şekil 4.2. Tipik bir SAXS düzeneğinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.3. Üç farklı örnek için Guinier grafiği	33
Şekil 4.4. Tipik geometrik biçimler için hesaplanan saçılma şiddetleri ve uzaklık dağılım fonksiyonları. Küre, yayvan elipsoid (prolate), yatık elipsoid (oblate), iki-domainli yapı ve uzun çubuk yapı için farklı renklerde eğriler verilmiştir	36
Şekil 4.5. DAMMIN programı ile bulunan ab initio model a) başlangıştaki küresel hacim b) sarı parçacıklar küresel aranan hacim ve maviler çözücü	52
Şekil 5.1. Amino asit diyagramı.....	56
Şekil 5.2. Peptid bağınyı oluşturan atomların buldukları düzlem yapılar.....	56
Şekil 5.3. 20 çeşit amino asidin hidrofobik, polar ve yüklü olmak üzere üç farklı grupta verilen yan zincir yapıları.....	58
Şekil 5.4. İki sistin rezidüsünün birleşmesiyle oluşan yapı ve iki kükürt arasında oluşan disülfid bağı.....	59
Şekil 5.5. Birincil yapı.....	60
Şekil 5.6. a) α sarmalı, b) β tabakası	60
Şekil 5.7. a) Proteinin katlanmasıyla oluşan üçüncül yapı b) Farklı polipeptid zincirlerinin bağlanmasıyla oluşan dördüncül yapı	61
Şekil 5.8. Toxin Acra3'ün grafiksel gösterimi	64
Şekil 5.9. Toxin Aah6'nın grafiksel gösterimi	65
Şekil 5.10. Neurotoxin LmNaTx35.2'nin grafiksel gösterimi.....	65
Şekil 5.11. Neurotoxin-like protein STR1 grafiksel gösterimi	65
Şekil 5.12. EBI üzerinden yapılan taramada ilgili beş proteinin amino asit sekans benzerliği.....	67
Şekil 5.13. ClustalW2 sunucusu üzerinden yapılan çoklu dizi eşlemesi	67

Şekil 5.14. NCBI taramasında bulunan Alpha-toxin BU1 grafiksel gösterimi	68
Şekil 5.15. UniProt blast taramasında bulunan benzer ilk beş peptid ve benzerlik değerleri	68
Şekil 5.16. Benzer beş amino asit dizilimi ile yapılan dizi eşlemesi	69
Şekil 5.17. Acra3 için Swiss-Model'de yapılan şablon taraması sonucu bulunan benzerlik yüzdelere göre sıralanmış 19 yapı	70
Şekil 5.18. Acra3 için Swiss-Model'de bulunan 19 şablon yapının benzerlik parametrelerinin değerleri.....	70
Şekil 5.19. Bu1 için Swiss-Model'de bulunan 19 şablon yapının benzerlik parametrelerinin değerleri.....	71
Şekil 5.20. 1nraA peptidinin aminoasit dizilimi	72
Şekil 5.21. Acra3'ün 1nraA şablon yapı ile modellemesinden oluşan ikincil yapının bilgileri	73
Şekil 5.22. 1i6fA peptidinin aminoasit dizilimi.....	73
Şekil 5.23. Acra3'ün 1i6fA şablon yapı ile modellemesinden oluşan ikincil yapının bilgileri	74
Şekil 5.24. a) 1nraA ile yapılan modelleme, b) 1i6fA ile yapılan modelleme.....	74
Şekil 5.25. Acra3 molekülünün homolojik modelleme ile elde edilen üç boyutlu yapısı.....	75
Şekil 5.26. 4hhfA peptidinin aminoasit dizilimi	76
Şekil 5.27. Bu1'in 4hhfA şablon yapı ile modellemesinden oluşan ikincil yapının bilgileri	76
Şekil 5.28. 4hhfA ile yapılan modelleme	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

q	Saçılma Vektörü
R_G	Jirasyon Yarıçapı
P(r)	Uzaklık Dağılım Fonksiyonu
I(q)	Saçılma Şiddeti
Da	Dalton

Kısaltmalar

SAXS	Small Angle X-ray Scattering (Küçük Açılı X-ışını Saçılması)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
BioSAXS	Biological Small Angle X-ray Scattering
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
EBI	The European Bioinformatics Institute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
UniProt	Universal Protein Resource
HTS	High Throughput Screening
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
PDB	Protein Data Bank
PGA	Polyglutamic Acid (Poliglutamik Asit)

1. GİRİŞ

Akrep zehirleri iyon kanallarını etkileyen polipeptidler, çeşitli enzimler ve bazı proteaz inhibitörler ile biyolojik aminleri içerirler. Akrep zehirlerinin bileşenleri içinde en çok çalışılan grup, iyon kanallarının karakterizasyonu ve tanımlanmasında oldukça güçlü vespesifik bir araç olarak kullanılan polipeptidlerdir [1][2][3]. Ayrıca polipeptidler protein mühendisliğinde moleküler iskelet, zirai mücadelede biyopestisid [4] ve akrep zehirlenmelerine karşı aşı olarak [5] geliştirilmiştir. Çeşitli akrep türlerindeki çok farklı peptidlerin varlığı gösterilmesine karşın bu toksinlerin çok azı tanımlanabilmiştir [6].

Yeni toksin sekanslarının tanımlanması ve onların fonksiyonel bölgelerinin ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi medikal ve ticari uygulamaları kadar bilimsel araştırmalarda da büyük ilgi görmektedir. Bugün artık çeşitli akrep nörotoksinlerinin üç boyutlu yapısı özellikle X-ışınları analizi ve NMR ile saptanabilmektedir. Akrep zehirlerinin yapı-fonksiyon analizi için veri tabanı olan SCORPION2 (<http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/scorpion>) bağlanma ilgileri ve toksisite bilgileri ile de zenginleştirilmiş 800 'den fazla doğal ve mutant toksin sekansları ile 624 adet üç-boyutlu yapı kaydını bulundurmaktadır.

Bilinen 1500 farklı akrep türünden, Buthidae familyasına ait yaklaşık 50 tür insanlar için tehlikelidir ve bu türlerin çoğunluğu da *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus*, *Parabuthus*, *Tityus*, ve *Centruroides* sınıfındadır [7]. Türkiye'de sık görülen ve insan sağlığı için en tehlikeli türlerin *Androctonus crassicauda*, *Leiurus quinquestriatus*, *Mesobuthus gibbosus* ve *Mesobuthus eupeus* [8] olduğu belirtilmektedir.

Androctonus crassicauda Türkiye'nin etnomedikal ve toksikolojik öneme sahip Güneydoğu Anadolu akreplerinden birisidir. Venom bileşenleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Günümüze kadar bu akrebin venomundan *Acra1*, *Acra2*, *Acra3* ve *Acra4* olarak adlandırılan dört peptidizole edilmiş ve tanımlanmıştır [9][10][11].

Tez çalışmasında kullanılan *Acra3*'ün molekül ağırlığı 7620,3 Da' dur ve 66 amino asit rezidüsü ile uzun zincirli bir polipeptididir. [8] Bu tür peptidler doğrudan Na^+ kanallarını etkiledikleri için akrep zehirlenmelerinde gelişen nörotoksik semptomlardan sorumludurlar. Tez kapsamında sadece biyoinformatik

çalışmalarda kullandığımız Bu1 peptidi ise Buthacus macrocentrus türünden saflaştırılmıştır. Polipeptid zincirinde 65 amino asit rezidüsüne sahiptir ve moleküler ağırlığı 7263 Da olarak bulunmuştur. Na⁺ kanalıyla etkileşime geçen bu peptid zincirinde dört tane disülfid bağı bulunmaktadır[12].

Proteinin yapısı ve fonksiyonları hakkında çeşitli teknikler farklı ve birbirlerini tamamlayıcı bilgiler verir. Bir proteinin birincil yapısı (aminoasit dizilimi) biyokimyasal yöntemlerle belirlenebilir. Protein moleküllerin dördüncül yapısı (toplam biçimi) küçük açı X-ışını saçılması yöntemini (SAXS) veya elektron mikroskopunu kullanarak elde edilebilir. Ama, ikincil ve üçüncül yapının belirlenmesi için, protein içindeki atomların düzenlenimleri hakkında ayrıntılı bilgi (yüksek çözünürlük) gereklidir. Bu amaçla kullanılan temel yöntem X-ışınları kristalografisidir ve bu sayede atomik çözünürlüğe (1.0Å) kadar bilginin kaydedilmesi sağlanır.

X-ışınları kristalografisi yöntemiyle biyolojik makromoleküllerin yapılarının özömlenmesinde önemli bir dizi adım vardır: hedef molekülün seğimi, klonlama, tanımlama, saflaştırma ve kristalizasyon; difraksiyon verilerinin toplanması ve atomik konumların belirlenmesi. Fakat elimizdeki örnek yeterli saflıkta çözülebilir bir protein olsa bile, kristal oluşumunda büyük sorunlar çıkabilmektedir [13].

Yapı analizinde öncelikle kristalografik yöntemler kullanılarak, X-ışınları difraksiyonu ile Acra3'ün üç boyutlu yapısının bulunması hedeflenmişken, tek kristal formun elde edilememesi nedeniyle SAXS yöntemi yapısaş karakterizyon için kullanılmıştır. Bu sayede peptid moleküllerinin sıvıdaki dağılımları, büyüklük ve şekli hakkında bilgi edinilmiştir. Bu deneysel tekniklerin yanında, Acra3 peptidi ve Bu1 peptidi için biyoinformatik modellemeler yapılarak, üç boyutlu tahmini yapıları kuramsal olarak hesaplanmıştır.

2. PEPTİDLERİN SAFLAŞTIRMA ÇALIŞMALARI

2.1. Protein Saflaştırma Amacı

Protein saflaştırılmasının amacı, proteinin aktivitesinin araştırılması ve bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya terapötik yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı-fonksiyonilişkisinin araştırılması da olabilir. Bu tez çalışmasında olduğu gibi, yapı araştırma çalışmalarında oldukça fazla miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim vardır. Eğer yapı-fonksiyon ilişkisi araştırılacaksa, saflaştırma işlemi süresince aktivite kaybının minimize edilmesi için işlem süresinin olabildiğince kısaltılması gerekir.

Belirli miktarda çıkış maddesinden elde edilecek saf protein miktarı saflaştırma adımlarının verimine bağlıdır. Saflaştırma süresince adım sayısı arttıkça saflık derecesi artar ama verim azalır. Bu durumda proteinin neden saflaştırılmak istenildiği önem kazanır[14].

2.2. Kromatografik Saflaştırma Yöntemleri

1903 senesinde Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunan kromatografi, bir karışımdaki maddelerin biri sabit diğeri hareketli olmak üzere birbirine karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılmasını sağlayan bir saflaştırma yöntemidir. Mikhail Tswett yaprak pigmentlerinden oluşan bir çözeltiyi katı adsorbanlar yardımıyla birbirinden ayırmıştır. Kullanılan kolonda ayrılan maddeler renkli gruplar oluşturduğu için bu yönteme, renk ve yazmak anlamına gelen *chroma* ve *graphein* kelimelerinden yola çıkılarak kromatografi adı verilmiştir [15].

Tüm kromatografik uygulamalarda bir sabit bir de hareketli faz vardır. Ayrılmak istenen örnek, hareketli faz yardımı ile sürüklenerek sabit faz üzerinden taşınır. Örnekteki maddelerin sabit faz üzerinden terk etme hızlarına göre maddeler sabit faz üzerinden gruplaşarak ilerlemektedir. Kromatografi, ayırma mekanizmasına, faz tiplerine, uygulanan tekniğe ve kullanım amacına göre birkaç alt başlıkta sınıflandırılabilir[16].

Ayırma mekanizmasına göre;

Adsorbsiyon kromatografi

İyon değişirme kromatografisi

Dağılıma kromatografisi

Zone elektroforez

Jel geçirgenlik veya jel süzme kromatografisi

Afinite kromatografi

Kiral kromatografi

Faz tiplerine göre,

Sıvı kromatografisi

Gaz kromatografisi

Uygulanan tekniğe göre,

Kolon kromatografi (HPLC [Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi])

Düzlem kromatografi

Kullanılan amaca göre,

Analitik kromatografi (kalitatif ve kantitatif uygulamalar)

Preparatif Uygulamalar

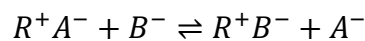
Bu tez kapsamında incelenen akrep venomlarının saflaştırılması için, HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-ters fazda) ve iyon değişimi kromatografisi kullanılmıştır.

2.3. Deneysel Çalışmalar

2.3.1. Akrep Venomlarının Saflaştırılmasında Kullanılan Kromatografik Yöntemler

a) İyon Değişimi Kromatografisi

Bu ayırma yönteminin temeli, bir çözülmeze elektrostatik olarak bağlı iyonların ve kimyasal olarak inert bir matrisin, çözelti içindeki iyonlar tarafından yer değiştirilmesine dayanır.



Yukarıdaki kimyasal reaksiyonda R; çözünmeyen matris, B^- ; çözültideki anyon ve R^+A^- ; A^- formunun içindeki anyon değiştiricisi olarak tanımlanır. Benzer şekilde işlem sırasında katyon aktarması oluyorsa o zaman iyon değiştiricisi, katyon

değiştirici olarak adlandırılır. Bu demektir ki polianyon ve polikasyonlar sırasıyla anyon ve kation değiştiricilerine bağlanırlar. Protein veya polielektrolitlerin bu değiştiricilere bağlanma ilgisi, tampon çözeltilinin pH derecesine bağlıdır [15].

Bu yöntemde adsorbsiyonun olabilmesi için öncelikle uygun bir tampon çözelti seçilmeli ve saflaştırılmak istenen protein miktarına bağlı olarak uygun boyutlarda kolon seçilmelidir. Proteinin saflaştırılması işleminde, proteinin çözüldüğü tampon çözeltinin pH ve tuz konsantrasyonu; saflaştırılmak istenilen proteini, belirlenen iyon değiştirici üzerinde sabitleyecek değerde olmalıdır. Doğru tampon çözeltinin bulunması için diyaliz veya jel filtrasyon yöntemi kullanılabilir [15][17].

Uygun tampon çözelti ve kolon seçildikten sonra, içinde iyon değiştiricisinin bulunduğu kolona saflaştırılmak istenen protein çözeltisi uygulanır. Bu işleme *elüsyon* (yıkama işlemi) adı verilir. Proteinler iyon değiştiricilere farklı ilgilerle bağlanırlar. Bu işlem süresince kullanılan iyon değiştiricilere karşı düşük ilgiye sahip olan proteinler kolonu hızla terk eder, yüksek ilgiye sahip olanlarsa kolondaki iyon değiştiricilerine tutunurlar.

Protein molekülleri ile iyon değiştirici arasındaki etkileşim, proteinin kolonda alıkonmasıyla da ilgilidir. Protein ne kadar çok alıkonursa, değiştiriciye bağlanma ilgisi daha fazla olur. Bu nedenle, iyon değiştirici kolonu, elüsyon tampon çözeltisinin tuz konsantrasyonu yükseltilerek ve/veya pH derecesi değiştirilerek tekrar yıkanabilir. Bu işleme *aşamalı elüsyon* adı verilir. Ayrıca, elüsyon ve aşamalı elüsyona oranla daha iyi ayrışmayı sağlayan *gradyent elüsyonyöntemi* devardır. Bu yöntemde göre; kolon yıkama işlemi gerçekteştikçe, sürekli olarak tuz konsantrasyonu ve/veya pH değişir. Böylece iyon değiştiricileriyle bağlanan farklı proteinler sıralı olarak ortaya çıkar. Bu yöntemde en çok kullanılan, lineer (doğrusal) gradyenttir. Çizgisel gradyent uygulamasında, elüsyon çözeltisinin konsantrasyonu kolondan geçen çözeltinin hacmi ile doğrusal olarak değişir[15].

b) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Sıvı kromatografi ve kolon kromatografisi sınıfına giren bu teknikte örnek çözeltinin, hareketli ve sabit faz arasında ayrışması sağlanır. Bu tip kromatografide asıl gereksinim, çözücülerin hareketli faz içinde çözünebiliyor olması ve hareketli sıvının sabit faz için bir çözücü olmamasıdır. Bu yöntem peptid/protein analizi ve saflaştırılması için kullanılan başlıca tekniklerden biridir [18].

HPLC'de incelenen örnekteki çözünen maddenin sabit faza karşı farklı ilgileri vardır. Ayırışma temeli de bu farklılık gösteren adsorbsiyondan kaynaklanır. Bu nedenle, belirlenmiş bir sabit faz için yüksek ilgiye sahip olan molekülün alıkonması çözeltiyi oluşturan diğer moleküllerden daha fazladır. HPLC'de hareketli ve sabit fazın polaritesine göre, normal veya ters faz olmak üzere iki çeşit ayırma yöntemi vardır [19].

Normal faz kromatografisinde kullanılan hareketli fazlar; içine küçük miktarda nispeten daha polar çözücülerin eklendiği, apolar hidrokarbonlardan oluşur. Sabit faz ise polar hidroksil gruplardan oluşur. Normal faz kromatografisi genelde apolar çözücülerin içinde çözünebilen örneklerin analizinde uygulanır ve izomerlerin ayrımı için de son derece uygun bir yöntemdir. Ayrıca normal fazda oksijen ve nitrojen gibi türleri elektronegatif atomlarına göre ayırmak da mümkündür. Normal faz kromatografisindeki en büyük dezavantajlardan birisi sabit faz olarak silika ya da alümina kullanılmasıdır. Bunun yanında su etkisi de dezavantajlardan birisidir [20].

Ters faz kromatografisi en çok kullanılan kromatografik moddur. Çözelti içindeki nötr molekülleri hidrofobikliklerine göre ayırmak için kullanılır. Ters faz kromatografisi, adından da anlaşılacağı gibi normal fazın ters durumudur. Bu da kullanılan sabit fazın apolar, hareketli fazın polar seçildiği moda karşılık gelir. Ters faz kromatografisi peptid ve proteinlerin analizi için pek çok açıdan çok güçlü ve önemli bir tekniktir. Yüksek verimliliğe sahip bir yöntemdir. Öncelikle çok büyük aralıkta, hem yapısal olarak birbirine çok benzeyen hem de farklı moleküller için, mükemmel bir ayırma gücüne sahiptir. Ayrıca hareketli fazın karakteristiğinde yapılan değişiklikler sayesinde, deneysel kromatografik seçicilik ayarlanabilir [19][20].

2.3.2. Akrelerin Toplanması

Tez çalışmasında kullanılan akrepler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı'nda araştırılmak üzere Şanlıurfa'nın Harran ve Akçakale ilçelerinden canlı olarak toplanmıştır. Akrepler ultraviyole ışığa duyarlı olduğundan, toplama işlemi gece gerçekleştirilmiştir. Geceleri güvenli çalışabilmek için gündüz toplama yapılacak bölgelerde ön çalışma yapılmıştır. Akrepler ev, kümes, ahır gibi kapalı alanlarda yaşamayı tercih ettiği için, açık alanlarda akreplere pek rastlanmamıştır. Bu nedenle akrepler, köylerdeki kullanılmayan harabe yapıların

içinden toplanmıştır. Akrelerin toplanması için yapılan ilk arazi çalışması, ESOGÜ FEF Biyoloji Bölümü, Zooloji Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Hakan Çalışkan ve Yrd.Doç. Dr. Ümit Şirin tarafından yürütülmüştür. 2012 yılında tekrar gerçekleştirilen ikinci arazi çalışması ise Doç. Dr. Figen Çalışkan ve Venom Araştırma Laboratuvarı'ndaki çalışma grubu tarafından yapılmıştır.

2.3.3. Akrelerin Beslenmesi ve Ham Venomun Eldesi

Bölgeden toplanan akreler, üzerlerine havalandırma deliği açılmış ve boyutları 30x20x15 cm olan kutularda, 23°C ile 25°C derece arasında canlı saklanmıştır(Resim 2.1). Her bir kutuda sadece bir akrep bulunacak şekilde laboratuvarın doğal havalandırmalı bölümünde muhafaza edilmiştir. Her kutuya su kapları konulmuş ve haftada bir kutular temizlenerek akrelerin bakımı yapılmıştır. Akrelerin yaşamlarını sürdürebilmesi için, haftada bir kez Tenebrio molitor larvası ile beslenmiştir (Resim 2.2). Bu yüzden akrelerin beslendiği larvaların bakımı da aynı laboratuvar ortamında yapılmıştır.



Resim 2.1. *Androctonus crassicauda* laboratuvar ortamında



(a)

(b)

Resim 2.2 a) Tenebrio molitor yaşam döngüsü b) Tenebrio molitor

Ham venom elektrostimülasyonla sağma yöntemiyle (milking method) toplanmıştır. Elektrostimülatör ile 20 voltluk gerilimle oluşan akım, iki elektrot yardımıyla akrebin zehirli bezlerini içeren son telsonuna uygulanmıştır (Resim 2.3). Üzerinden akım geçirilerek uyarılan akreplerden sağılan venom, mikrosantrifüj tüplerinde toplanmıştır. Venomlar distile suyun içinde çözülmüş ve 15 dakika 4°C'de ve 14000 rpm'de (bir dakikada 14000 devirle) santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant (yüzen kısım), pellet kısmından ayrılarak yeni tüplere aktarılmıştır. Süpernatantların içerdiği peptid miktarını belirlemek için, proteinlerin 280 nm'de verdiği soğurma değerine bakılarak, çözeltilde ml başına düşen µg peptid miktarı bulunmuştur. Bu işlemi yapabilmek için NanoDrop 2000 spektrometresi kullanılmıştır. Miktarı belirlenen peptid toksinleri vakum kurutucuda kurutulmuş ve tekrar kullanılmak üzere, tüplerin ağzı parafilmle kaplanarak -20°C'deki saklanmıştır [10].



Resim 2.3. Elektrostimülasyonla ham venom sağma işlemi

2.3.4. Acra3 Peptidinin Saflaştırılması

A. *Crassicauda* akrebinden elektrostimülasyonla alınan ham venom, içinde DAD dedektörü bulunan HPLC (Shimadzu Prominence [Tokyo, Japan]) sisteminde yürütülmüştür. Venomun yürütüldüğü sistemin içindeki WP300-C18 (4.6x250 mm, GL Sciences Inc.) kolonu, Silika jel kullanan geniş gözenekli bir kolondur (Resim 2.4.a). Gözenek hacminin genişliğinden dolayı protein ve peptid gibi büyük moleküllerin analizinde önerilir. Kolonun parçacık şekli küresel, gözenek boyutu 300Å, gözenek hacmi 1,05 mL/g, karbon yüklemesi %9 ve pH aralığı 2-7,5 olacak şekildedir [21].

Bu sistemde hareketli faz olarak A (%0,12 derişimli trifloroasetik asitin [TFA] sudaki çözeltisi) ve B (%0,10 derişimli trifloroasetik asitin asetonitril içindeki çözeltisi) kodlu iki tampon çözelti kullanıldı. Kolon öncelikle A tampon çözelti ile dengeye getirildi ve örnek 60 dakika boyunca 1ml/dk akış hızıyla, doğrusal gradient %0-60 B tampon çözelti olacak şekilde ayarlandı. 230 nm'de absorbans izlenerek ham venom ayrımı yapıldı [22].

Bu yürütmeden elde edilen Acra3 peptidini içeren fraksiyon, HPLC sisteminde tekrar yürütülerek katyon değişim kromatografi yöntemi ile yeniden ayrıldı. Bu yöntemde kullanılan TSK jel sülfopropil (SP-5PW, 4.6x75mm, Tosoh, Japan) kolonu (Resim 2.4.b), hidrofilik (su çekici) polimer gözenekli bir kanaldır. Kolonun gözenek

boyutu 1000Å, kapasitesi 40 mg Hb/mL, pH aralığı 2-12, iyon sayıcısı Na⁺ olacak şekildedir[23].



(a)

(b)

Resim 2.4. a) WP300-C18 kolonu b) TSK jel sülfopropil kolonu

İkinci yapılan yürütmede C (1M asetik asit) ve D (2M amonyum asetat/1M asetik asit) kodlu tampon çözelti kullanıldı. Kolon başlangıçta %10 tampon C çözeltisi ile dengeye getirildikten sonra fraksiyon doğrusal gradient %10-50 tampon D çözeltisi olacak şekilde, akış hızı 1,5 ml/dk'ya ayarlanarak 40 dakika saflaştırıldı. Absorbans 280nm'de izlendi ve buradan elde edilen son fraksiyon vakum ortamında kurutuldu[24]. Katyon değişim kromatografisinde kullanılan D tampon çözeltideki amonyum asetatın gelen tuzun Acra3'ten uzaklaştırılması için tuz arıtımı işlemi gerçekleştirildi. Arıtımı yapmak için Acra3 peptidini içeren fraksiyon, tampon A ve B çözelti sistemi kullanılarak ters fazda tekrar HPLC'de yürütüldü.

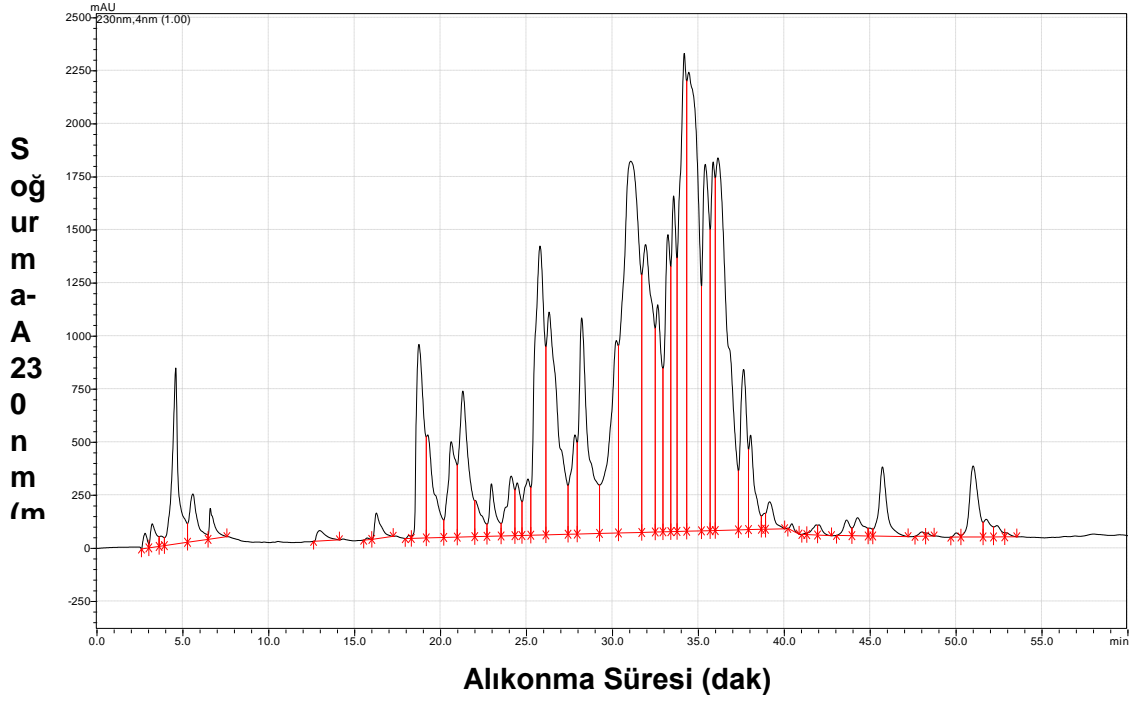
Çizelge 2.1. Acra3 peptidinin saflaştırma adımları

Ham Venom	HPLC protokol numarası	Acra3 içeren fraksiyon	HPLC protokol numarası	Acra3 fraksiyonun dan tuz arıtımı	HPLC protokol numarası	Saf Acra3 Miktarı (µg)
0-60 %B (Ters-Faz) (mg)	ID	10-50 %D (iyon-değişim) RT Alıkonma süresi (dak.)	ID	0-0-60 %B (Ters-Faz) RT Alıkonma süresi (dak.)	ID	
6	926	32,6	931	15,4	937	35,2
7	927	31,6	932	16,0	938	42,5
7	928	31,4	933	16,1	939	57,1
6	929	31,9	934	16,2		
6,5	952	31,3	981	12,9	988	105,2
8	953	30,6				
8	954	30,7	982	14,6	989	98,7
5	957	31,1				
7	958	30,9	983	15,0	990	86,6
6	960	30,7				
5	961	31,4	984	15,3	991	166,6
5	963	31,5				
5	964	31,6	985	15,1		
6	965	31,4				
6	4	31,8	34	14,3	43	76,8
6	5	31,3				
6	6	31,6	35	15,3	44	65
6	7	31,0				
6	8	31,6	36	15,1	45	71
6	9	31,5				
6	10	31,2	37	15,3	46	80,3
6	11	31,6				
6	50	31,8	56	15,0	65	43
7	51	31,5	57	15,8	66	52,2
6	52	31,6				
6	53	31,5	58	15,8	67	30
5	166	32,0	172	16,9	Acra3 ELDE EDİLEMEMİŞTİR Çok düşük absorbans	
5	167	31,2				
6	168	31,0	174	16,9	180	
5	169	31,1				
5	170	31,0	173	16,9	Acra3 ELDE EDİLEMEMİŞTİR Çok düşük absorbans	
5	171	31,1				
5	187	31,0	224	16,7	228	15
5	189	31,2				
5	191	31,1	225	16,6	229	26
5	216	31,6				

Çizelge 2.1 devam ediyor.

5	217	31,6	225	16,6	229	26
5	218	31,5	226	16,2	230	34
5	219	31,5				
5	220	31,4				
5	221	31,1	227	16,2	231	60
5	222	31,4				
5	223	31,5				
6	235	31,5	242	17,2 Çok düşük absorbans	Acra3 ELDE EDİLEMEMİŞTİR Çok düşük absorbans	
6	236	31,4				
6,5	237	31,4				
6,5	238	30,8	243	16,5 Çok düşük absorbans		
7	239	30,9				
6	240	30,9	244	16,4 Çok düşük absorbans		
6	241	30,9				
8	257	30,9	261	16,3	265	54,6
8	258	30,8	262	16,3	266	134,3
8	259	30,8	263	16,3		
6	260	30,9	264	16,3		
8	276	31,3	280	16,4	282	64,9
7	277	31,3				
7	278	31,3				
7	279	32,2				
8	290	30,6	310	16,3	317	83,5
8	303	30,0				
8	304	29,7				
8	305	29,8				
6,7	335	30,7	340	16,4	342	48,3
7,4	336	30,7				
7,4	337	30,6	341	16,3	343	82,8
8	338	30,8				

A. Crasicauda akrebinden üretilen Acra3 peptidi eldesi için yapılan çalışmaların protokol numaraları, ham venom miktarı ve çıkan saf Acra3 miktarı Çizelge 2.1'de görülmektedir. 5 mg ham venomun HPLC sisteminde yapılan analizinde Grafik 2.1'deki kromatogram elde edildi.

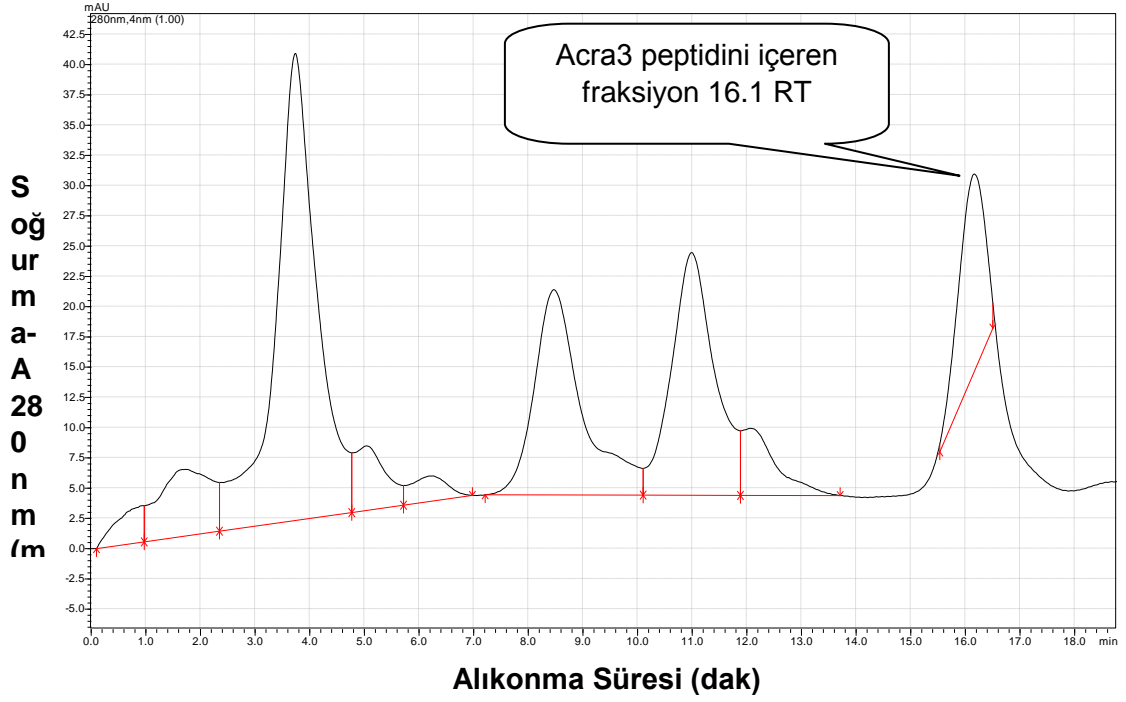


Grafik 2.1. 5mg ham venomun ters faz kromatogramı (%0-60)

Grafik 2.1’de HPLC sisteminin C18 ters faz analitik kolonunda, A (%0,12 derişimli trifloroasetik asitin [TFA] sudaki çözültisi) ve B (%0,10 derişimli trifloroasetik asitin asetonitril içindeki çözültisi) tampon çözülti sistemiyle 1ml/1dk akış hızında gerçekleştirilen saflaştırılmanın kromatogramı verildi.

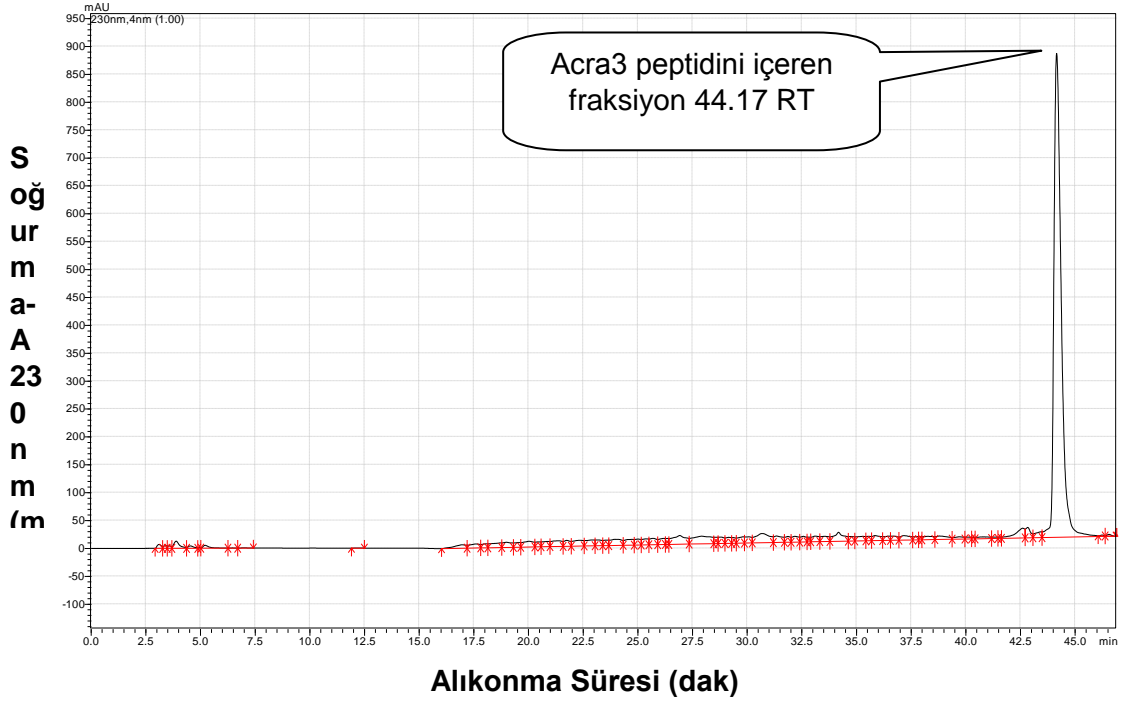
Ham venoma ait bu kromatogramda, 31,9 dakika alıkonma süresinde gözlenen fraksiyon diğer fraksiyonlarla çok yakındır. Bu sebeple Grafik 2.1’deki kromatogram sonucunda saf peptid elde edilmemiştir. Kromatogram sonucuna göre peptidler çok yakın polaritede olduğu için HPLC’de çözücü sistem ve kolon değiştirilerek iyon değişim kromatografisi uygulandı ve ayırım yeniden gerçekleştirildi.

Yeniden uygulanan iyon değişiminde, TSK jel sülfopropil kolonu ve çözücü sistem olarak da C (1M asetik asit) ve D (2M amonyum asetat/1M asetik asit) tampon çözültileri kullanıldı, Grafik 2.2’deki kromatogram elde edildi.



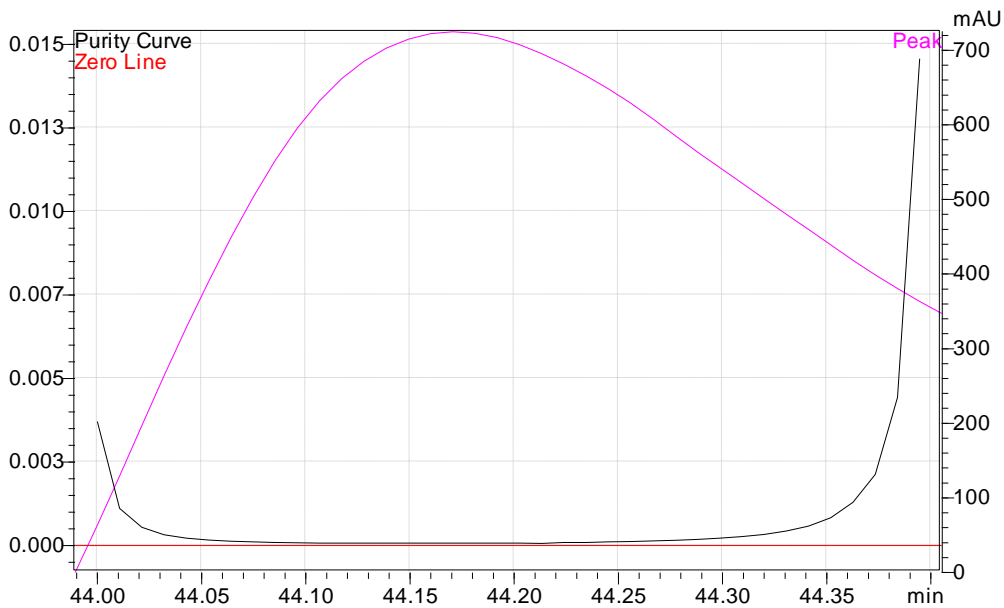
Grafik 2.2. 31,9 dakika alıkonma süreli peptidin iyon değişim kromatogramı

31,9 dakika alıkonma süresindeki fraksiyondan alınan iyon değişim kromatogramında 16,1 dakika alıkonma süresindeki fraksiyon Acra3 peptidini içermektedir. Fakat iyon değişim yöntemiyle yapılan saflaştırmada kullanılan tampon çözelti sebebiyle, peptidin içerdeği amonyum asetatın gelen tuzun artırılması için tekrar ters faz kromatografiye başvuruldu.



Grafik 2.3. Tuz arıtımı için yapılan Acra3 peptidine ait ters faz kromatogramı

Tuz arıtımı için yapılan 70 dakikalık saflaştırma, ilk 10 dakika tampon A (%0,12 derişimli trifloroasetik asidin [TFA] sudaki çözeltisi) ve 10 dakika ile 70 dakika arasında %0-60 tampon B (%0,10 derişimli trifloroasetik asitin asetonitril içindeki çözeltisi) çözeltisi olacak şekilde gerçekleştirildi. Grafik 2.3'te verilenson kromatogramda görülen pik eklenen 10 dakikanın oluşturduğu fark yüzünden 40.3 dakika alıkonma süresiyle kolondan alındı.



Grafik 2.4. Acra3 peptidine ait HPLC'den ait alınan kromatogramın saflık gösterimi

44.17 dakika alıkonma süresi ile gelen peptidin HPLC cihazının sisteminde bulunan dedektör verilerine göre hesaplanan saflık analizi yapıldı. Saflık analizi için ilgili fraksiyon seçilerek sistemde incelendi. Böylelikle üç saflaştırma aşaması sonunda elde edilen Acra3 pikinin saf bir peptid olduğu tespit edildi(Grafik 2.4).

2.3.5. Bu1 Peptidinin Saflaştırılması

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom araştırma laboratuvarında inceleme altına alınan akreplerden elde edilen ham venomların hepsi burada anlatılan saflaştırma işlemine tabii tutulmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan *A. crassicauda* türüne ait olan Acra3 peptidinin saflaştırma deneylerinde bulunulduğundan, tüm işlemler sadece Acra3 peptidi için anlatılmıştır. Fakat *Buthacus macrocentrus* türüne ait Bu1 peptidi de birebir aynı işlem sırası izlenerek saflaştırılmıştır.

3. KRİSTALİZASYON ÇALIŞMALARI

3.1. Protein Kristalizasyonunun Temel İlkeleri

Kristalografik çalışmalara uygun kristaller elde etmek için, makromoleküllerin (protein, nükleik asit, protein-protein kompleksi ya da protein-nükleik asit kompleksi gibi) mümkün olduğu kadar homojen olacak şekilde saflaştırılması gereklidir. Genellikle örnek protein ne kadar safsa, kristali büyütme şansı o kadar fazla olur. Protein kristalografileri için, proteinin saflık şartı biyokimyacıardan farklı ve daha katıdır. Ayrıca iyi bir protein kristalizasyonu için, proteinin bütün molekülleri aynı yüzey özelliklerine ve yüzeyde aynı yük dağılımına sahip olmalıdır. Yoksa bu durum, oluşacak olan kristal yapının içinde moleküllerin paketlenmesini etkiler.

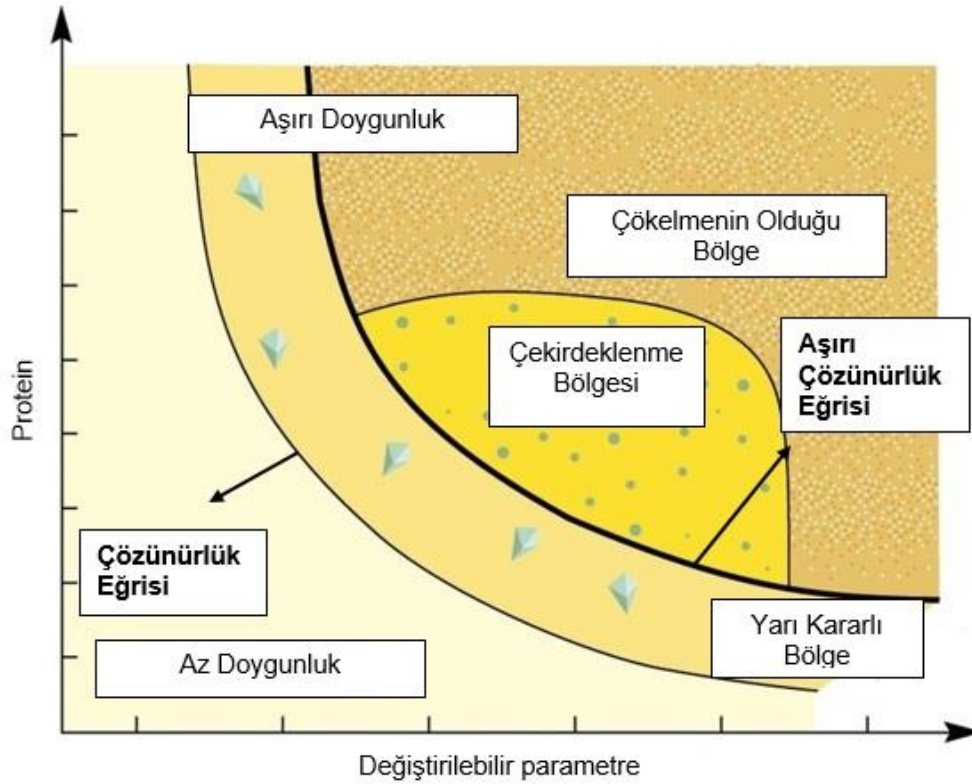
Protein kristalizasyonu, proteinlerin bir çözelti içerisinde çöktürülmesine dayanan bir deneme yanılma yöntemidir. Kristalleştirme işlemine tabii tutulacak örnek, yüksek konsantrasyonda süper doygunluk durumunda olmalıdır. Bu amaçla çöktürücü bir kimyasal (presipitan), örnekle bir araya getirilerek bir çözelti oluşturulur ve bu oluşan çözelti içindeki protein kristallerinin çekirdeklenmesini bu çöktürme ajanları (presipitan) sağlar. Böylelikle oluşan çözülden üç boyutlu kristal yapılar elde edilebilir[25].

Protein kristalizasyonunun dört önemli aşaması vardır.

- i. Protein yeterince saf olmalıdır. Eğer yeterince saf değilse, kristalizasyon başarılı olana kadar daha saf duruma getirilmesine çalışılmalıdır.
- ii. Protein uygun bir çözücü içinde çözülmelidir. Kullanılan çözücü genelde su-tampon çözeltisidir. Bazı durumlarda 2-metil-2,4-pentandiol (MPD) gibi organik çözücüler de eklenebilir.
- iii. Çözelti aşırı doymuş (süpersatürasyon) duruma getirilmelidir. Kristallenmenin bu aşamasında, büyüyen kristalin çekirdeklerini oluşturan küçük kümelenmeler meydana gelir. Proteinlere göre anlaşılması daha kolay olan küçük moleküllerin kristalizasyonunda, kendiliğinden çekirdek oluşumu için mevcut yüzey gerilim enerjisine ihtiyaç vardır. Enerji engeli bir defa aşıldığında, kristal büyümesi başlar. Daha yüksek süpersatürasyon seviyelerinde, enerji engelini aşmak daha kolaydır. Çekirdek oluşumu için

gerekli bu durumların, protein kristallendirilmesi içinde geçerli olduğu varsayılır.

- iv. Çekirdek bir defa oluştuğunda, asıl kristal büyümesi başlamış demektir. Düşük moleküler ağırlıklı bileşikler için, büyüyen bir kristalin üzerine yeni moleküllerin bağlanması yüzeyin üstündeki basamaklarda oluşur. Çünkü böyle durumlarda, molekülün düz yüzeye bağlanması için gerekli bağlanma enerjisi daha fazladır. Bu basamaklar kristal düzenindeki kusurlardan dolayı ya da yüzey üzerindeki çekirdek formlarında gelişigüzel oluşur [26].



Şekil 3.1. Protein kristalizasyonunun faz diyagramının şematik gösterimi

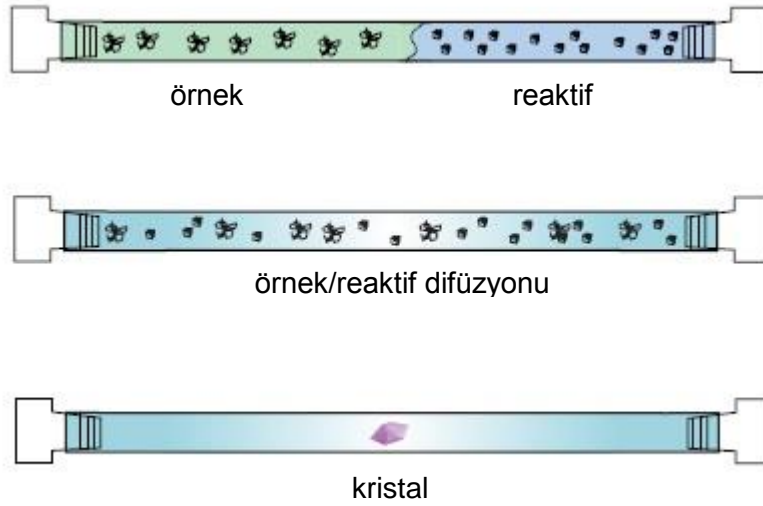
Sonuç olarak, bir protein kristalini büyütme, makromolekülün süper-doymuş bir çözeltisinden başlar; süper-doyum koşulları ise çöktürme ajanlarının eklenmesi ve çözeltinin pH ve sıcaklık gibi, bazı iç parametrelerinin değiştirilmesi ile elde edilebilir. Protein çözeltisinin konsantrasyonu çözünürlük limitinin üzerine çıkarılırsa, çözelti aşırı doymuş hale (süper-sature) gelir. Bu noktada protein molekülleri kümelenmeye başlar. Kümelenme, çekirdeklenme ve büyüme olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Çekirdeklenme sırasında, protein molekülleri ya amorf çökelti ya da mikrokristaller oluştururlar(Şekil 3.1) [27].

3.2. Kristalizasyon Teknikleri

Kristalizasyon deneylerinde kullanılan klasik tarama (screening) yöntemleri oturan damla ve asılı damla buhar difüzyon yöntemleridir (sitting drop ve hanging drop vapor diffusions). Bunun yanında sandwich damla, batch, sıvı-sıvı difüzyonu, mikrodializ, yağ altında mikrobatch gibi çeşitli teknikler de kullanılır.

3.2.1. Batch Kristalizasyonu

Bu yöntem protein kristalleştirmede uygulanan en eski ve en basit yöntemlerden biridir. Protein çözeltisine birden eklenen çöktürücü reaktif sayesinde çözelti hemen aşırı doyma noktasına gelir. Kristaller başka bir işlem yapmaya gerek kalmadan aşırı doymuş çözeltiden giderek büyümeye başlar (Şekil 3.2) [28].



Şekil 3.2. Batch kristalizasyon yöntemi

3.2.2. Sıvı-Sıvı Difüzyonu

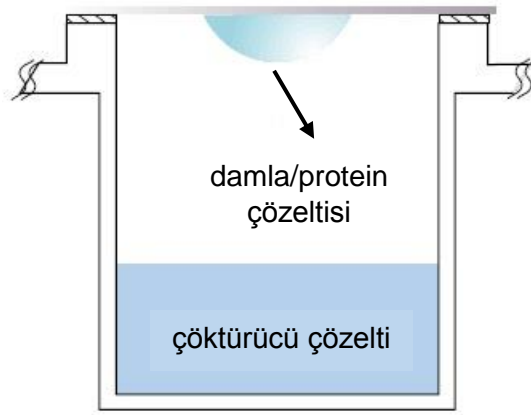
Bu yöntemde, küçük bir kapilerin içinde protein çözeltisi ve içinde çöktürücünün bulunduğu çözelti ile üst üste katman oluşturulur. Erime noktası kapileri (melting point capillary) bu işlem için son derece uygundur. Alt katmanda yüksek yoğunluğa sahip çözelti vardır. Eğer çöktürücü olarak MPD gibi organik bir çözücü kullanıldıysa, böyle bir çözelti üst katmanda oluşur. Birebir oranında bir karışım için, çöktürücü konsantrasyonu, istenilen son konsantrasyondan iki kat fazla olmalıdır. Öncelikle alt katmandan başlayarak bir iğne yardımıyla çözeltiler kapilere enjekte edilir. İlk katmandan hava baloncuklarından kurtulmak için, kapiler

santrifüje alınır. Sonra diğer çözelti enjekte edilir ve iki katman arasında keskin bir sınır meydana gelir. İki çözelti adım adım birbirine difüz etmeye başlar [26].

3.2.3. Buhar Difüzyonu

a) Asılı Damla Yöntemi

Yaklaşık 3-10 μ l protein çözeltisi ve aynı hacimde çöktürücü çözeltiden oluşan damlalar, silikonize ve slip kaplanmış mikroskop camı üzerinde hazırlanır. Cam, damlayı dağılmaktan korumak için silikonlanır. Bu özel kaplı lamel, içinde yeteri kadar çöktürücü bulunan bir çukur üzerinde, damlalar baş aşağı olacak şekilde çevrilir (Şekil 3.4) [28].

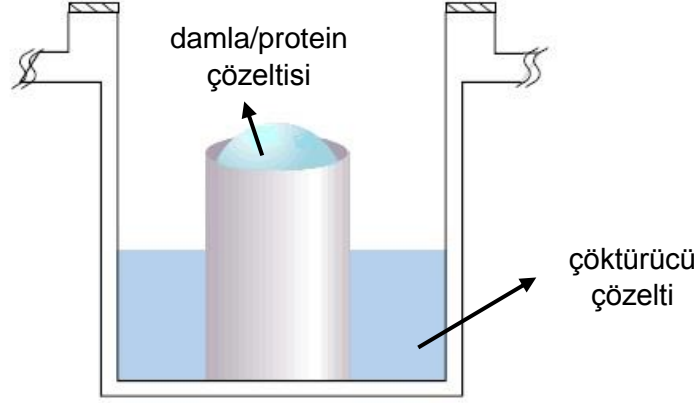


Şekil 3.3. Protein kristalizasyonu için asılı damla yöntemi

İşlemin yapıldığı hazne, slip kaplı cam konulmadan önce, çukuru çevreleyecek şekilde gres yağı uygulanarak kapanır.

b) Oturan Damla Yöntemi

Kullanılan protein çözeltisi düşük yüzey gerilimine sahipse, asılı damla yöntemi ile oluşturulacak damlalar slip kaplı lamel üzerinde dağılabilir. Böyle bir durumda oturan damla yöntemi tercih edilmelidir. Bu yöntemde damla asılı değil, oturur durumdadır (Şekil 3.5) [28].

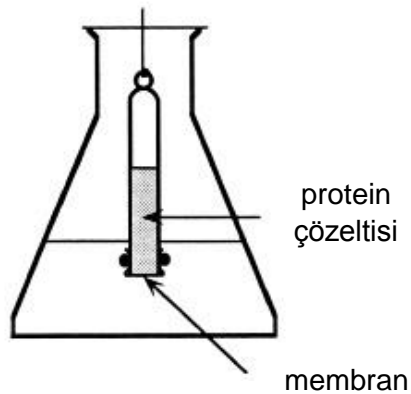


Şekil 3.4. Protein kristalizasyonu için oturan damla yöntemi

Her iki durumda da, damla (protein, tampon, tuz ve çöktürücü) ile rezervuar (tampon, tuz ve çöktürücü) arasındaki konsantrasyon farkı, sistemi buhar fazı difüzyonu vasıtasıyla dengeye götürür. Damladaki çöktürücü konsantrasyonu, su molekülünün uzaklaştırılmasıyla artar ve süper doyum noktasına gelindiğinde damla içinde protein kristalleri oluşmaya başlar. Bu durumda damla ve rezervuar dengede veya dengeye çok yakındır [26].

3.2.4. Diyaliz

Protein kristalizasyonu için, tıpkı diğer tekniklerde olduğu gibi çok çeşitli diyaliz yöntemleri bulunmaktadır. Diyaliz tekniğinin en önemli avantajı, çöktürücü çözeltinin kolaylıkla değiştirilebilir olmasıdır. Uygun miktarda (0.1 ml'den fazla) protein çözeltisini kristalleştirmek için, diyaliz tüpleri kullanılabilir. Diyaliz membranı bir lastik halka yardımıyla tüpe bağlanır. Membran kullanılmadan önce, suyla kapsamlı bir şekilde durulanmış olmalıdır. Hatta tercihen suda yaklaşık 10 dakika kaynatılabilir (Şekil 3.6) [26].



Şekil 3.5. Diyaliz yöntemiyle protein kristalizasyonu

3.3. Acra3 Peptidi İle Yapılan Kristalizasyon Deneyleri

Makromoleküler yapıları çözümlmek için tercih edilen en önemli deneysel uygulamalardan biri kristalizasyondur. Fakat tez çalışmasında kullanılan peptidlerden sadece Acra3 için kristalizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. A. crassicauda türü akreplerden elde edilen proteinlerin kristalizasyonu için önceden yapılan bir çalışma olmadığından, Acra3 için kristalleştirme çalışmaları deneme yanılma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler düzgün bir kristal yapı elde edilebilmesi için, farklı kristalizasyon koşulları, peptid konsantrasyonları ve sıcaklık gibi parametreler değiştirilerek tekrarlanmıştır.

3.3.1. Icl13 Morpheus Ve Icl14 Pga Tarama Kitleri İle Yapılan Kristalizasyon Denemeleri

Yapılan ilk faz saflaştırma çalışmalarında farklı miktarlardaki ham venomların ayrı ayrı HPLC'de yürütölmelerinden, çok düşük miktarlarda Acra3 peptidi elde edildi. Bu yürütmeler sonucu toplamda elimizde bulunan Acra3 peptid miktarı yaklaşık olarak 1mg kadardı. Bu çalışmalar sonunda her bir yürütme için elde edilen Acra3 miktarı Çizelge 3.1'de verildi. Peptidlerin aktivitelerini korumak için tüplerdeki örneklerin hepsi -18°C'de liyofilize halde tutuldu.

Çizelge 3.1. Kristalizasyon deneyinde kullanılan örneklerin miktarları

HPLC Protokol Numarası (ID)	Ham Venom Miktarı(mg)	Acra3 Miktarı(µg)
912	8	27,2
937	6	35,2
938	7	42,5
939	13	57,1
988	14,5	105,2
989	13	98,7
990	13	86,6
991	21	166,6
43	12	76,8
44	12	65
45	12	71
48	12	80,3
65	6	43
66	13	52,5
67	6	30
Toplam	168,5	1037,4

Elde edilen Acra3 peptidi ile Londra Imperial College, Tıp Fakültesi, Biyomoleküler Tıp Bölümü'nde Prof. Naomi Chayen'in laboratuvarında çalışıldı. Burada robot teknolojisi ve yeni nesil tarama kitleri kullanılarak, HTS (high throughput screening) tekniğiyle Acra3 için ilk kristalizasyon denemelerine başlandı. Bu teknik 7,5 mg/ml ve 10,5 mg/ml olmak üzere iki farklı protein konsantrasyonu için uygulandı.

a) 7,5 mg/ml Konsantrasyondaki Acra3 Kristalizasyonu

7,5 mg/ml konsantrasyonda örnek hazırlamak için ID numarası 988, 990, 991, 45 ve 48 olan Acra3 peptidleri kullanıldı. Kullanılan toplam 449,7 µg miktardaki örneğe, her bir tüp için 12 µl olmak üzere toplamda 60 µl saf su pipetle eklendi. Saf suda çözünen örnekler 9500 rpm devirde bir dakika santrifüjlenerek, oluşan çözeltinin homojenitesi artırıldı. Bu işlemten sonra tüplerdeki çözeltiler tek bir tüpte birleştirilerek 7,5 mg/ml konsantrasyonda örnek elde edildi.

Hazırlanan örnekten 3.5 µl'lik protein çözeltisi, ICL13 Morpheus plate kiti üzerinde sekiz mikro-rezervuar bulunan şeritteki kuyulara pipetle manuel olarak yüklendi (Resim 3.1.a). Kullanılan TTP Labtech Mosquito kristal robotu (Resim 3.1.b), içinde 96 farklı çöktürücü çözeltinin bulunduğu kuyulardan alınan 200 nl çözelti ile şerit üzerindeki sekiz kuyudan alınan 200 nl'lik protein çözeltisini birleştirerek 400 nl'lik hacimde 96 tane damlacık (sitting drop) oluşturdu.



Resim 3.1 a) Protein çözeltisinin yüklenmesi, b) TTP Labtech Mosquito kristal robotu

Hazırlanan plate havayla olan teması kesmek için, UV geçirgenliği olan optik saydam tabaka ile kapatıldı. Sealing işlemi yapılan plate (Resim 3.2.a), inkübatöre

konularak 20°C sabit sıcaklıkta tutularak izlenmeye bırakıldı. Aynı işlemler daha sonra ICL14 PGA plate kiti için de tekrarlandı.



(a) Sealing işlemi **(b)** etiketlenen plate
Resim 3.2 a) Sealing işlemi b) etiketlenen plate

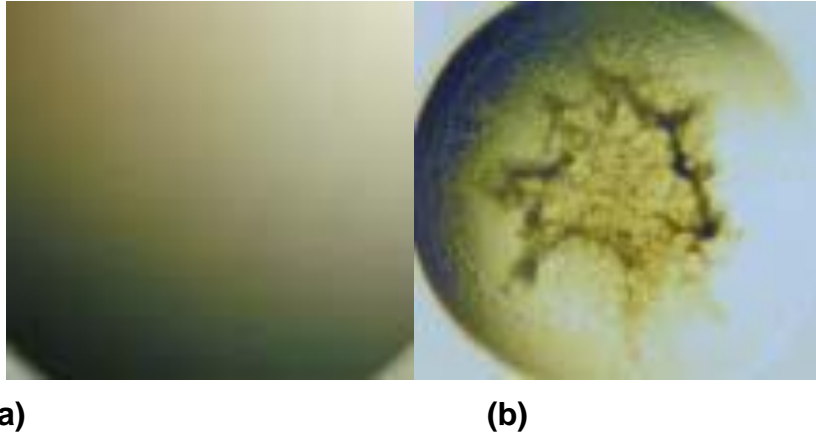
Kristalizasyon deneme sürecinde, hazırlanan plate'lerdeki damlacıklar sürekli olarak bir stereo mikroskop kullanılarak incelendi. Kristalleşmenin hangi fazda olduğu, kristal oluşumunun başlayıp başlamadığı, hangi tarama koşullarında gelişmenin daha iyi veya kötü olduğu veya amorf çökelti oluştuğunun bilinmesi sonraki kristalizasyon aşamaları için önemlidir.

Mikroskopla kristalizasyon süreci incelenen örneklerde, PGA plate üzerinde daha fazla çökeltme ve mikrokristal görünümlü yapıların oluşumu gözlemlendi. Morpheus'da damlacıkların daha berrak olmasından dolayı, PGA ile daha yüksek konsantrasyonda proteinler ile deneylerin tekrarlanmasına karar verildi.

b) 10,5 mg/ml Konsantrasyondaki Acra3 Kristalizasyonu

Bu kısımda Çizelge 3.1.'de verilen peptidlerden ilk deneyde kullanılmayan, geriye kalan on tanesi kullanıldı. Toplamda 528 µg olan protein çözeltisi, 50 µl saf suda çözünerek 10,56 mg/ml konsantrasyonda çözelti a) şıkında anlatılan işlemler tekrarlanarak hazırlandı. Oluşan protein çözeltisi sadece ICL14 PGA tarama kiti kullanılarak kristalizasyon işlemi tekrarlandı ve aynı koşullar altında stereo mikroskopla izlenmeye bırakıldı. Geriye kalan 20 µl'lik protein çözeltisi ise istenilen kristalizasyon koşulu yakalandığında, bu koşulun optimizasyonu için buzdolabında saklandı.

Bir kristalizasyon sürecinde karşılaşılabilecek farklı kristal oluşumları vardır. Difraksiyon verebilecek kristaller 0.05 mm den büyük, tek ve saydam olmalı, çatlak ve kusurları olmamalıdır. Kristaller çift kırıcılık özelliğine sahip oldukları için, stereo mikroskopta çapraz polarizörler altında döndürülürken aydınlık ve karanlık görüldükleri bölgeler oluşur. Imperial College'da yapılan deneylerde bazı koşullar için çökelti durumu gözlenirken, çoğunda sadece berrak damlacık oluşmuştur (Resim 3.3). Berrak damlacık oluşumu, kristalizasyonun başlamadığı anlamına gelir. Bazı damlacıklarda gözlenen kristalimsi yapıların zamanla tarama ajanlarının içerisinde yer alan inorganik tuzların kristallerinden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bu sebeple ilk yapılan deneylerde Acra3 tek kristal oluşumu gözlemlenmemiştir.



Resim 3.3. Kristalizasyon sürecinde karşılaşılan farklı oluşumlar **a)** berrak damla, **b)** çökelti [29]

3.3.2. Diğer Kristalizasyon Denemeleri

Imperial College'da yapılan deneylerden önce Manchester Üniversitesi'nde Phoenix kristalizasyon robotu kullanılarak çalışmalar yapıldı. Toplamda 340 µg proteinden, saf suda 8 mg/ml konsantrasyona sahip protein çözeltisi hazırlandı. Bu protein çözeltisi farklı çöktürücülerle karıştırılarak damlacıklar elde edilmiştir. 0,1 µl Qiagen, JCSG Core Suit I ve JCSGI MPD kristalizasyon tarama kiti ile 0,1 µl protein çözeltileri karıştırılarak elde edilen damlacıkların olduğu platelerden biri oda sıcaklığı 20°C'de bekletilirken, diğeri 4°C'de bekletilmiştir. Fakat yine tek kristal oluşumu gözlemlenmemiştir.

İki başarısız denemeden sonra, Cardiff Üniversitesi, Wales Heart Research Institute Structural Biology, Institute of Infection and Immunology bölümünden Dr. Pierre Rizkallah'a 458,05 µg Acra3 peptidi deneysel çalışmalar için gönderilmiş ve

yeniden kristalizasyonu denenmiştir. Daha fazla kristal koşulunun denenebilmesi için yeteri kadar Acra3 gönderilemediği için, düşük konsantrasyonda (5mg/ml) hazırlanan sıvı protein çözeltilerine robot kristalizasyonu uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucu başta berrak damla modeli oluşmuş fakat bir müddet sonra drop içinde yaklaşık 50µm boyutunda olan bir kristal oluşumu gözlenmiştir (Resim 3.4). Oluşumun büyümesi beklendikten sonra, yine istenilen tek kristalin oluşmadığı X-ışınları sisteminde anlaşılmıştır.



Resim 3.4 Damla içinde 50 µm boyutundaki kristal yapıya benzer oluşum

4. KÜÇÜK AÇI X-IŞINI SAÇILMASI(SAXS) YÖNTEMİ İLE YAPISAL ÇALIŞMALAR

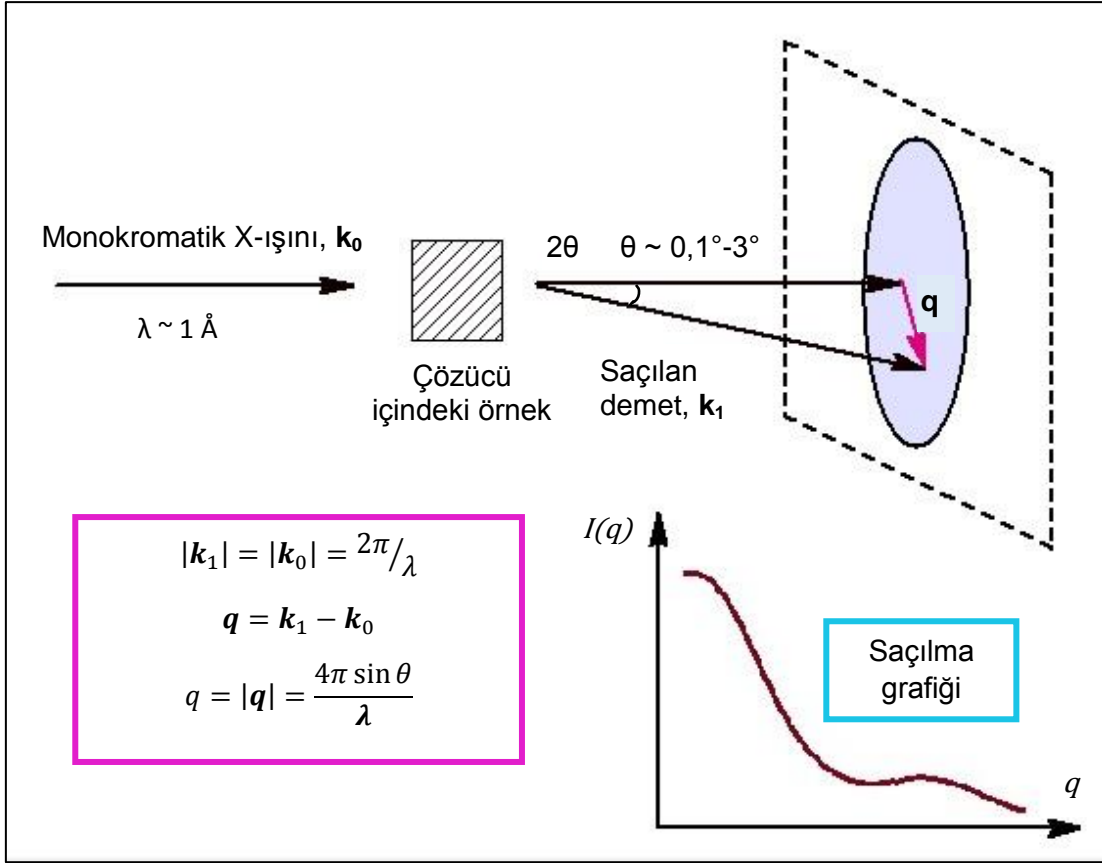
Küçük açı X-ışınları saçılması (SAXS) yöntemi çözelti içindeki biyolojik makromoleküllerin düşük-çözünürlüklü (nano metre boyutunda) yapısal karakterizasyonları için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu teknik, ab initio ve katı cisim modelleme gibi hesapsal yöntemlerle birlikte kullanılarak protein ve protein komplekslerinin düşük-çözünürlük üç boyutlu yapıları ile proteinlerin dördüncül yapıları ve oligomerik kompozisyonları hakkında bilgi sağlar. Ayrıca, SAXS X-ışınları kristalografisi ve NMR gibi yüksek çözünürlüklü yöntemlere tamamlayıcı katkılarda bulunabilir.

X-ışınları kristalografisinde kullanılacak tek kristaller elde edilemediği durumlarda proteinlerin sıvı çözeltilerinin incelenmesine olanak verdiği için tercih edilen bir yöntem olması nedeniyle, akrep venom peptidlerinin yapısal karakterizasyonunda SAXS yöntemi kullanılmıştır.

Küçük açı saçılması yönteminde kullanılan örnek malzemenin yüksek saflıkta ve tercihen monodispers çözelti olması gerekmektedir. SAXS yönteminin X ışınları kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans gibi diğer yapı çözümü yöntemlerine göre en belirgin avantajı, veri toplamanın ve işlemenin daha hızlı olmasıdır. Modern sinkrotron ve nötron ışınım kaynaklarıyla veriler kısa süre içinde toplanır, işlenir ve analiz edilebilir; hatta düşük çözünürlükte parçacık şekli bile oluşturulabilir [30].

4.1. SAXS Yönteminin Temel İlkeleri

SAXS yönteminde, örnek üzerine gelen monokromatik X-ışını demeti (dalga boyu: X-ışını tüpü için $\lambda=0.1-0.2$ nm, sinkrotron ışını için $\lambda=0.05-0.5$ nm) çözelti ve makromoleküller tarafından esnek olarak saçıldıktan sonra saçılma şiddetleri saçılma açısının fonksiyonu olarak dedektör tarafından kaydedilir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bir SAXS analizinin şematik gösterimi. Saçılma vektörü olan q saçılan dalga vektörü k_1 ve gelen dalga vektörü k_0 'ün farkı olarak tanımlanır

Bir örneğe gönderilen ışının dalga vektörü \vec{k}_0 ve örnekten saçılan ışının dalga vektörü de \vec{k}_1 olmak üzere, iki vektör arasındaki fark $\vec{q} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0$ olarak tanımlanan bir saçılma vektörüdür. Küçük açı saçılmasında gelen ışın maddedeki elektron yoğunluğuna bağlı olarak saçılır. Buna göre belli bir hacim üzerinden r konumundaki elektron yoğunluğuna bağlı olarak saçılan ışının genliği denklem 4.1'deki gibi tanımlanır.

$$F(q) = \iiint \rho(r) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} dV \quad (4.1)$$

İzotropik bir örnekte saçılma şiddeti ise bu genliğin kompleks konjügesiyle çarpımına eşittir. Bu işlemde saçılma şiddeti denklem 4.2'deki gibi tanımlanır.

$$I(q) = FF^* = \iiint \tilde{\rho}^2(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} dV \quad (4.2)$$

Denklem 4.2'deki integral iki saçıcının birbirine göre bağıl uzaklığı olan $\vec{r} = \vec{r}_1 - \vec{r}_2$ değerine bağlıdır. Aralarında r uzaklık bulunan bir elektron çifti ters uzayda bir

noktayla gösterilir ve bu noktaların yoğunluğu $\widetilde{\rho}^2(\vec{r})$ olarak tanımlanır. Otokorelasyonla bu yoğunluk denklem 4.3'teki gibi gösterilir ve bu da Patterson fonksiyonudur.

$$\widetilde{\rho}^2(\vec{r}) = \iiint \rho(r_1)\rho(r_2) dV_1 \quad (4.3)$$

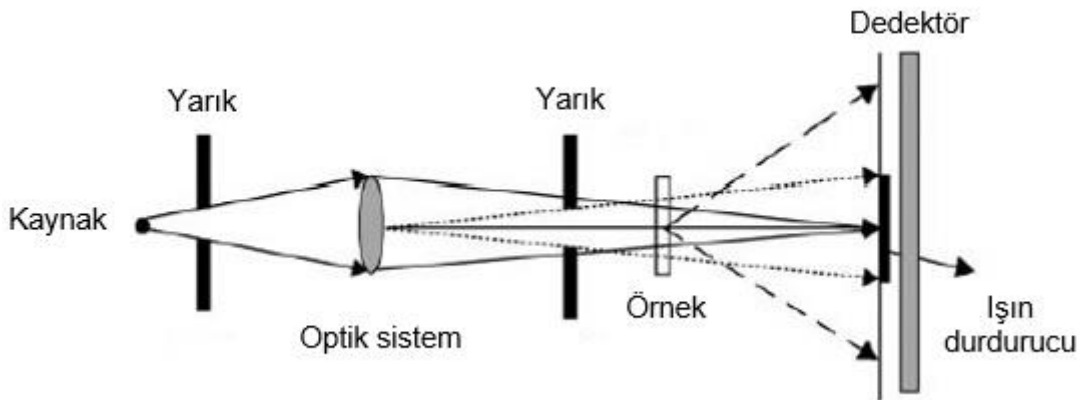
Böylelikle tüm ters uzay üzerinden integral alındığında saçılma şiddeti için denklem 4.2'deki ifade elde edilir.

Küçük açı saçılması izotropik sistemler için geçerli olduğundan, normal uzayda $\rho\vec{r}$ 'ye bağlı değilken ters uzayda $\widetilde{\rho}(\vec{r})$ yöne bağlılık içerir. Debye eşitliğine göre r 'nin tüm yönlerdeki ortalaması $\langle e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \rangle = \frac{\sin(\vec{q}\cdot\vec{r})}{\vec{q}\cdot\vec{r}}$ olarak yazılırsa denklem 4.2, ortalama elektron yoğunluğu $\bar{\rho}$ 'ya bağlı olarak denklem 4.4'teki formunu alır [31].

$$I(q) = \int 4\pi r^2 \bar{\rho}^2(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (4.4)$$

4.2. SAXS Verilerinin Ölçümü

Düşük konsantrasyonda biyomoleküler çözeltiler küçük açıda X ışını saçılmasıyla incelendiğinde, örneğe gelen ışık demetinin etrafında dairesel simetrik bir saçılma deseni oluşur. Bu oluşan desenler doğrusal orantılı sayaç veya yük bağlaşımlı dedektörler tarafından gözlenebilir. Şekil 4.2'de SAXS sisteminin şeması gösterilmiştir. Kullanılan optik sistem (monokromatör aynalar), sinkrotron kaynağından gelen uygun dalga boyunu seçer ve örneğe gelen ışın dedektörde odaklanır [32].



Şekil 4.2. Tipik bir SAXS düzeneğinin şematik gösterimi

Makromoleküler çözeltiyle yapılan deneylerde çözültiden ve çözücüden gelen farklı saçılma ölçümlerine ihtiyaç vardır. Çözücüden gelen saçılma deseni, parçacıklardan gelen net saçılmayı bulabilmek için çözültideki saçılmadan çıkartılır. Çözücü sabit saçılma yoğunluğuna (ρ_s) sahip, özelliiksiz bir matris olarak kabul edilir. Çözünen maddenin elektron yoğunluğu; $\rho(r)$ ve bulk çözeltinin yoğunluğu ρ_s olmak üzere, ortalama elektron yoğunluğundaki fark, $\Delta\rho(r)$ denklem 4.5'deki gibi tanımlanır.

$$\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho_s \quad (4.5)$$

Homojen bir örneğin saçılma eğrisi parçacıkların elektron dağılımından elde edilir. Örnekten tampon çözeltinin saçılma yoğunluğunun çıkartılmasıyla saçılma eğrisi oluşmuş olur. Saçılma profili genelde saçılan fotonların şiddeti olan $I(q)$ 'ya karşı saçılma vektörü olan q 'nın grafiği olarak çizilir. Buradaki saçılma vektörü denklem 4.6'da verilmiştir.

$$q = (4\pi \sin \theta)/\lambda \quad (4.6)$$

Burada θ ; saçılma açısının yarısı, λ ; örneğe gönderilen X-ışınının dalga boyudur. Bazı durumlarda q saçılma vektörü yerine s de kullanılabilir. Burada $s = 2 \sin \theta / \lambda$ olarak tanımlanır. Bu da $q = 2\pi s$ durumuna karşılık gelmektedir. Bazı durumlarda da θ açısı, saçılma açısı olarak tanımlanabilir. Fakat bu tanımların her biri birbirine denk tanımlardır. Saçılma vektörü q 'nın birimi dalga boyu biriminin (\AA^{-1} , nm^{-1} vb) tam tersidir ve bu değer fotonların maruz kaldığı yönelimli momentum değişiminin bir ölçüsüdür.

Yapılacak bir SAXS ölçümü için çizilecek saçılma grafiği " $I(q)/q$ " olağan dışı saçılmaların yaşandığı dalga boyları haricinde, örneğe gelen bütün dalga boyları için özdeş olur. Örneklerin yapısı hakkında bilgi, çizilecek olan saçılma grafiğinden elde edilir [33].

Uygulamada protein konsantrasyonunun ve parçacıklar arası etkileşmenin ölçülen saçılma şiddetlerini nasıl etkilediğini kontrol etmek için, en az dört farklı konsantrasyondaki örnek çözeltileri serisinden ve boş tampon çözücü + kapilerden veri toplanır. Elde edilen saçılma şiddetlerinden tampon sinyali çıkartılarak çözültide bulunan makromoleküle ait sinyaller ile analize başlanır. Tampon çözücü

şiddetlerinin çıkarılması veri işleme sürecinde çok önemli bir adımdır ve olabildiğince hassas bir şekilde yapılmalıdır.

4.3. Saçılma Grafiğinin (SAXS Eğrisinin) İncelenmesi

İncelenecek olan örneğe $D = 2\pi/q$ büyüklüğünde hayali bir pencereden bakıldığında, q değeri ne kadar büyükse pencerenin genişliği o kadar azalır. Aynı şekilde q değeri ne kadar küçükse, örneğe bakılan hayali pencerenin genişliği o kadar artar. Böylece incelenen bir SAXS eğrisinde q büyüklüğüne göre, eğrinin farklı bölgelerinde örnekle ilgili farklı bilgiler alınır. Bu nedenle saçılma grafiği pencerenin büyüklüğüne göre büyük, orta ve küçük q bölgesi şeklinde ayrı ayrı analiz edilir.

Herhangi bir polimer için, saçılma bölgesi “güç yasası rejimi (power law regime)” ile belirlenir. Bu bölgede saçılmanın şiddeti, saçılma faktörüne bağlı olarak denklem 4.7’deki oranla bağlıdır.

$$I(q) \propto q^{-d_f} \quad (4.7)$$

Bağıntı 4.7’de gösterilen d_f değeri sistemin serbestlik derecesidir. Örneğin; oval elipsoid yapılardan gelen saçılmalar için bu değer $d_f = 1$ iken, yassı elipsoid yapılar için $d_f = 2$, küresel yapılar için de $d_f = 4$ olur.

Saçılma vektörü q ’nun büyük olduğu bölge “*Porod Bölgesi*” olarak adlandırılır. Katlanmış makromoleküller için saçılma şiddeti $I(q) = Aq^{-4} + B$ olacak şekilde Porod yasasına göre tanımlanır. Saçılma eğrisinin Porod bölgesinde molekülün şekli hakkında bilgi alınır. A ve B değerleri $I(q)q^4 - q$ olarak çizilecek grafikten hesaplanabilir. Porod yasası da tıpkı diğer yaklaşımların olduğu gibi, saçılma eğrisinin sadece belli bir kısmında geçerlidir.

Etkin pencere büyüklüğünün arttığı orta q bölgesinde, pencerenin büyüklüğü yaklaşık olarak örneğin saçıcıları boyutundadır ve bu bölgede analiz yapıldığında örneğin şekli ve içyapısı hakkında bilgi edinilebilir.

Etkin pencerenin oldukça büyük olduğu küçük q bölgesi “*Guinier Bölge*” olarak adlandırılır. Bu bölgede saçıcıların birbirine göre uzaklık bilgilerine ulaşılabilir. Bu bölgeden gelen bilgiler Guinier yaklaşımı yapılarak analiz edilir [33].

Guinier Yaklaşımı Ve Jirasyon Yarıçapının (R_G) Bulunması

Biyomoleküllerin araştırılmasında kullanılan SAXS yöntemindeki en yaygın uygulama jirasyon yarıçapının belirlenmesidir. Bir parçacığın görüşünden, SAXS eğrisinin en düşük çözünürlüklü bölgesi tek boyut parametresiyle (single size parameter) irdelenir. Bu parametre jirasyon yarıçapı olarak adlandırılır. Jirasyon yarıçapı, parçacığın merkezindeki her bir saçıcının uzaklığının ortalama kareköküdür. Yani örnek içindeki etkin saçıcı büyüklüğünün bir ölçüsüdür. Hacimsel yoğunluktan bahsettiğimiz bir sistemde r_i konumunda bulunan, $\rho(r_i)$ hacimsel yük yoğunluğuna sahip bir i saçıcısı için, genel olarak jirasyon yarıçapı denklem 4.8'deki gibi tanımlanır.

$$R_G^2 = \frac{\int_V \rho(r_i) r_i^2 dV_i}{\int_V \rho(r_i) dV_i} \quad (4.8)$$

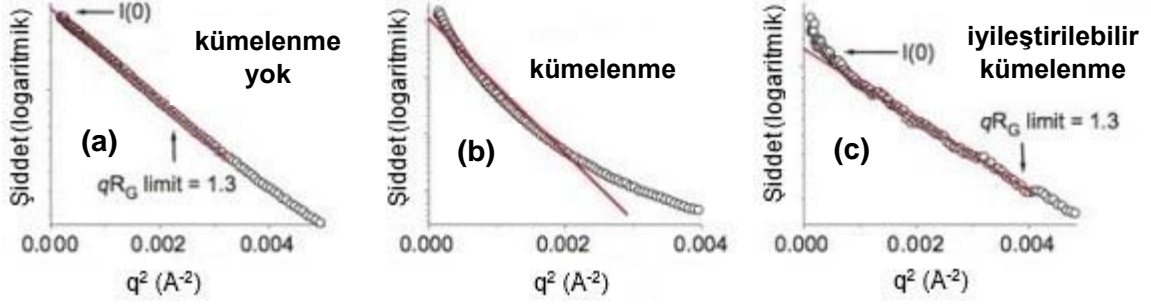
Guinier yaklaşımın yapılabilmesi için q değeri $1/R_G$ 'den daha küçük olmalı ve sistem, içindeki parçacıklar birbirinden bağımsız hareket edecek şekilde seyreltik olmalıdır. Bu model uygulama, düşük çözünürlükte ve saçılma vektörü q 'nun küçük olduğu ($q < 1/R_G$) durumlarda Guinier yaklaşımı olarak denklem 4.9'daki gibi ifade edilir.

$$I(q) = I(0) \exp \left[- (q^2 R_G^2) / 3 \right] \quad (4.9)$$

Denklem 4.9 logaritmik olacak şekilde yazıldığında denklem 4.10'daki şeklini alır.

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{1}{3} q^2 R_G^2 + O(q^4) \quad (4.10)$$

Çizilen $\ln I(q)$ 'ya karşı q^2 doğrusal Guinier grafiğinin eğiminden $R_G^2/3$ değeri geleceği için R_G jirasyon yarıçapı kolaylıkla hesaplanabilir. $\ln I(q)$ eksenini $q = 0$ 'da kesen noktadan da $I(0)$ hesaplanır. Böylelikle örneğin yapısı hakkında temel bir bilgiye sahip olunabilir. Guinier yaklaşımın geçerli olduğu q aralığı küçük R_G değerlerine sahip parçacıklar için daha geniştir. Örneğin küresel proteinler için $qR_G < 1,3$, elipsoid proteinler için $qR_G < 1,4$ değerinde olur.



Şekil 4.3. Üç farklı örnek için Guinier grafiği

Şekil 4.3'te [34] üç ayrı örnek için çizilen Guinier grafiğinden R_G ve $I(0)$ değerleri hesaplanmıştır. Literatüre taramalarına göre, kümelenmenin olduğu örnekten gelen saçılma grafiğinin doğrusal olmadığı bilinmektedir. Bazı örneklerde de c) grafiğinde olduğu gibi düzeltilebilir derecede kümelenmeyle karşılaşılabilir. Ancak bu durum farklı tampon çözeltinin seçilmesi, tekrar santrifüj veya filtrasyonla giderilebilir seviyededir.

Guinier bölgesinden elde edilecek diğer önemli parametre de sıfır açısındaki ($q=0$ için) şiddetin büyüklüğü olan $I(0)$ değeridir. Aslında buradaki $I(0)$ değeri, X ışınları kristalografisindeki $I(0,0,0)$ durumuna denk gelmektedir. $I(0)$ değeri parçacığın şeklinden bağımsız olmak üzere, saçıcının elektron sayısının karesi ile orantılıdır. Bu sayede bulunan $I(0)$ değeri kullanılarak moleküler ağırlık tayini yapılabilir.

Guinier grafiği ne kadar az doğrusal çıkarsa örnek o kadar elonge yapıdadır diyebiliriz. Grafiğin doğrusal olmadığı durumlarda, örnek ya tekrar Guinier yasası kullanılarak değerlendirilmelidir ya da R_G 'nin bulunması için Guinier yaklaşımı dışında başka bir yaklaşımın kullanılması gerekmektedir [33] [35].

Molekül Ağırlığı Tayini

Bir monodispers yapıda, özdeş parçacıklı ideal bir çözeltide, saçılma şiddeti örnekteki parçacık sayısı N ile doğrusal bağımlıdır. Tekli parçacıklardan gelen saçılma şiddeti $I(0)$ ise toplam saçılma uzunluğunun karesiyle orantılıdır. Böylelikle $I(0)$ ile molekül ağırlığı arasındaki ilgi denklem 4.11'deki bağıntıyla verilir.

$$I(0) = Nm^2(1 - \rho_0\psi)^2 \quad (4.11)$$

Bu denklemde m parçacığın elektron sayısı, ρ_0 ortalama elektron yoğunluğu, ψ ise parçacığın elektron sayısının hacmine olan oranıdır. Eğer saçılma eğrisi parçacık molaritesinin yoğunluğu ile orantılıysa, $I(0)$ kütlenin karesiyle orantılıdır. Genel anlamda monomerik (tek parçalı) birimlerin molariteleri bilinir ve hedef parçacığın yoğunluğu c olmak üzere, bu yoğunluk kütlenin hacme oranı olarak ifade edilir. Böylelikle c için denklem 4.12 yazılabilir.

$$c = N\mu m/N_A \quad (4.12)$$

Denklem 4.12'de c parçacıkların kimyasal oluşumlarına bağlılık göstermek üzere, N_A Avogadro sayısı, μ molekül ağırlığının elektron sayısına oranıdır (M/m). Proteinler için en iyi yaklaşımla μ , 1,87 değerindedir.

Denklem 4.11 ve 4.12'yi birbirine oranladığımız zaman denklem 4.13'deki formunu alır.

$$I(0)/c = \frac{N_A M}{\mu^2} (1 - \rho_0 \psi)^2 \quad (4.13)$$

Ψ , ρ_0 ve c değerleri bilindiği takdirde, sıfır noktasındaki saçılma şiddet değerinden molekül ağırlığı hesaplanabilir.

Hem Debye hem de Guinier yaklaşımından $I(0)$ değerinin kesin saptaması yapılabilir. Denklem 4.12'deki saçılma şiddeti denkleminde $q=0$ için denklem 4.14 ifadesi bulunur.

$$I(0) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) dr \quad (4.14)$$

Molekül ağırlığı aynı zamanda hacimle de ilgilidir. Porod değişmezine (Q) bağlı olarak Denklem 4.15'deki gibi hacim ifadesi yazılır.

$$V = 2\pi^2 \frac{I(0)}{Q} \quad (4.15)$$

Tanımlanan “değişmez” Q, elektron yoğunluğunun dalgalanmasının karesiyle orantılıdır ve integralin değeri örneğin yapısı ne olursa olsun sabit kalıp değişmediği için “değişmez (invariant)” olarak tanımlanır. Denklem 4.16'da integral formu verilmiştir ve saçılan toplam enerjiyle orantılıdır [33].

$$Q = \int_0^{\infty} q^2 I(q) dq = 2\pi^2 (\Delta\rho)^2 V \quad (4.16)$$

Uzaklık Dağılım Fonksiyonu

Homojen bir yapının saçılma eğrisi, parçacığın elektron dağılımına bağlı olarak da ifade edilebilir. Bu durumda “uzaklık dağılımı” adı verilen bir fonksiyon tanımlanır.

Uzaklık dağılım fonksiyonu ($P(r)$) örneğin içindeki saçılan parçacıkların elektronları arasındaki mesafe hakkında doğrudan bilgi veren bir fonksiyondur. Saçılma eğrisinin Fourier transformu ile doğrudan hesaplanabilir. Bir anlamda X ışınları kristalografisindeki Patterson fonksiyonu ile özdeştir. Ayrıca elektron yoğunluğundan da hesaplanabilir.

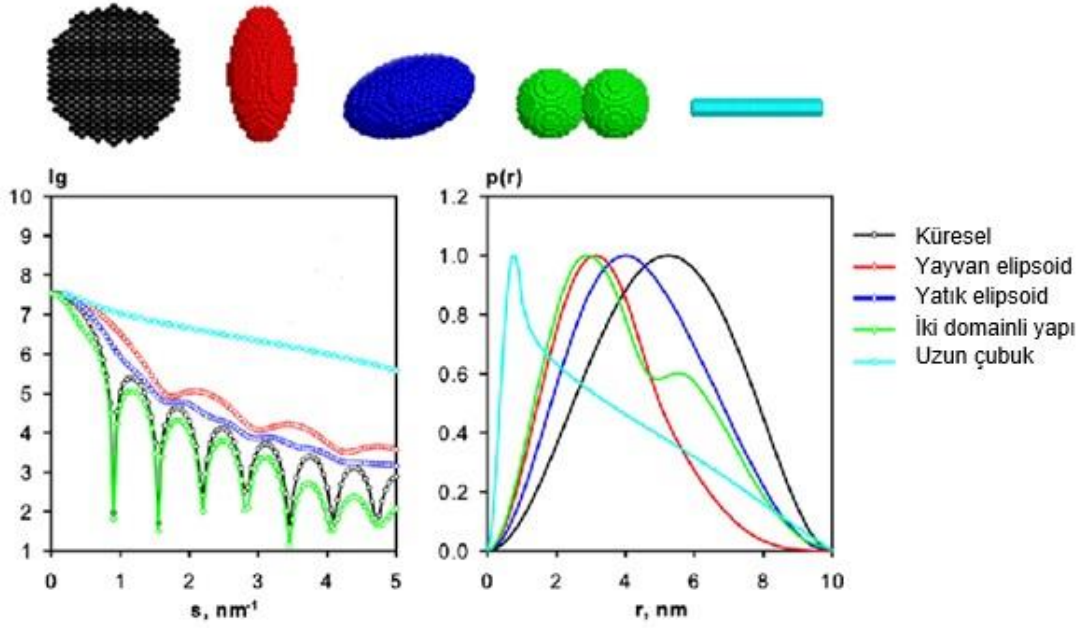
$$P(r) = r^2 \langle \int \Delta\rho(r)\Delta\rho(u+r)dr \rangle_{\Omega} \quad (4.17)$$

Örnekten toplanan bütün bilgiler göz önüne alındığında, $P(r)$ fonksiyonu kullanılarak R_G ve $I(0)$ değerlerine ulaşılabilir. Ayrıca Guinier yaklaşımında yapıldığı gibi küçük bir bölgeyle de sınırlı değildir. Böylelikle küçük miktardaki kümelenmelerden dolayı karışık yapılar daha iyi tahmin edilebilir. $P(r)$ fonksiyonu atomik modellerden de kolaylıkla hesaplanabilir ve yapının şekli hakkında ilk bilgileri verir.

Böylelikle $P(r)$ uzaklık dağılım fonksiyonu ve D_{max} saçılan parçacıklar arasındaki maksimum uzaklık olmak üzere denklem 4.4, denklem 4.18'deki formu alır [33].

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (4.18)$$

Uzaklık dağılım fonksiyonu saçılma verilerinin gerçek uzaydaki temsilidir ve parçacık biçimindeki özgünlüğü grafiksel olarak gösterir (Şekil 4.4). Örneğin küresel (globular) proteinler çanbiçimlidir ve yaklaşık olarak $D_{max}/2$ değerinde maksimuma sahiptir; çok domainli olan parçacıklarda ise bu eğride birden fazla pikler ve alt birimlerin iç ve dış uzaklıklarına bağlı olarak osilasyonlar olabilir [36]. $P(r)$ 'nin hesabında saçılma şiddetinin sadece sınırlı bir bölgesi değil q_{min} - q_{max} arasındaki bütün q değerleri kullanılır.



Şekil 4.4. Tipik geometrik biçimler için hesaplanan saçılma şiddetleri ve uzaklık dağılım fonksiyonları. Küresel, yayvan elipsoid (prolate), yatık elipsoid (oblate), iki-domainli ve uzun çubuk yapı için farklı renklerde eğriler verilmiştir [36].

4.4. Acra3 Peptidi İle SAXS Deneyleri Ve Analizi

4.4.1. Hecus SWAXS Sisteminde Yapılan Deneyler

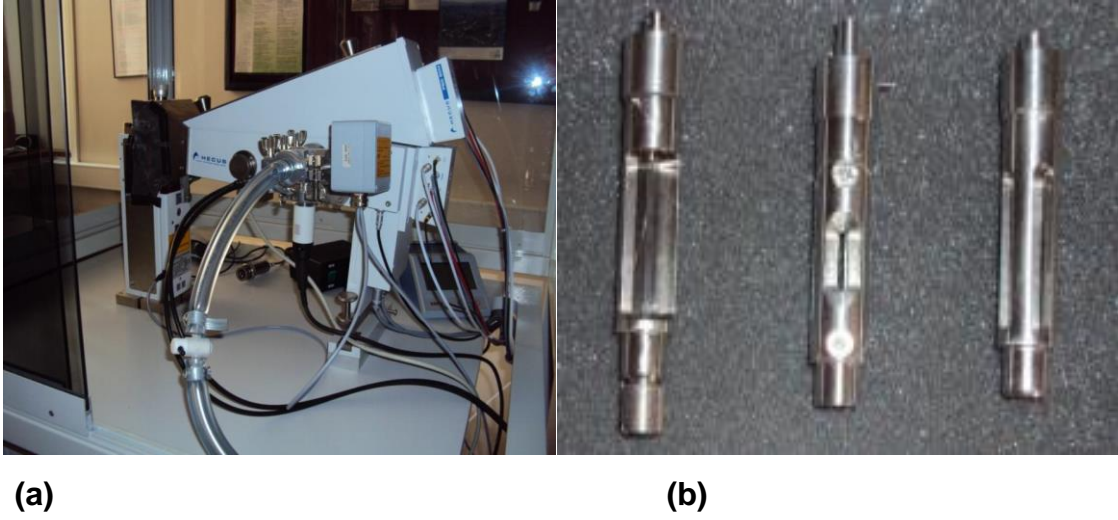
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'nde *Androctonus crassicauda*'dan saflaştırılan Acra3 örnekleri protein aktivitelerini kaybetmemeleri için -18 °C'de liyofilize durumda bekletildi. İlk SAXS deneyleri Hacettepe Üniversitesi, Fizik Mühendisliği Bölümü, X ışınları Laboratuvarı'nda bulunan Hecus SWAXS sisteminden gerçekleştirildi.

Disitile suda kolaylıkla çözülebilen Acra3 peptidi için dört farklı konsantrasyonda sulu çözelti hazırlandı. Bu çözeltiler hazırlanırken Çizelge 4.1'deki örnek miktarları kullanıldı.

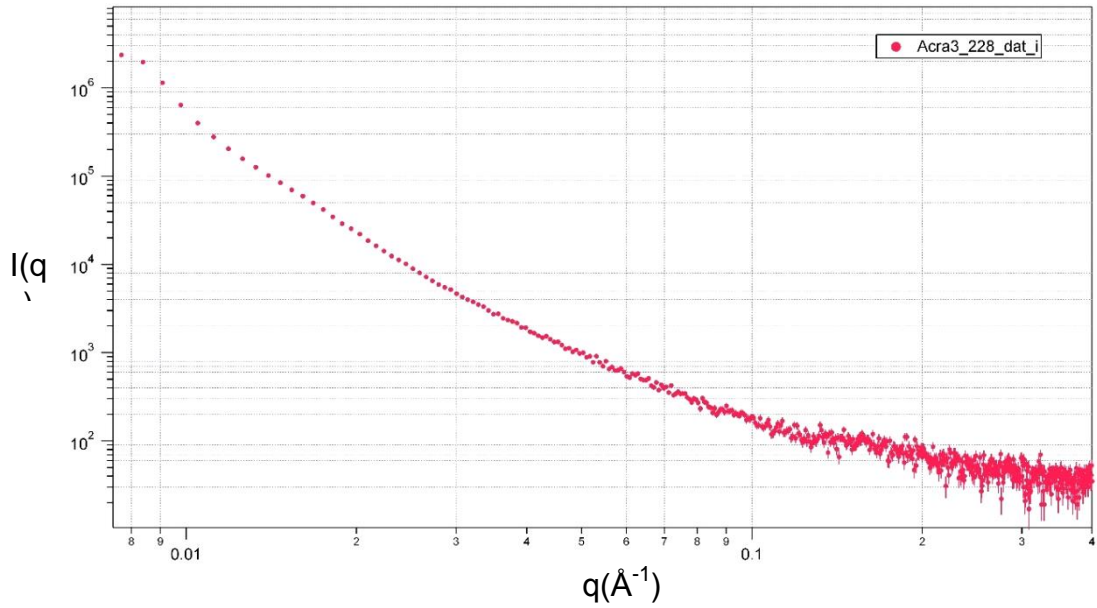
Çizelge 4.1. Acra3 peptidinin örnek ve konsantrasyon değerleri

HPLC Protokol Numarası	Örnek Miktarı (µg)	Konsantrasyon (µg/µl)
228	15	3,0
229	26	5,2
230	34	6,8
231	60	10,0

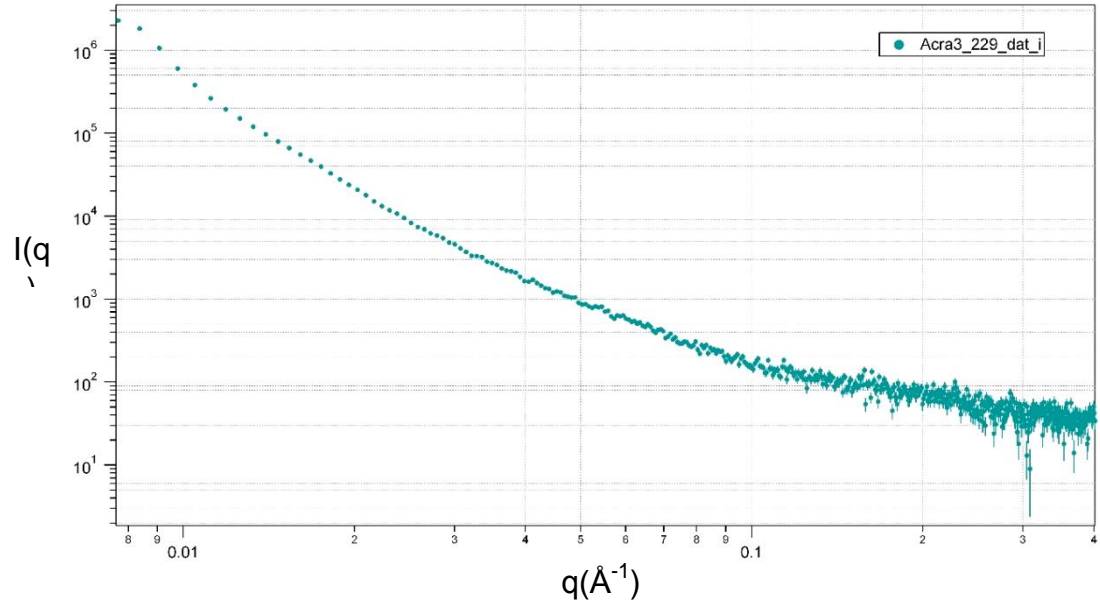
Farklı konsantrasyonlarda elde edilen Acra3 çözeltileri örnek tutuculardaki kuvars kapilere dikkatlice pipetle yüklendi ve 700 saniye ışınlanma süresiyle oda sıcaklığında Hecus SWAXS sisteminde (Resim 4.1) sırasıyla ölçümler alındı. Yapılan deneylerden alınan verilerle IGOR Pro programı kullanılarak $I(q)$ - q saçılma eğrileri farklı konsantrasyonlardaki tüm Acra3 örnekleri için çizdirildi (Grafik 4.1-4.4). Aynı zamanda konsantrasyonun farklı olmasına bağlı olarak saçılma grafiğinde oluşabilecek değişikliği görebilmek için şiddet eğrileri, program tarafından üst üste tekrar çizdirildi (Grafik 4.5).



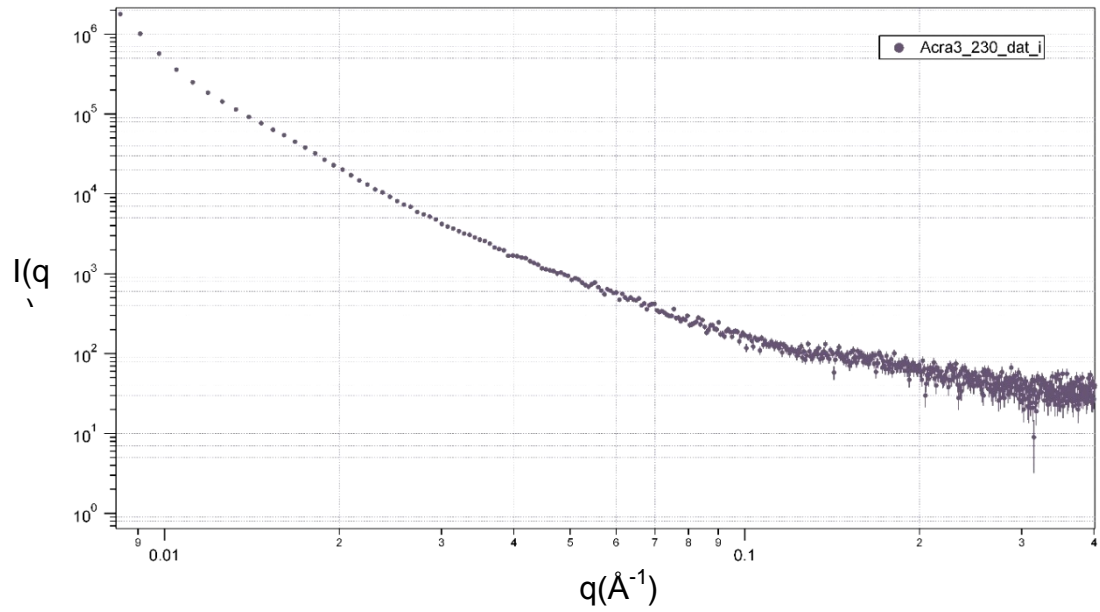
Resim 4.1 a) Hecus SWAXS sistemi **b)** Sıvı, toz ve plaka şeklindeki örnekler için kullanılan örnek tutucular



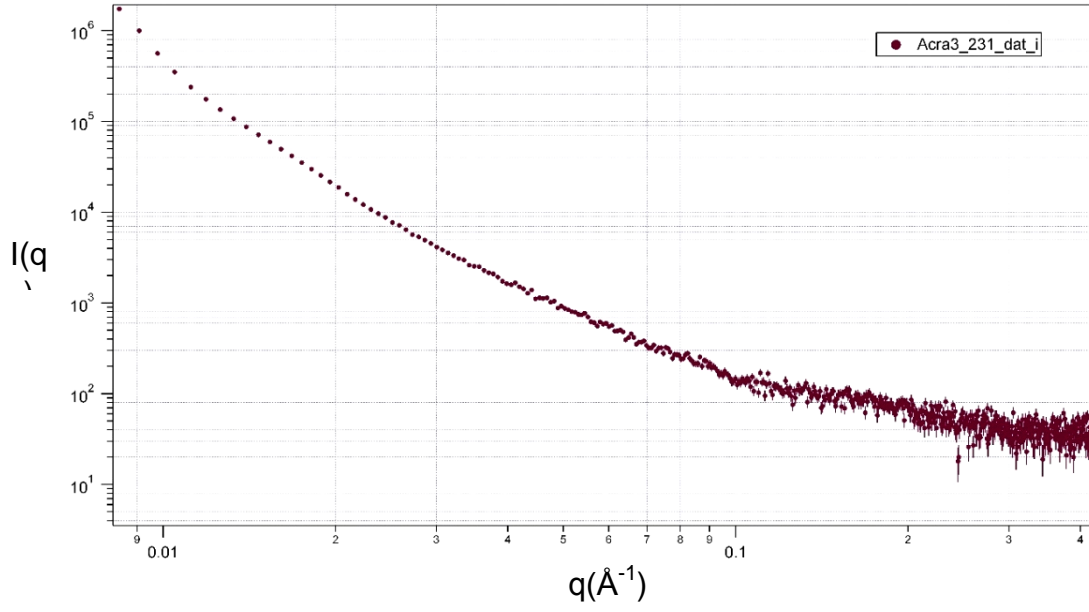
Grafik 4.1. Acra3_228 saçılma grafiği



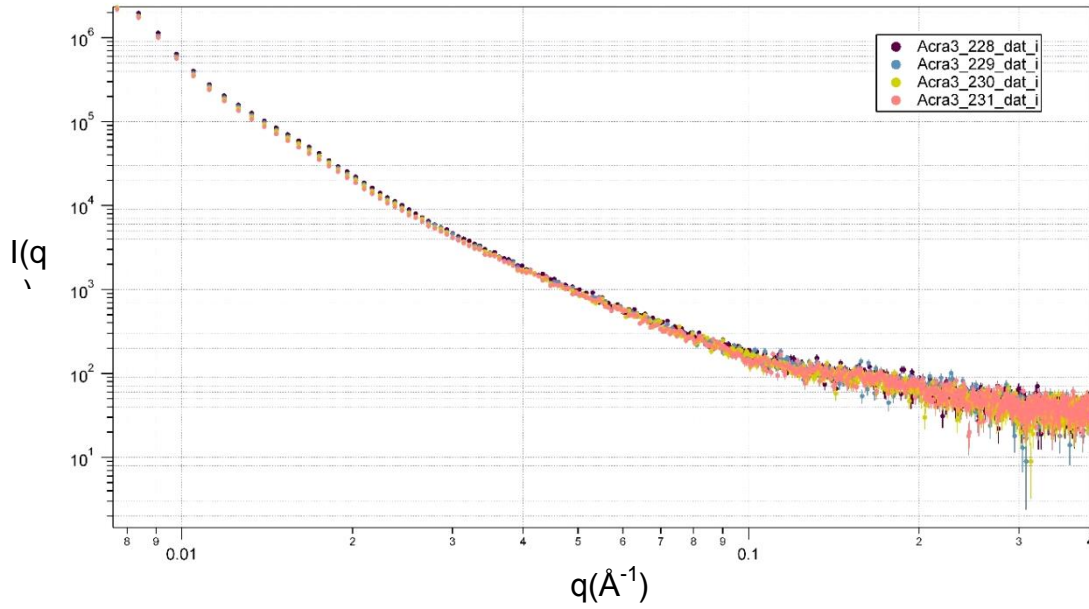
Grafik 4.2. Acra3_229 saçılma grafiği



Grafik 4.3. Acra3_230 saçılma grafiği



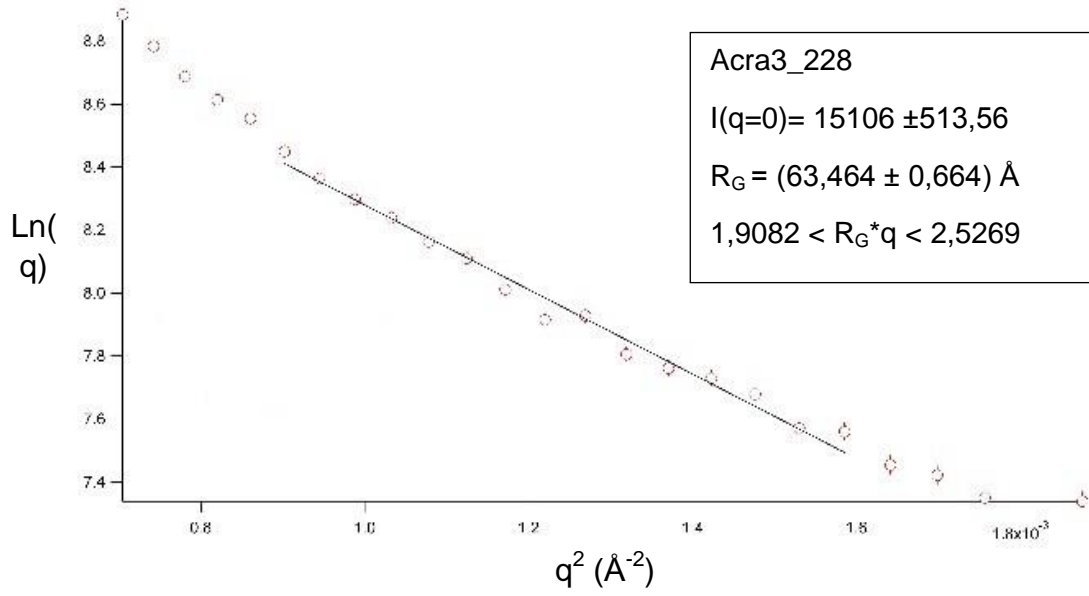
Grafik 4.4. Acra3_231 saçılma grafiği



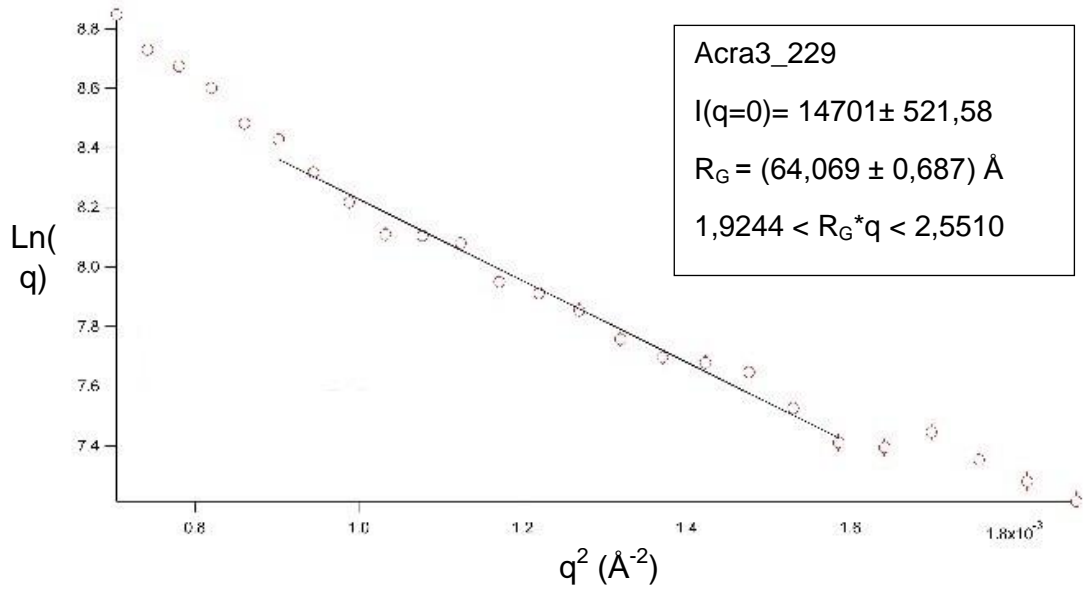
Grafik 4.5. Acra3'e ait dört farklı konsantrasyonun saçılma eğrileri

IGOR Pro üzerinden şiddet grafiği çizilen örnekler için aynı program üzerinden ayrı ayrı $\ln I(q)$ 'ya karşı q^2 grafikleri çizdirilerek Guinier bölgesinde analiz yapıldı (Grafik 4.6). Bu bölgede yapılan doğrusal fit analizleri sayesinde R_G jirasyon yarıçapı ve

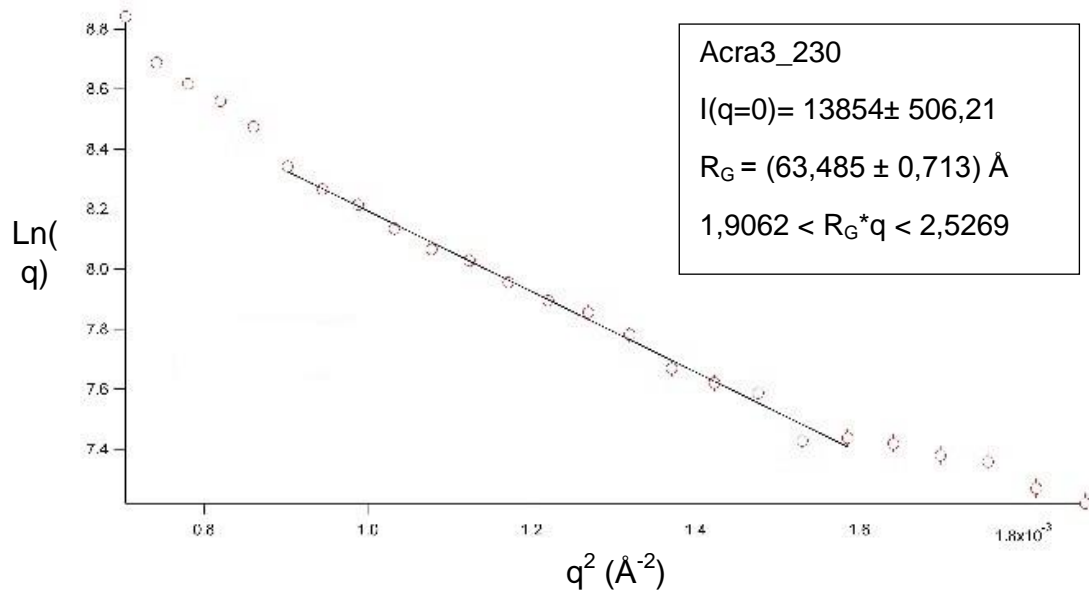
$I(0)$ şiddet değeri program tarafından hesaplandı. Aynı zamanda $q \cdot R_G$ değeri hesabından moleküllerin dağılımı ve biçimi hakkında ön bilgi elde edildi.



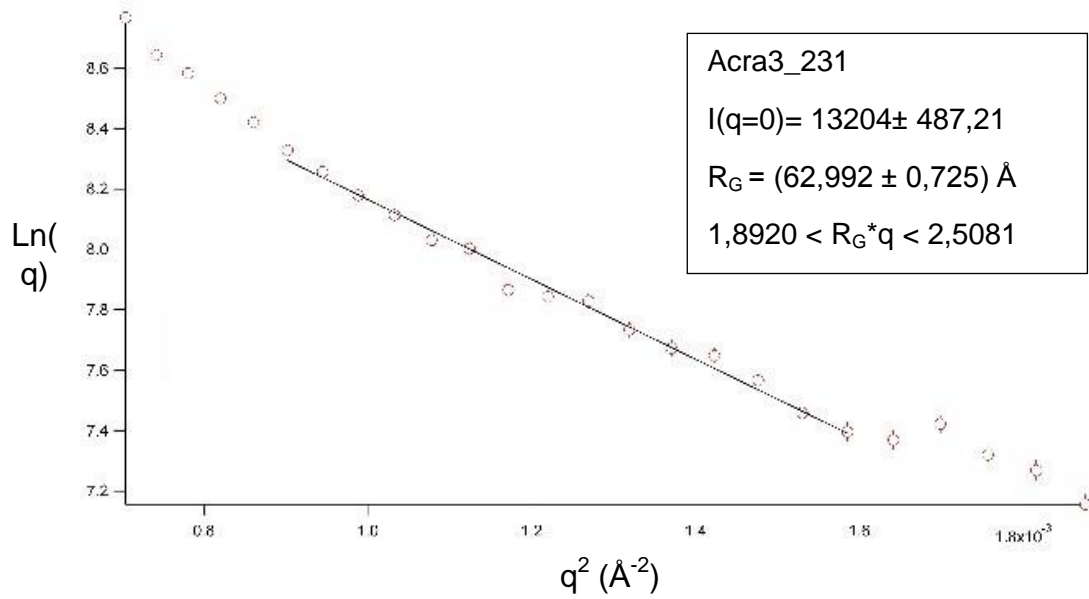
a) Acra3_228



b) Acra3_229



c) Acra3_230



d) Acra3_231

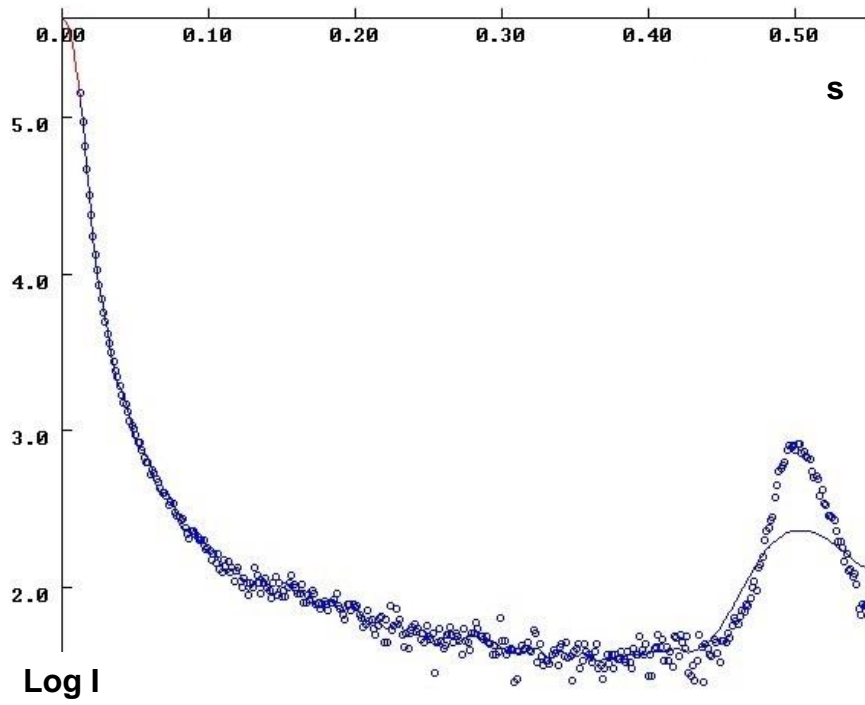
Grafik 4.6. Farklı konsantrasyonlarda Acra3 örneklerinin Guinier fit grafikleri

Yapılan analizlerde en doğru sonuca ulaşabilmek için Guinier bölgede farklı sayıda veri noktaları üzerinden fit işlemi yapıldı. Fakat en uygun sonuçlar Grafik 4.6'da görüldüğü gibi Guinier bölgedeki 15 veri noktası üzerinden alınan sonuçlar oldu. Bu sonuçlara göre Acra3_ 228, 229, 230 ve 231 için jirasyon yarıçapları sırasıyla

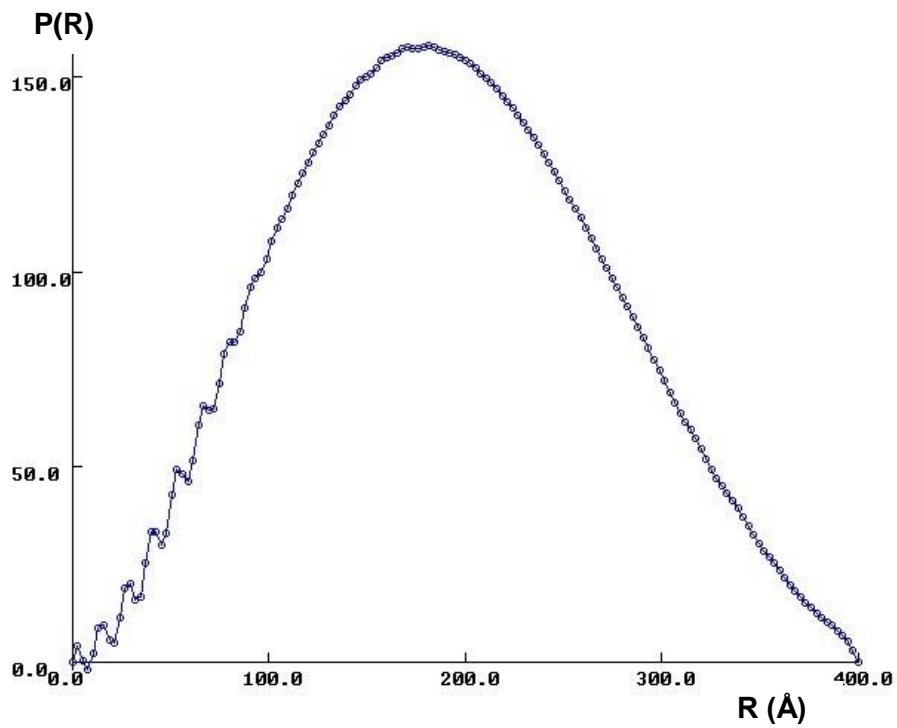
yaklaşık olarak 63,4Å, 64,1Å, 63,4Å ve 62,9Å olarak bulunmuştur. Küresel protein yapıları için $q \cdot R_G < 1,3$ olması gerekmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında, tüm örnekler için doğrusal fit işleminin limit değerini yaklaşık $1,9 < q \cdot R_G < 2,5$ aralığında olması küresel modelle uyuşmamaktadır ve örneklerde protein moleküllerinin kümelenmesine işaret etmektedir.

Sonuçlar beklendiği gibi çıkmadığı için ATSAS yazılım paketi içindeki GNOM [37] programı kullanılarak çizdirilen uzaklık dağılım fonksiyonuna bakılarak ve tekrar jirasyon yarıçapı hesaplanarak karşılaştırma yapıldı. Yapılan analizlerde Grafik 4.7'de verilen sonuçlara ulaşıldı.

Input file(s) : Acra3_228.dat *** JOB = 0
Reciprocal space: Rg = 146.76 , I(0) = 0.4266E+06

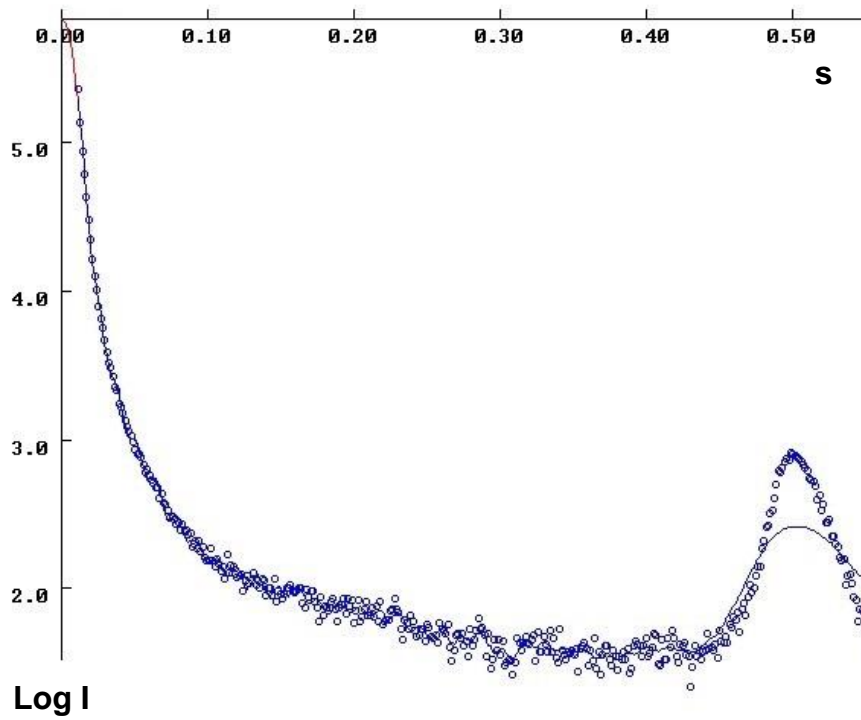


Input file(s) : Acra3_228.dat *** JOB = 0
Real space: Rg = 146.35 , I(0) = 0.4267E+06

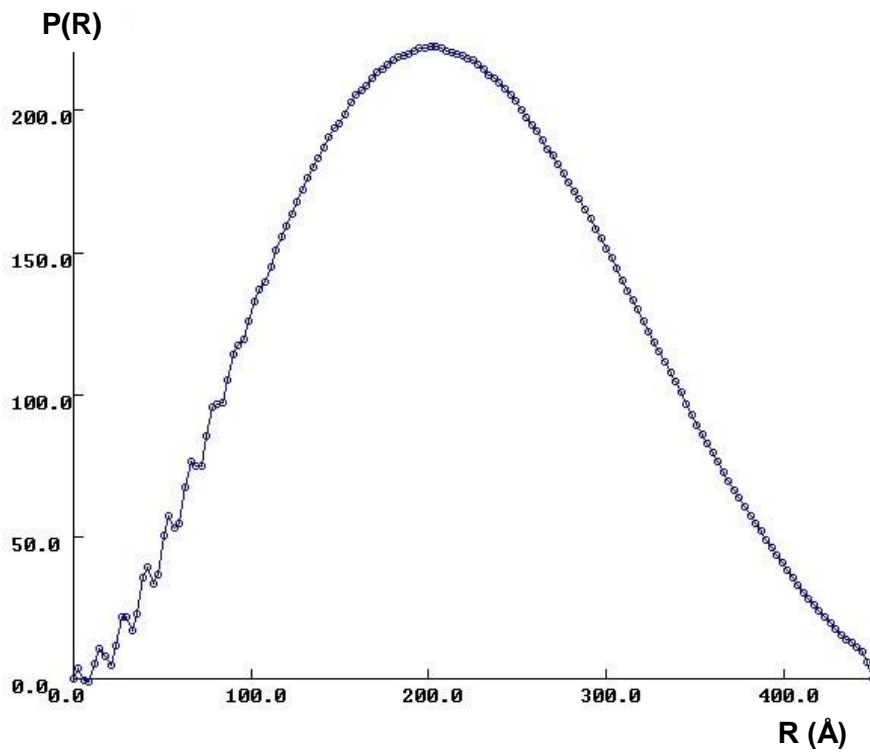


a) Acra3_228

Input file(s) : Acra3_229.dat *** JOB = 0
Reciprocal space: Rg = 166.27 , I(0) = 0.6793E+06

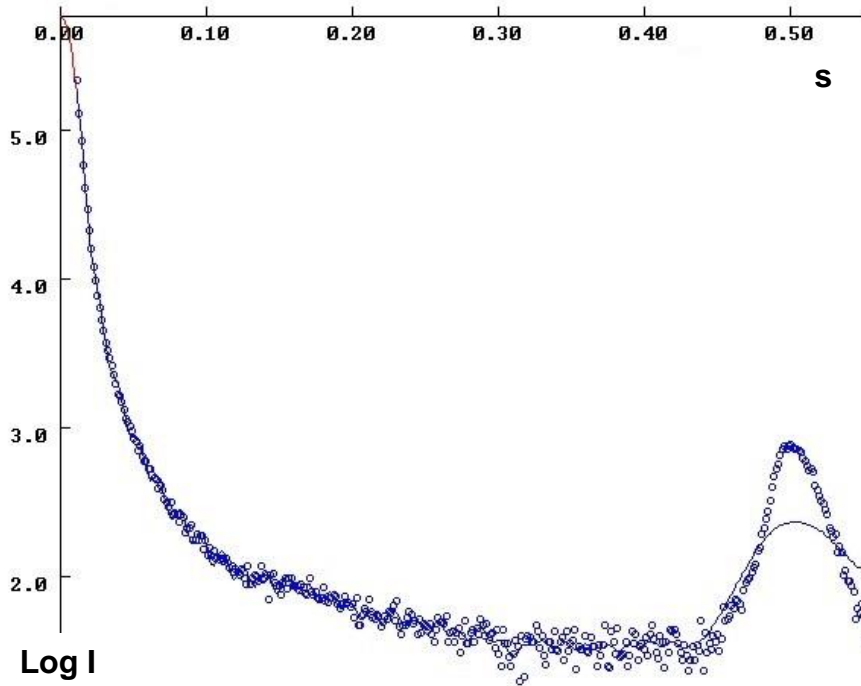


Input file(s) : Acra3_229.dat *** JOB = 0
Real space: Rg = 165.70 , I(0) = 0.6793E+06

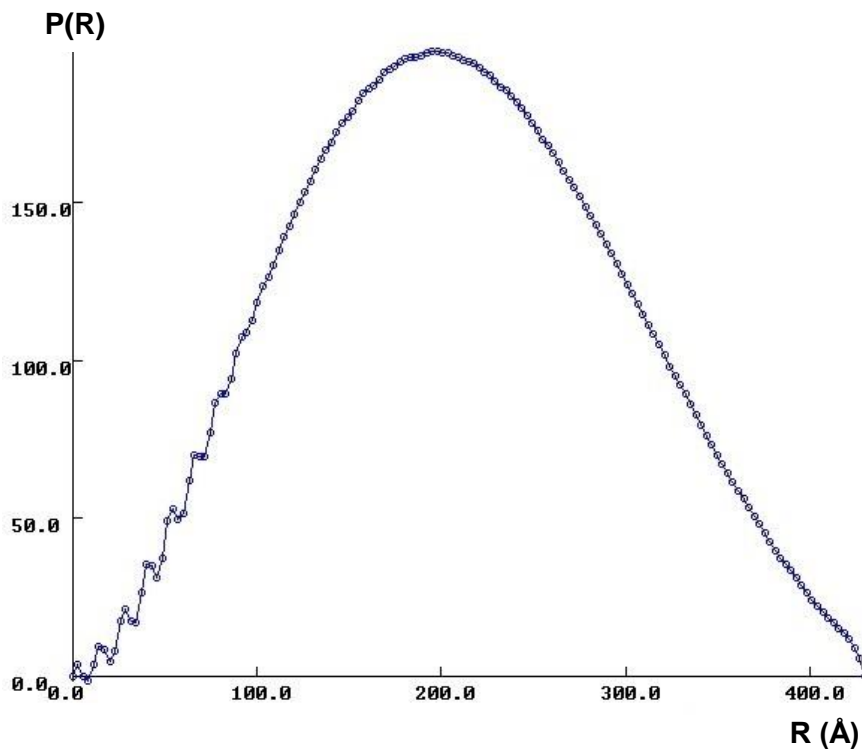


b) Acra3_229

Input file(s) : Acra3_230.dat *** JOB = 0
Reciprocal space: Rg = 161.02 , I(0) = 0.5856E+06

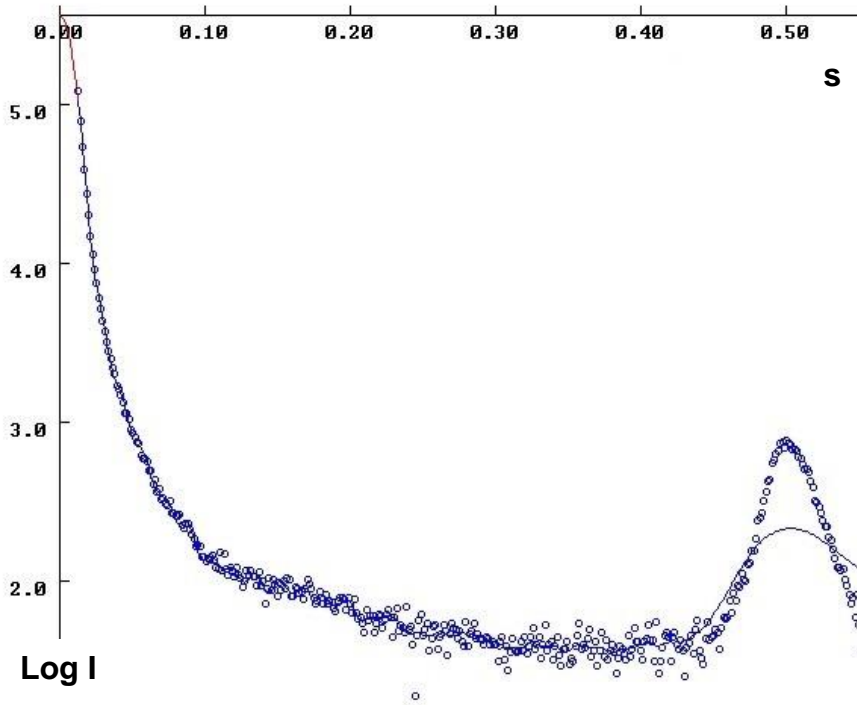


Input file(s) : Acra3_230.dat *** JOB = 0
Real space: Rg = 160.46 , I(0) = 0.5857E+06

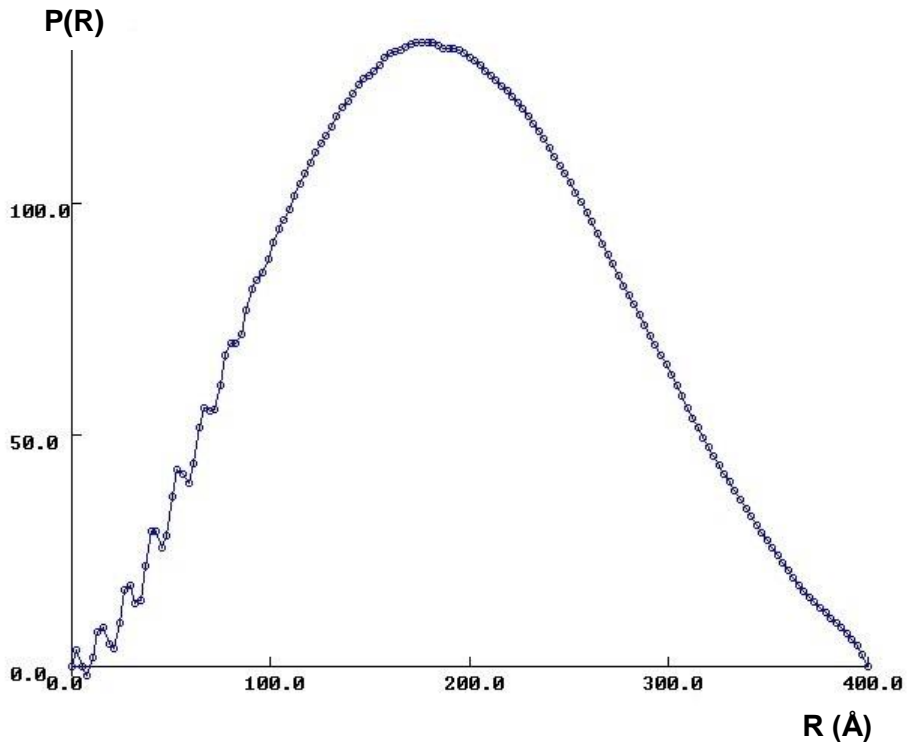


c) Acra3_230

Input file(s) : Acra3_231.dat *** JOB = 0
Reciprocal space: Rg = 147.28 , I(0) = 0.3657E+06



Input file(s) : Acra3_231.dat *** JOB = 0
Real space: Rg = 146.86 , I(0) = 0.3657E+06



d) Acra3_231

Grafik 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki Acra3 örneklerinin uzaklık dağılım fonksiyonları

GNOM programı ile yapılan analizler sonucunda, jirasyon yarıçapları a), b), c), ve d)' de görülen uzaklık dağılım fonksiyonu grafiklerinden sırasıyla: 146,35 Å, 165,70 Å, 160,46 Å ve 146,86 Å bulundu. Guinier analizinden elde edilen R_G değerlerine göre daha yüksek sonuçlar veren uzaklık dağılım fonksiyonları küresel yapılar için beklenen Gaussiyen şeklinde değildir. Ayrıca Guinier analizindeki doğrusal olmayan fitler ve uzaklık dağılım fonksiyonlarının formu örneklerdeki makromoleküllerin kümelenmesinden kaynaklanmıştır. Bu şekilde kümelenmiş örneklerden saçılmanın tüm veri setini etkileyeceği literatürde belirtilmektedir. Bu nedenle örnekteki protein moleküllerinin kümelenmesinin tampon koşullarını değiştirerek, santrifüjleyerek veya filtrasyon işlemiyle yok edilebileceği veya azaltılabileceği öne sürülmektedir[33].

Buradan yola çıkarak, elimizde stok olarak bulunan üç örneği santrifüjde $-4C^{\circ}$ de 12000 rpm devirde 2 dakika santrifüjleyerek SAXS deneylerini tekrarladık. Guiner analizleri sonucunda jirasyon yarıçaplarının biraz küçüldüğü, Acra3-228, 230 ve 231 için sırasıyla 50,32, 47,56 ve 49,95 Å değerlerine ulaştığı görülmüştür; $R_G \cdot q$ değerleri ise 1,0 – 2,0 aralığına kaymıştır. Ancak jirasyon yarıçaplarının son değerleri ve saçılma eğrileri protein moleküllerindeki kümelenmenin hala var olduğunu göstermektedir. Çözeltide gelişigüzel dağılım gösteren ve etkileşmeyen monodispers protein molekülleri için R_G jirasyon yarıçapının daha küçük olması beklenirdi.

Bu sebeple Acra3 peptidi ile yeni deneyler yapmak üzere bir proje yazılarak Hamburg, Desy Sinkrotron Merkezinde, PETRAIII'deki P12 Beamline'ına sunuldu. Projenin kabul edilerek veri toplama zamanı (beamtime) verilmesi üzerine yeniden saf Acra3 elde edilmesi için çalışmalara başlandı.

4.4.2. PETRAIII P12 BioSAXS Demet Hattında Yapılan Deneyler

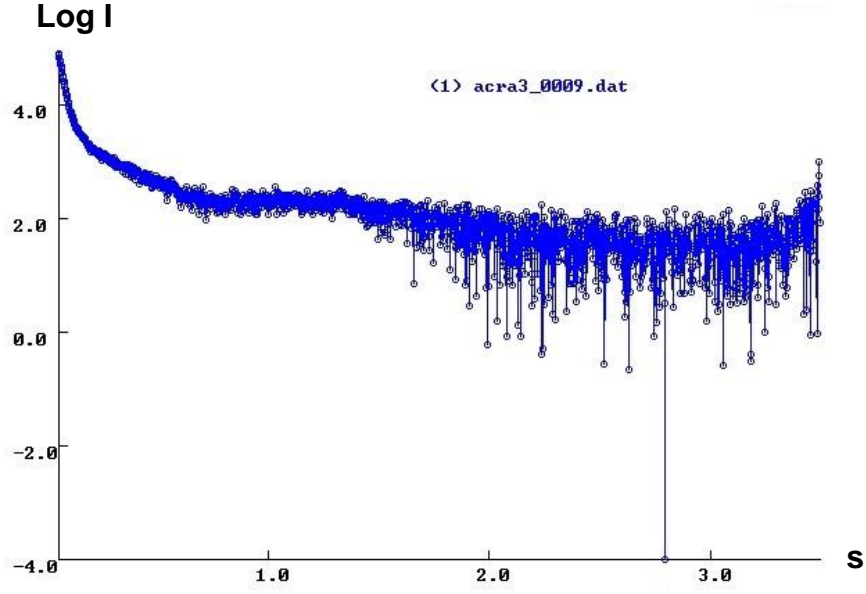
Hacettepe Üniversitesi'nde yapılan deneylerde istenilen verimin alınamamasından dolayı Acra3 peptidi yeni SAXS ölçümlerinin yapılması için Hamburg'da bulunan PETRAIII sinkrotron kaynağındaki P12 EMBL demet hattına (Resim 4.2) gönderildi. Ölçüm için P12'ye gönderilecek örneklerin miktarları 10-30 µl arasında olmalıdır. Sinkrotron ışını veri toplama süresince örneğe zarar verebileceği için deneyden önce, kümelenme etkisi ve/veya ışın zararını azaltması için örneğe indirgen kimyasal konulur. Her örnek için 1, 2, 5, 10 mg/ml gibi konsantrasyon serilerinde ölçümler yapılmalıdır. Bizim örneğimizde olduğu gibi yüksek

konsantrasyonda kümelenme göstermeye yatkın proteinler için, sinkrotron ölçümü alınmadan önce örneğin deney için uygun düşük konsantrasyonda olması gereklidir [38].

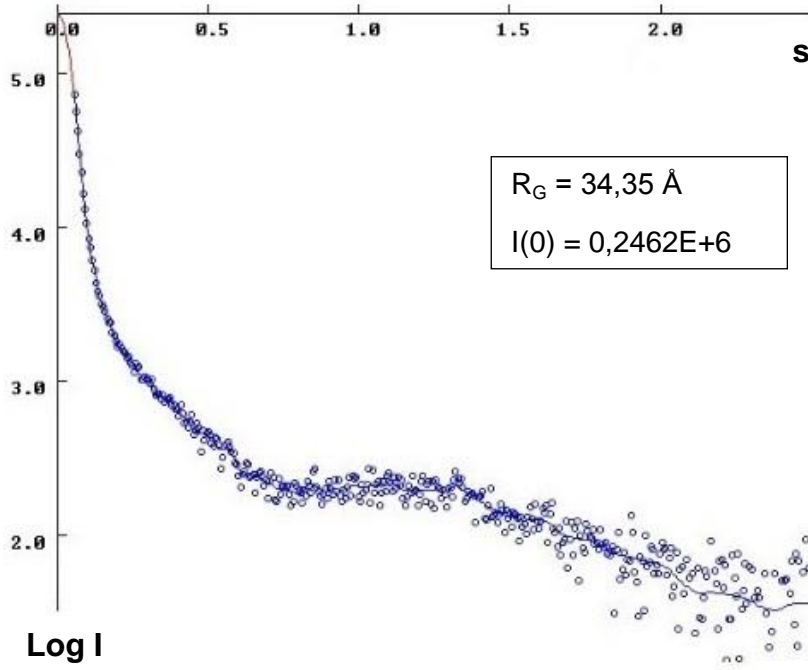


Resim 4.2 İkinci SAXS deneylerinin yapıldığı P12 demet hattı [39]

Zaman içerisinde akreplerin sayıca azalması ve protein verimlerinin düşmesinden dolayı Hamburg'a yaklaşık 70 μg civarında örnek gönderilebildi. Sıvı çözelti halindeki Acra3 örneğinin saçılma şiddeti Pilatus 2M pixel foton sayıcı dedektörle kaydedildi (Grafik 4.8). P12 demet hattından SAXS verileri ile ATSAS içindeki PRIMUS [40] ve GNOM programı üzerinden analizler tekrar yapıldı.



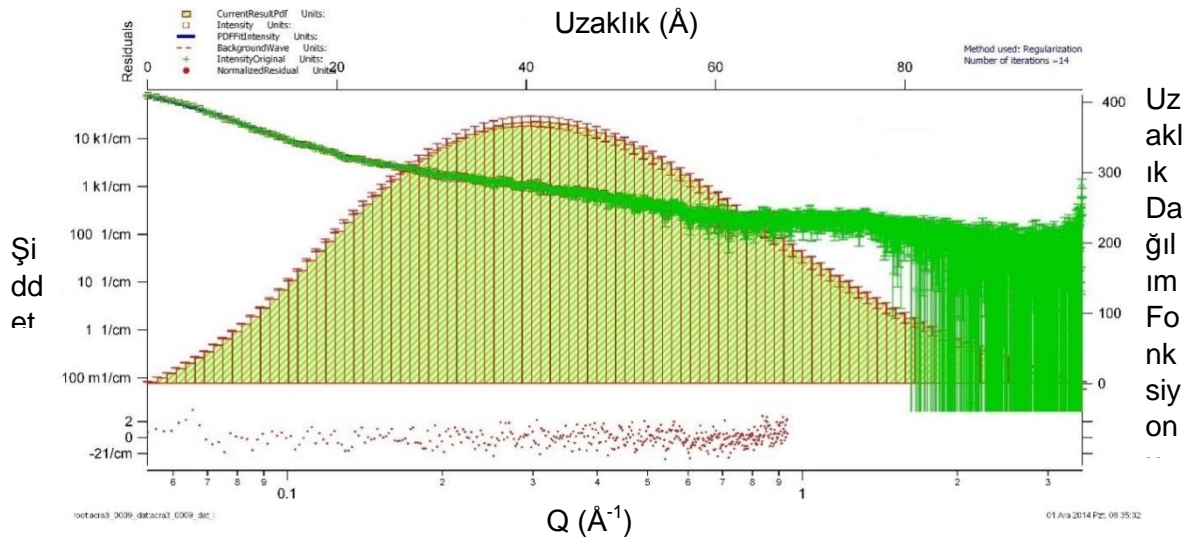
(a)



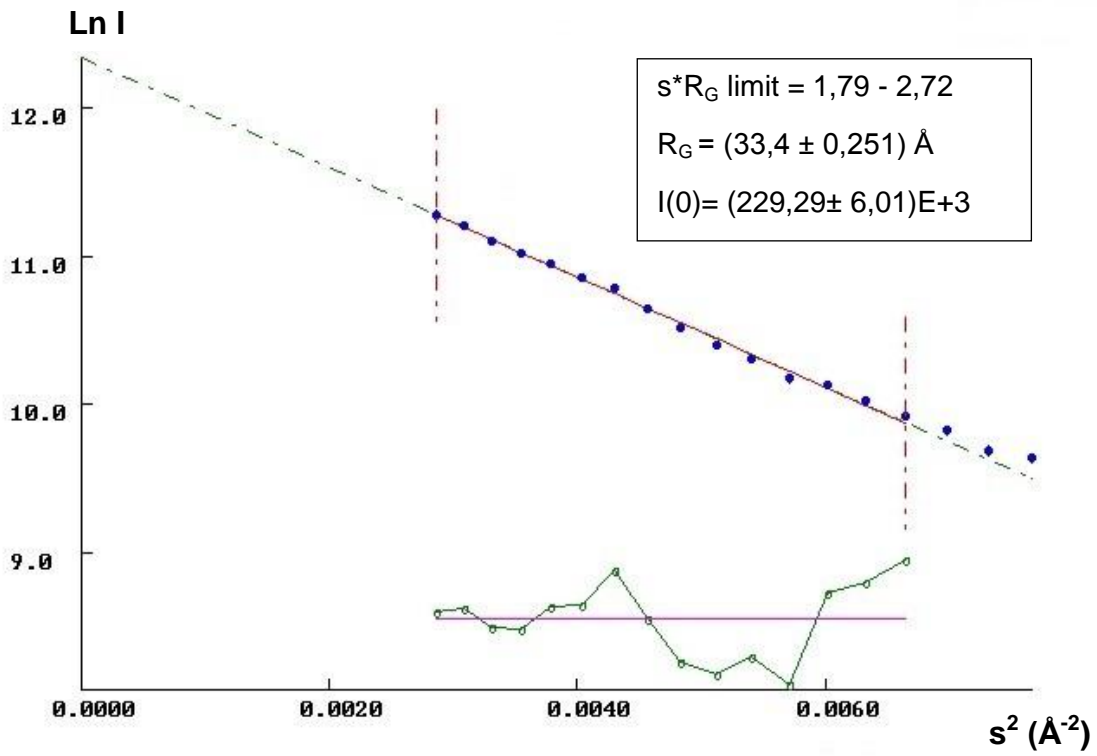
(b)

Grafik 4.8. a) Acra3 için SR saçılma grafiği PRIMUS b) Acra3 LogI-s GNOM

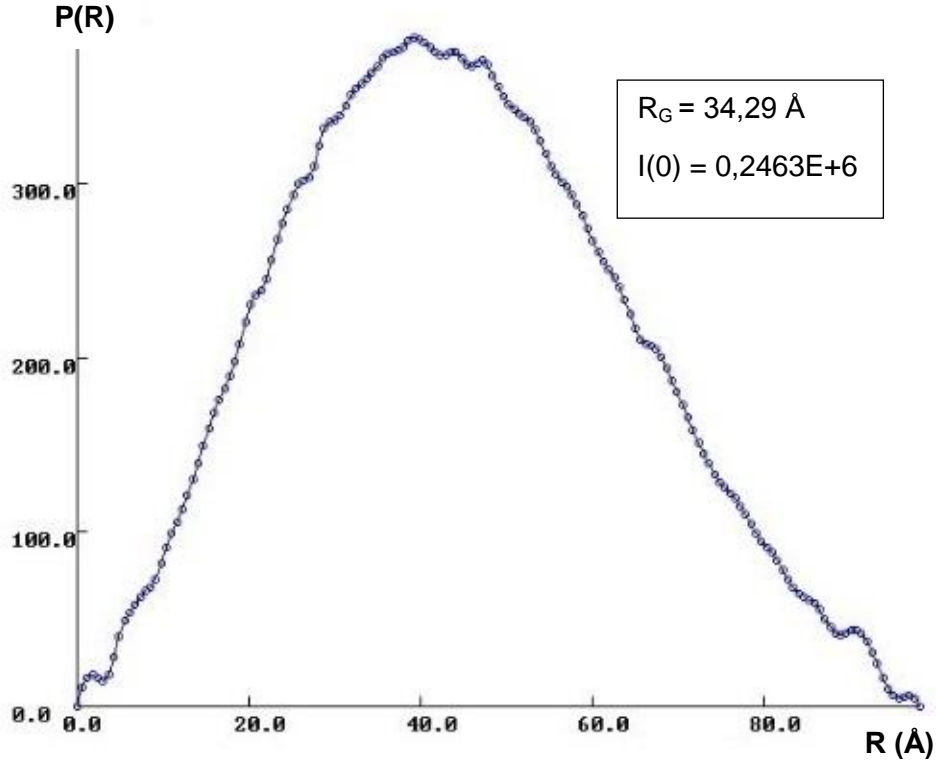
GNOM programı ile yapılan analizde R_G 34,35Å olarak bulundu. Acra3 için uzaklık dağılım fonksiyonu hem IGOR hem de GNOM üzerinde çizdirilerek Acra3'ün yapısı veri sonuçları üzerinden tekrar değerlendirildi.



Grafik 4.9. Acra3_0009 SR verisinin IGOR üzerinde hesaplanmış uzaklık dağılım fonksiyonu



(a)



(b)

Grafik 4.10. a) Acra3 Guinier analiz PRIMUS **b)** Acra3 uzaklık dağılım fonksiyonu GNOM

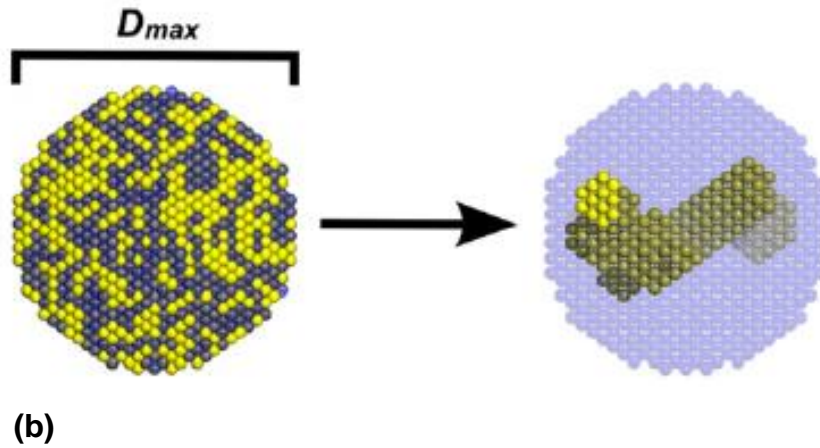
IGOR üzerinden Regularization yöntemiyle Acra3 için en iyi sonucu veren R_G değeri yaklaşık olarak 34,34 Å olarak bulundu. IGOR programı tahmini R_{max} değerini 98,7Å olarak hesapladı (Grafik 4.9).

Grafik 4.10.a)'da verilen ve PRIMUS programı kullanılarak yapılan analizde ise, Guinier bölgesinde 15 deneysel nokta ile beklenen doğrusal fit gözlemlendi. Çıkan $s_{max} * R_G$ sonucu küresel protein yapıları için 1,3'den, elipsoid protein yapıları için 1,4'ten küçük olmalıdır. Fakat bu yapılan analizde de $s_{max} * R_G$ değerinin 1,79 - 2,72 aralığında bulunması peptid molekülleri arasında kümelenmenin hala var olduğunun bir göstergesidir.

IGOR programı üzerinden gnom.out verisi alınarak GNOM üzerinden yeniden analizler yapılırken, bulunan R_{max} değerini kullandığımızda ortaya çıkan uzaklık dağılım fonksiyonunun formu Şekil 4.16.b)'de görüldüğü gibi basık küresel veya elipsoid (prolate, oblate) moleküler modele yakın çıktı; jirasyon yarıçapı ise 34,29 Å bulundu. Bu durum da değerlerin ve farklı programlar üzerinden yapılan analizlerin, birbirini desteklediğini gösterdi.

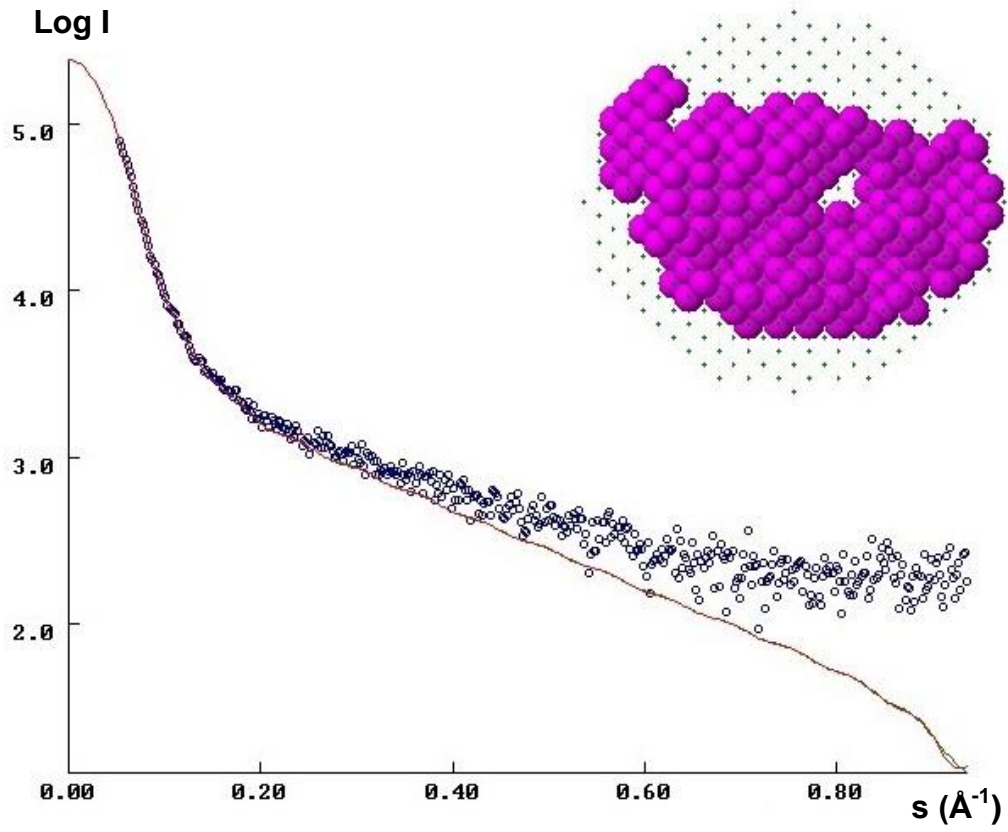
Ab Initio Yöntemi ile Modelleme

Çalışmanın devamında moleküler şeklin tahmini, yani düşük çözünürlüklü üç boyutlu yapının *ab initio* yaklaşımı ile modellenmesi yapılmıştır. Bu yöntem yapısı bilinen örneklerin saçılma desenlerinin hızlı analitik hesabını yaparak, deneysel ve hesaplanan saçılma eğrileri arasındaki uyumsuzluğu minimize eden bir algoritma kullanır. En çok tercih edilen *ab initio* modelleme programlarından biri olan DAMMIN (Dummy Atom Model Minimisation) bu tez kapsamında da kullanılmıştır. Program, tek bir parçacığı maksimum çapı deneysel olarak hesaplanan D_{max} ile tanımlanan küresel arama hacmi içinde sıkıştırılmış boncuk yapılarla temsil eden bir algoritma kullanır. Her bir boncuk oluşum rasgele çözücü ya da çözgen olarak atanır. Küresel hacim içinde geliş güzel dağılmış boncuk yapılar, SA (simulated annealing) yöntemi ile her bir adımda yeni modelin oluşmasını sağlayacak şekilde rasgele yer değiştirirler (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. DAMMIN programı ile bulunan *ab initio* model **a)** başlangıçtaki küresel hacim **b)** sarı parçacıklar küresel aranan hacim ve maviler çözücü [36]

Acra3 peptid molekülünün düşük çözünürlüklü *ab initio* modelini bulmak için DAMMIN [41] programı kullanıldı. Bunun için GNOM çıktı dosyası DAMMIN'e girildi ve deneysel verilerle model yapısı için hesaplanan değerler arasında iyi bir uyum elde edildi (Grafik 4.11).



Grafik 4.11. DAMMIN programından bulunan Acra3'ün düşük çözünürlüklü modeli

Tahmini olarak küresel veya elipsoid olarak beklenen Acra3 peptidinin yapısı, programdan çıkan analiz sonucunda elonge olmuş küresel yapıda, bir başka deyişle “oblate elipsoid” olarak gözlemlendi. Önceden yapılan Guinier analizleri ve programlar tarafından hesaplanan $s \cdot R_{max}$ değerlerine de bakarak örnekteki kümelenme nedeniyle burada elde edilen yapının tek bir peptid molekülüne ait olmayıp, kümelenmiş birkaç moleküle ait olduğu söylenebilir.

5. BİYOİNFORMATİK MODELLEME ÇALIŞMALARI

Proteinlerin büyük çoğunluğunun fonksiyonu, bu makromoleküllerin üç boyutlu yapılarına bağlıdır. Biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu yapılarının deneysel yöntemlerle belirlenmesi hem pahalı hem de yavaştır. Acra3 örneğinde olduğu gibi bazı proteinlerin kristalleştirilmesi ya hiç mümkün olmamakta veya çok fazla sayıda kristalizasyon tarama işlemine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle bu makromoleküllerin üçboyutlu yapılarının belirlenmesi çalışmalarında, proteinlerin uygun bir çözültide çözülerek yapılarının daha düşük çözünürlükte belirlenebilmesine fırsat veren SAXS ve NMR yöntemleri de tamamlayıcı teknikler olarak kullanılmaktadır.

Bu deneysel tekniklerin yanında, amaca yönelik iki ana sayısal hesaplama tekniği vardır: biyoinformatik yaklaşım ile moleküler dinamik simülasyonlar.

5.1. Biyoinformatik ve Biyolojik Veri Bankaları

Bilişimsel biyoloji yaklaşımı (biyoinformatik), biyokimya ve moleküler biyolojide makromoleküllerin fonksiyonlarının ve üç boyutlu yapılarının tahmininde tercih edilen güçlü bir yöntemdir ve protein dizi ve yapılarının istatistiksel analizini kullanır. Moleküler modelleme ve moleküler dinamik benzetişimler ise proteinlerin fonksiyonlarını ve katlanmalarını anlamak için fizik ve fiziksel kimyanın ilkelerini kullanır.

Biyoinformatik yaklaşımlardan olan dizi eşleme (sequence alignment) yöntemi ile, bir proteinin aminoasit dizisinden (birincil yapı) başlanarak evrimsel ilişkilerin analizi, protein fonksiyonuna ait bilgilerin çıkarılması, hatta proteinler arası homolojiden yararlanılarak benzer proteinlerin üçboyutlu yapılarını tahmin etmek mümkündür. Protein dizisindeki amino asit rezidülerinin belirli bir kesri evrimsel ilişkiler nedeniyle korunduğu için iki dizi arasındaki bağlantıyı kurmanın en kolay yolu özdeş ve benzer amino asitlerin sayısının belirlenmesidir, bu ise dizi eşleme ile yapılmaktadır. Amino asit dizilerinde ortalama % 25'in üstünde birebir eşleme gösteren proteinlerden birinin yapısı daha önce deneysel yöntemler ile belirlenmiş ise diğerinin yapısını in sliko homolojiye dayalı yapı tahmini (homology based modeling) yöntemi ile belirlemek mümkündür.

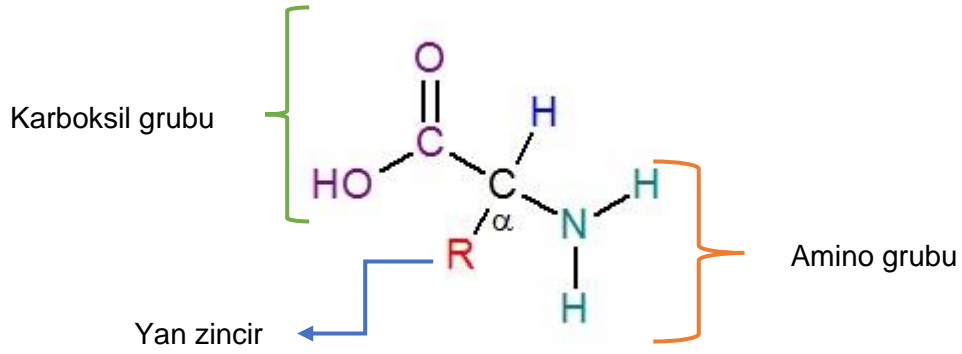
Biyolojik veri tabanları belirli tipte (DNA, Protein) organize edilmiş verileri içermektedir. Biyolojik veri tabanları arasında ilk kurulanı protein yapı bilgisi içeren

protein veri tabanıdır (Protein DataBank, PDB). Başlıca DNA dizilerini içeren üç merkez ise: Japon DNA veri tabanı (DNA DataBank of Japan (DDBJ)), Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (the European Molecular Biology Laboratory (EMBL)), ve Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi GenBank veri tabanı (GenBank, NCBI). Böyle bir ortak grup çerçevesinde nükleotid dizilerinin sunumunda ve betimlenmesinde ortak kurallar uygulanmasının yanısıra var olan bütün DNA dizilerinin kaynaklandığı ülke kayıtları tutulmakta ayrıca türler içi ve arasında evrimsel bağlantılar kurulması (taksonomi) amacıyla ortak projeler yürütülmektedir. Bu üç veri tabanından herhangi birine yollanan her nükleotid dizi verisi günlük olarak diğerlerinde de aynı veri yapısında yayımlanmaktadır. Bu yazılımlar verilen bir nükleotid ve protein dizisini kullanarak ilgili veri tabanlarını tarar ve olası homolog genleri bulurlar. Dizi eşleme yöntemleri ayrıca genler arası ve dolayısıyla türler arası benzerlikleri açığa çıkardığı için türler arası evrimsel yakınlıkların (taksonomi) bulunmasını sağlar. Bu veriler kullanılarak türler arası filogenetik ağaçlar yaratılmaktadır. Sekans eşleme amacıyla bilişimsel biyoloji yöntemleri (başlıca BLAST ya da FASTA) geliştirilmiştir. Standart sekans formatı FASTA olarak adlandırılır[42].

“Homolojik modelleme terimi” aynı zamanda “karşılaştırmalı modelleme” (comparative modeling) veya “şablon-tabanlı modelleme” (template-based modeling) olarak da adlandırılır ve deneysel olarak belirlenmiş benzer bir proteinin şablon olarak kullanılmasıyla, istenen proteinin üç boyutlu yapısının modellenmesine dayanır. Bir proteinin yapısının deneysel olarak aydınlatılması yeterli miktarlarda proteinin elde edilmesindeki güçlük (bizim yaptığımız gibi doğrudan organizmadan izole ederek saflaştırma veya klonlama, ekspresyon ve saflaştırma adımlarıyla miligram mertebelerinde örnek gerekliliği) ve kristalizasyon aşamalarındaki güçlükler nedeniyle çoğu kez gecikebilir. Bu şartlarda protein yapısını tahmine dayalı hesapsal yöntemlere ilgi giderek artmaktadır. Bu yöntemler arasında homolojik modelleme yöntemi genellikle en güvenilir sonuçları sağlamaktadır. Bu yöntemin kullanımı “aynı familyaya sahip ve benzer amino asit dizilimini paylaşan iki proteinin, benzer üç boyutlu yapıya sahip olduğu” gözlemine dayanır. Diğer bir deyişle problem, bir model şablon bulmaya indirgenir[43].

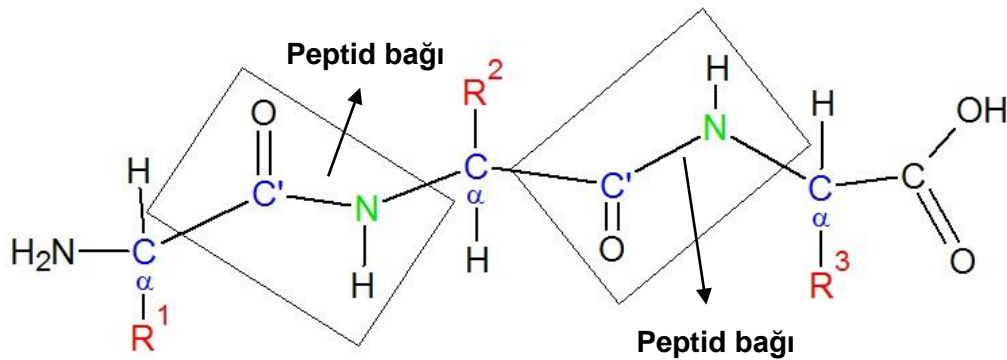
5.2. Proteinlerin Yapısı ve Temel Özellikleri

Proteinler peptid bağlarıyla birbirine bağlanan amino asitlerden meydana gelmiştir. Aminoasitler, merkez karbon atomunun bir ucunda karboksil, diğerinde amino grubu bulunan bileşiklerdir. Merkez karbon atomuna aynı zamanda bir hidrojen atomu ve R harfiyle gösterilen değişken bir yan zincir de bağlıdır. Bir amino asidin karboksil grubuyla diğer bir amino asidin amino grubunun, su açığa çıkararak birleşmesi sonucunda aralarında oluşan bağa peptid bağı adı verilir (Şekil 5.1) [44].



Şekil 5.1. Amino asit diyagramı

Karbon ve azot arasında oluşan tek bağ yaklaşık 1,5 Å, çift bağ ise 1,27 Å uzunluğundadır. Fakat iki aminoasitin birleşmesi sonucu oluşan peptid bağında rezonans ve mezomeri durumu olduğundan uzunluğu yaklaşık 1,32 Å kadardır. Bu durumda peptid bağı ne tek bağ kadar uzun, ne çift bağ kadar kısa olduğundan kısmen çift bağ olarak adlandırılabilir. Çift ve kısmi çift bağlar eksen etrafında dönemedikleri için peptid bağı oluşumuna katkıda bulunan atomlar bir düzlem içerisinde hareket halinde olurlar[45]. Şekil 5.2'de ChemSketch [46] programı ile çizilen bir polipeptid zinciri örneği bulunmaktadır.



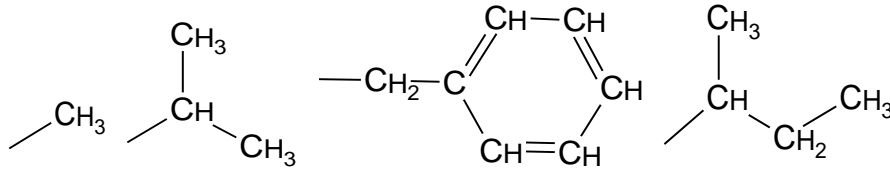
Şekil 5.2. Peptid bağı oluşturulan atomların buldukları düzlem yapılar

Şekil 5.2'de gösterilen Proteinin yapısal özelliklerini tanımlamak için, ana zinciri belli bir C_{α}' atomunda yanında bulunan C_{α} atomuna kadar bölerek incelemek gerekir. Bu sayede polipeptid zincirindeki bağ uzunlukları ve bağ açıları birbirine yakın olan peptid birimleri, Şekil 5.2'de olduğu gibi bir düzlemde sabitlenmiş olur.

Bu peptid birimleri zincir içerisinde C_{α} atomlarına kovalent bağ ile bağlanmış rijid gruplardır ve serbestlik dereceleri bu bağlar etrafındaki dönü hareketleridir. Peptid birimleri C_{α} -C ve C_{α} -N arasında oluşan bağlar etrafında dönerler. C_{α} -N arasındaki dönü açısı Φ , C_{α} -C arasındaki dönü açısı Ψ ile gösterilir.

Doğada 20 çeşit amino asit bulunmaktadır. Bir amino asidi diğerinden ayıran C_{α} atomuna bağlı olan yan zincirin yapısıdır. Bunlardan en basiti ise, merkez karbona bağlı olan yan zinciri H atomu olduğu için, Glisin amino asididir. Şekil 5.3'te Glisin hariç, tüm amino asitlerin yan zincir yapıları isimleri ve kısaltmaları verilmiştir.

Hidrofobik Amino Asitler

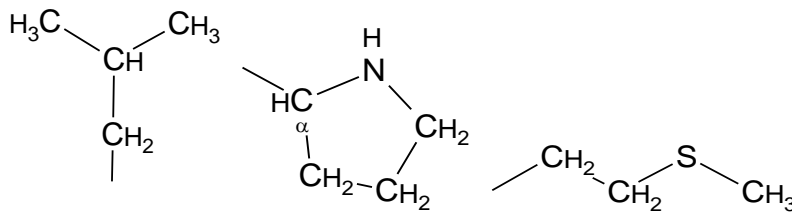


Ala, Alanin (A)
(I)

Val, Valin (V)

Phe, Fenilalanin (F)

Ile, İzolösin

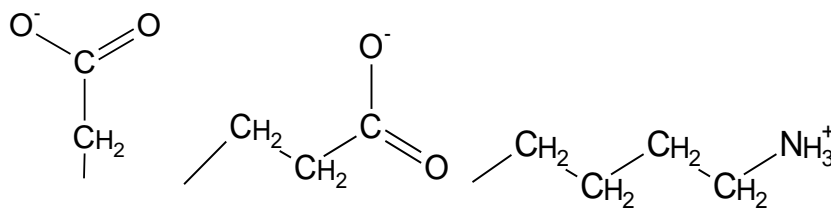


Leu, Lösin (L)

Pro, Prolin (P)

Met, Metiyonin (M)

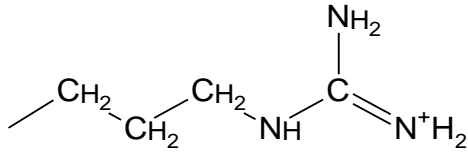
Yüklü Amino Asitler



Asp, Aspartik asit (D)

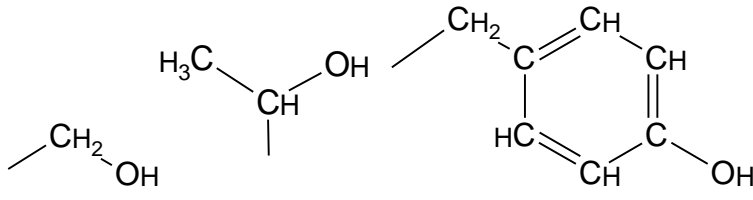
Glu, Glutamik asit (E)

Lys, Lizin (K)



Arg, Arjinin (R)

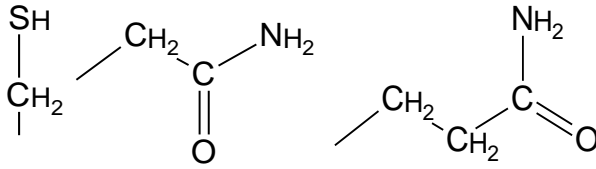
Polar Amino Asitler



Ser, Serin (S)

Thr, Treoinin (T)

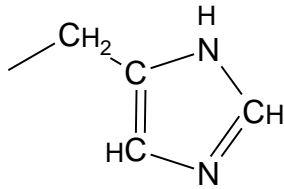
Tyr, Tirozin (Y)



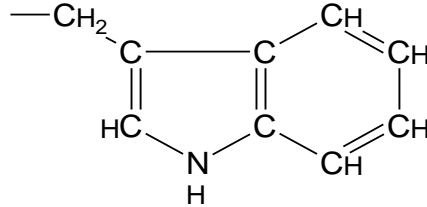
Cys, Sistein (C)

Asn, Asparajin (N)

Gln, Glutamin (Q)



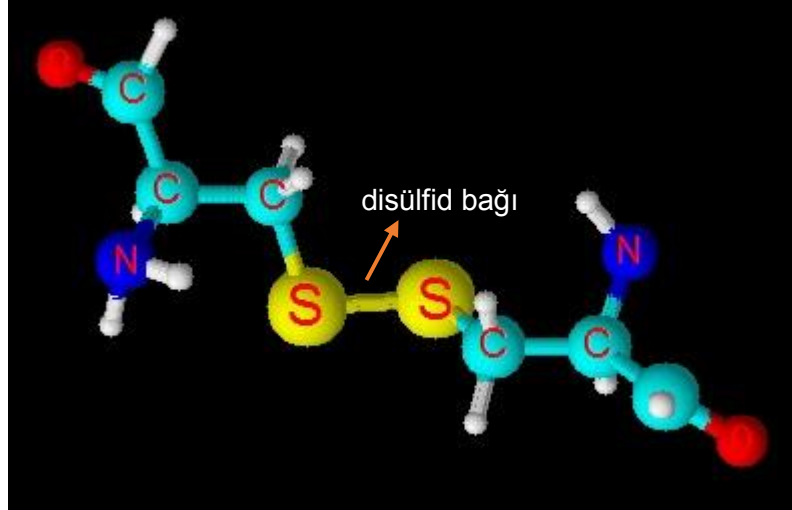
His, Histidin (H)



Trp, Triptofon (W)

Şekil 5.3. 20 çeşit amino asidin hidrofobik, polar ve yüklü olmak üzere üç farklı grupta verilen yan zincir yapıları

Protein yapısında bir önemli bağ da disülfid bağıdır. Şekil 5.3'de gösterilen amino asitlerden sistin amino asitleri arasında oluşur. İki sistin arasında hidrojen atomlarını kaybeden sülfhidril grupları arasında oluşan bağlardır (Şekil 5.4). Bu reaksiyon genellikle oksidatif ortamlara ihtiyaç duyar. Örneğin hücre içi proteinlerde bulunmaz ama hücreler tarafından salgılanan hücre dışı proteinler arasında oluşumu çokça görülür[44].



Şekil 5.4. İki sistin rezidüsünün birleşmesiyle oluşan yapı ve iki kükürt arasında oluşan disülfid bağı

Protein şeklinin oluşmasında ve korunmasında disülfid bağlarının önemli etkisi vardır. Disülfid bağı bir polipeptid içinde kurulacağı gibi, çeşitli polipeptid zincirlerinin birbirine bağlanmasını da sağlar.

5.2.1. Proteinlerin Birincil ve İkincil Yapıları

Bir proteini oluşturan amino asit dizilimi onun birincil (primer) yapısını oluşturur. Biyokimyada bu dizilim daima N terminal amino asitle başlayıp, C terminal amino asitle bitecek şekilde verilir[45].

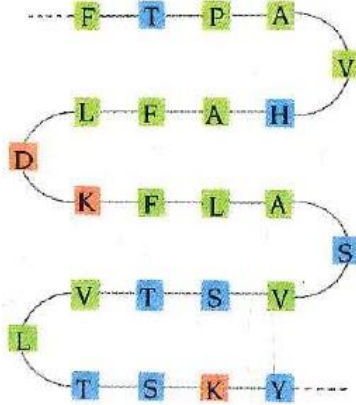
İkincil yapı ise, amino asitlerin protein zinciri içerisindeki yerel yapısını tanımlar. Proteinlerin temel yapı atomları arasında oluşan hidrojen bağları üç farklı ikincil yapıyı oluşturur. Bunlar alfa sarmalı, beta tabakası ve bağlantılardır. İkincil yapılar alfa sarmallarıyla beta tabakalarının farklı kombinasyonda bir araya gelmesinden oluşur[47].

α Sarmal Yapısı

Alfa sarmalı, bir polipeptid zincirindeki n'inci amino asitin C=O grubuyla ondan sonra gelen n+4'üncü amino asitin NH grubu arasındaki zayıf hidrojen bağı sayesinde oluşan kararlı bir bölgesel yapıdır. Alfa sarmalının bir dönüşünde 3,6 amino asit rezidüsü (yaklaşık 5,4Å uzunlukta) vardır. Bir polipeptid zincirindeki ilk NH ve son C=O grubu hariç, tüm NH ve C=O grupları hidrojen bağı ile bağlanarak α sarmal yapısına katılırlar[44].

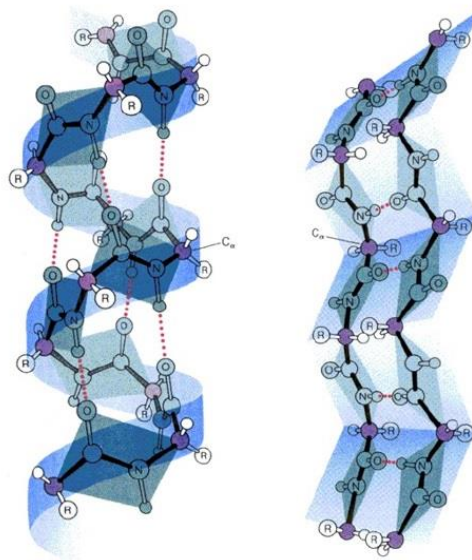
β Tabaka Yapısı

Beta tabakası, proteinin farklı bölgelerinin katlanıp paralel olarak yan yana gelmesiyle ve böylelikle C=O ve NH gruplarının hidrojen bağı ile bağlanmalarıyla oluşan bir yapıdır. Bu yapılar genellikle 5 ile 10 amino asit uzunluğundadır. Bu yapıyı oluşturan atomlar paralel ya da anti paralel konfigürasyonda bir araya gelirler[47].



Şekil 5.5. Birincil yapı [44]

Şekil 5.5'te bir proteinin amino asit diziliminden oluşan primer (birincil) yapısı gösterilmiştir. Şekil 5.6'da [48] ise biri araya gelerek proteinin ikincil ya da üçüncül yapısını oluşturan α sarmalı ve β tabakası gösterilmiştir.

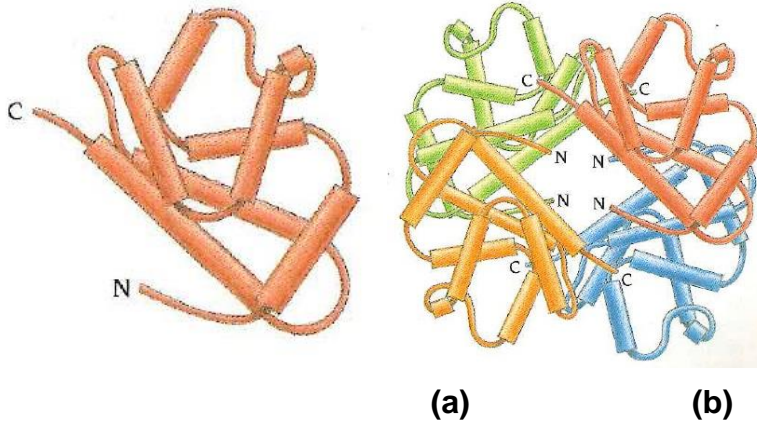


(a) (b)

Şekil 5.6. a) α sarmalı, b) β tabakası

5.2.2. Proteinlerin Üçüncül ve Dördüncül Yapıları

İkincil yapısı belli olan bir proteinin kıvrılıp katlanma etkisi de göz önüne alındığında üçüncül (tersiyer) yapısı ortaya çıkar. Birden fazla polipeptit zincirinin birbirine bağlanması ile de dördüncül (kuaterner) yapı meydana gelir. (Şekil 5.7). Zinciri oluşturan amino asitler arasındaki hidrojen bağları, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler, disülfid bağları ve van der Waals etkileşimlerine bağlı olarak proteinlerin yapıları şekillenir [48].



Şekil 5.7. a) Proteinin katlanmasıyla oluşan üçüncül yapı **b)** Farklı polipeptid zincirlerinin bağlanmasıyla oluşan dördüncül yapı [44]

5.3. Moleküler Kütle ve Aminoasit Diziliminin Saptanması

HPLC yöntemiyle *A. crassicauda*'dan saflaştırılan Acra3 peptidi ve *Buthacus macrocentrus*'dan saflaştırılan Bu1 peptidi için biyoinformatik modelleme çalışmaları yukarıda sözü edilen bazı sunucular yardımıyla yapıldı. Bu1 ve Acra3'ün modellemelerinin yapılabilmesi için kullanılan aminoasit dizisi (primer yapı) ve peptidlerin moleküler kütleleri Doç. Dr. Figen Çalışkan'ın önceden yaptığı çalışmalarda bulunmuş ve bu çalışmalar yayınlanmıştır [10] [12].

ACRA3'ÜN AMİNOASİT SEKANSI

**DRDGYVHDGTNCKYSCDIREKWEYCTPLCKRRNAKTGYC YAFACWCIGL
PDEVKVGDD GIFCKS**

Dizideki ilk 23 aminoasit DRDGYVHDGTNCKYSCDIREKW olarak görülür. İlk sekansta, Acra3'ün tüm amino asit sekansını belirlemek için gerekli klonlanan genin bilgisi vardır. Acra3 peptidinin tam amino asit sekansı; Edman degradasyonu, gen klonlama ve kütle spektrometresi analizlerinin kombinasyonu ile bulunmuştur. Acra3 peptidi, 8 tanesi sistin rezidüsü olmak üzere

66 amino asit rezidüsü ve 4 tane disülfid bağı olan bir amino asit sekansına sahiptir. Sentezlenmiş peptid C-terminal amidasyonla modifiye edildiği için, sekanstaki son amino asit rezidüsü serin amino asitidir. Elde edilen nükleotid sekansı Gen Bankasına GQ454796 erişim numarası ile yüklenmiştir.

5.4. Acra3 İçin Çoklu Dizi Eşleme(Multiple Sequence Alignment)

Acra3'ün amino asit dizilimi NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından FASTA formatında elde edildi. Çalışmanın diğer aşamalarında da kullanılacağı için bu formatta kayıt edilerek saklandı. Aynı zamanda, karşılıklı kontrol için, EBI (European Bioinformatics Institute) veri tabanında bulunan Expasy server grup içindeki UniProtKB kullanılarak da tarama yapıldı. cDNA kodlamasıyla oluşan Acra3 sekansı, ilk 17 amino asit sinyal peptidi ve onun takiben Acra3 dizisini oluşturan 67 amino asit olmak üzere, 84 amino asite sahip bir dizi olarak aşağıda verilen biçimde bulundu.

ACRA3 AMİNO ASİT SEKANSININ FASTA FORMATI

>gi|476007162|sp|E7BLC7.1|TX30_ANDCR RecName: Full=Toxin Acra3;

Flags: Precursor

**MKIIFLVLMILSEVYSDRDGYPVHDGTNCKYSCDIREKWEYCTPLCKRRNAKT
GYCYAFACWCIGLPDEVKVYGGDDGIFCKSG**

FASTA formatında yazılan Acra3 sekansın bilgileri;

Adı: Toxin Acra3

Organizma: Androctonus crassicauda (Arabian fat-tailed scorpion)

ID numarası: TX_30ANDCR

Erişim numarası: E7BLC7.1 [10]

Acra3 peptidiyle başka akrep peptidlerinin amino asit dizilerinin arasındaki benzerliği araştırmak için farklı sunucular üzerinde protein-protein blast taraması yapıldı. Yapılan bu taramalarda NCBI'da (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) elde edilen sonuçlarda 100 tane benzer protein için benzerlik yüzdeleri ve skorları gibi parametreler üzerinden bir sıralama ortaya çıktı. Taramada çıkan sonuçta benzer ilk 20 protein Çizelge 5.1'de gösterildi.

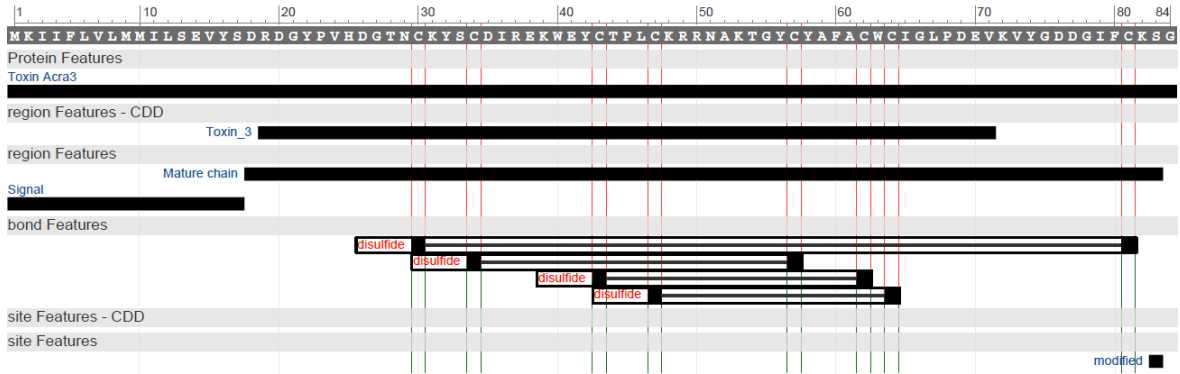
Çizelge 5.1. Acra3'ün NCBI protein-protein blast taraması

<u>Protein Adı</u>	<u>Erişim Numarası</u>	<u>Organizma Adı</u>	<u>Uyumluluk (%)</u>	<u>E-Value</u>
Toksin Acra3	E7BLC7.1	Androctonus crassicauda	100	4e-42
Toxin Aah6	P56743.1	Androctonus australis	74	1e-27
Neurotoxin LmNaTx35.2	P0CI55.1	Lychas mucronatus	65	2e-25
Neurotoxin-like protein STR1	P80950.1	Androctonus australis	66	3e-24
Putative neurotoxin Acra5	AGE83104.1	Androctonus crassicauda	60	4e-22
Neurotoxin Cex13	Q68PG2.1	Centruroides exilicauda	50	7e-09
Neurotoxin Cex3	Q68PH2.1	Centruroides exilicauda	48	3e-08
Neurotoxin Cex6	Q68PG9.1	Centruroides exilicauda	48	4e-08
Neurotoxin Cex4	Q68PH1.1	Centruroides exilicauda	47	9e-08
Cn5 scorpion toxin	2KJA A	Centruroides noxius	47	1e-07
Beta-toxin Cn5	P45663.1	Centruroides noxius	47	2e-07
Toxin Css 39.8	B7FDP2.1	Centruroides suffusus suffusus	47	2e-07
Sodium-channel modifier toxin (CsEv1d)	AAL23432.1	Centruroides exilicauda	48	2e-07
Toxin CII5b	Q7Z1K7.1	Centruroides limpidus limpidus	48	2e-07
Toxin CII5c	Q7YT61.1	Centruroides limpidus limpidus	48	3e-07
Sodium-channel modifier toxin (CsEv2b)	AAL23425.1	Centruroides exilicauda	48	3e-07

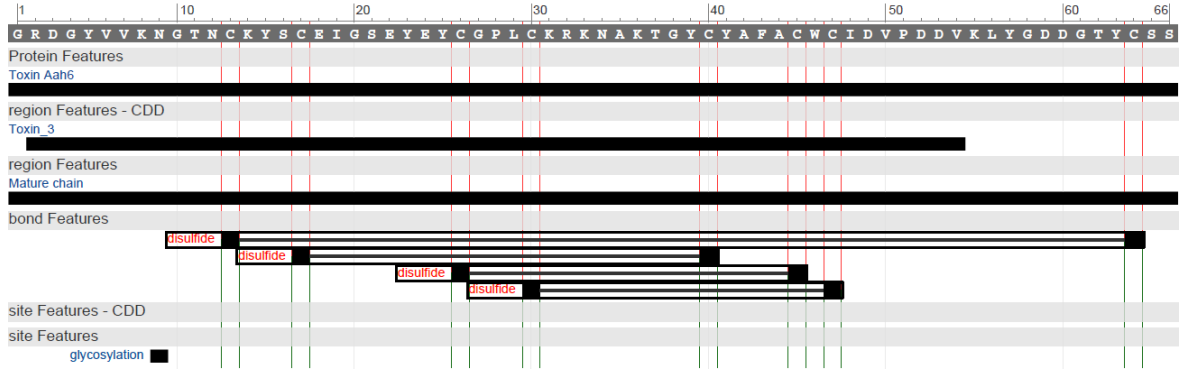
Çizelge 5.1 devam ediyor.

Toxin CII5c*	Q7Z1K6.1	Centruroides limpidus limpidus	48	3e-07
Neurotoxin LmNaTx30	P0CI52.1	Lychas mucronatus	51	5e-07
Toxin Cq2	P60163.1	Centruroides gracilis	42	5e-07
Recombinant long-chain sodium channel specific toxin8	ACD35699.1	Synthetic construct	51	5e-07

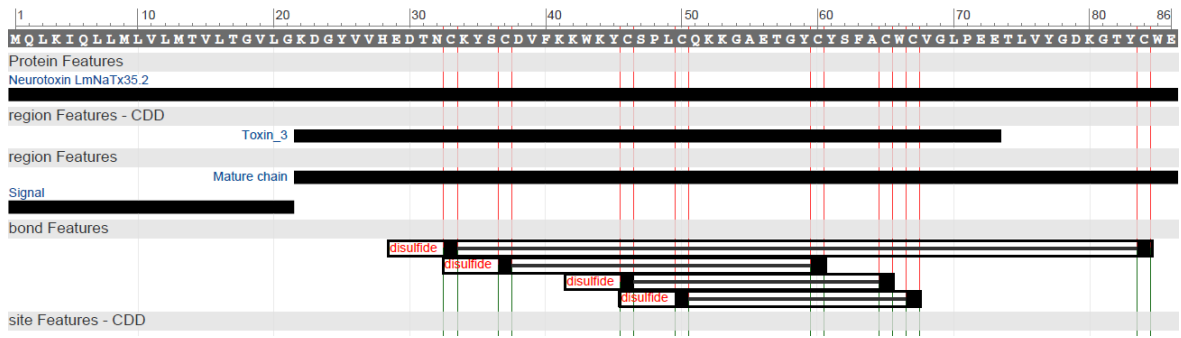
Yapılan tarama sonucu benzer ilk dört dizinin sekansı NCBI üzerinden incelendi. Bu incelemede taramasını yaptığımız Acra3 peptidi ile seçilen ilk dört protein dizisinin benzerliğine bakıldı (Şekil 5.8-11). Protein sekanslarında Cys (Cystine) rezidüsü olduğu ve amino asitler arasında bu sebepten oluşan disülfid bağları görüldü. Sekans farklılıklarından dolayı, disülfid bağları farklı Cys rezidüleri arasında konumlanır.



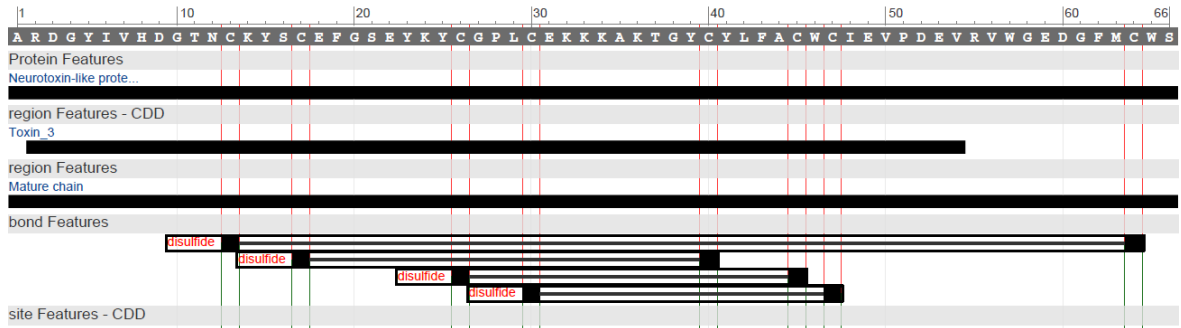
Şekil 5.8. Toxin Acra3'ün grafiksel gösterimi



Şekil 5.9. Toxin Aah6'nın grafiksel gösterimi



Şekil 5.10. Neurotoxin LmNaTx35.2'nin grafiksel gösterimi



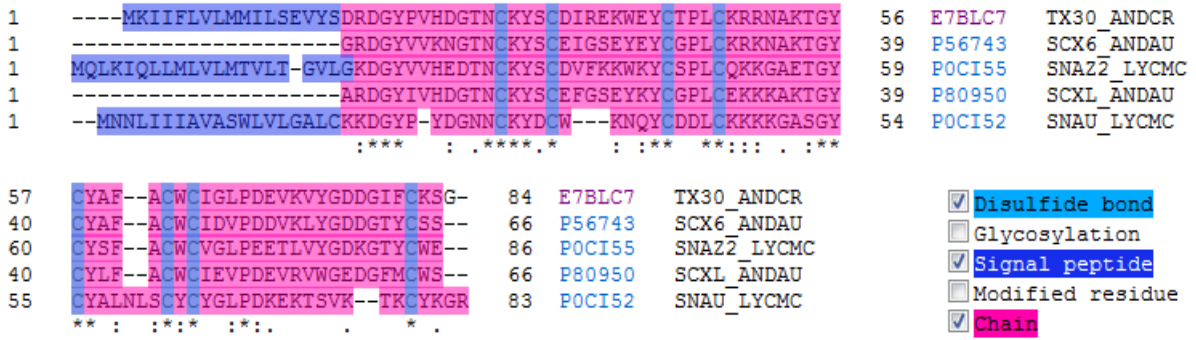
Şekil 5.11. Neurotoxin-like protein STR1 grafiksel gösterimi

Aynı işlem sonuçlarının birbirini desteklemesi için farklı sunucular üzerinden de yapılmıştır. EBI (The European Bioinformatics Institute [<http://www.ebi.ac.uk/>]) üzerindeki Bioinformatics Services içinde yer alan ve proteinler için uyumlu olan UniProt (The Universal Protein Resource) sunucusu üzerinden, UniProtKB veri tabanı kullanılarak BLAST ile tarama yapıldı. Bu taramada da Acra3 ile benzerlik içinde olan ilk 20 protein Çizelge 5.2'de gösterildi.

Çizelge 5.2. Acra3'ün EBI-UniProt Blast tarama sonuçları

Protein Adı	Erişim Numarası	Amino asit Sayısı	Skor	Uyumluluk (%)	E-Value
Toksin Acra3	E7BLC7	84	423	100	2e-56
Toxin Aah6	P56743	66	308	74	9e-38
Neurotoxin LmNaTx35.2	P0CI55	86	285	65	1e-33
Neurotoxin-like protein STR1	P80950	66	277	66	1e-32
Putative neurotoxin Acra5	M1J7U4	67	256	60	3e-29
Neurotoxin LmNaTx30	P0CI52	83	156	50	8e-13
Toxin Pg8	B7SNV8	82	155	52	1e-12
Neurotoxin Cex13	Q68PG2	73	152	50	2e-12
Neurotoxin Cex3	Q68PH2	69	150	48	4e-12
Neurotoxin Cex6	Q68PG9	69	149	48	6e-12
Toxin Cn11	P58296	63	145	52	2e-11
Neurotoxin Cex4	Q68PH1	87	145	47	4e-11
Toxin CII5b	Q7Z1K7	87	143	48	8e-11
Beta-toxin Cell8	P0CH40	64	140	47	1e-10
Toxin CII5*	Q7Z1K6	85	141	48	1e-10

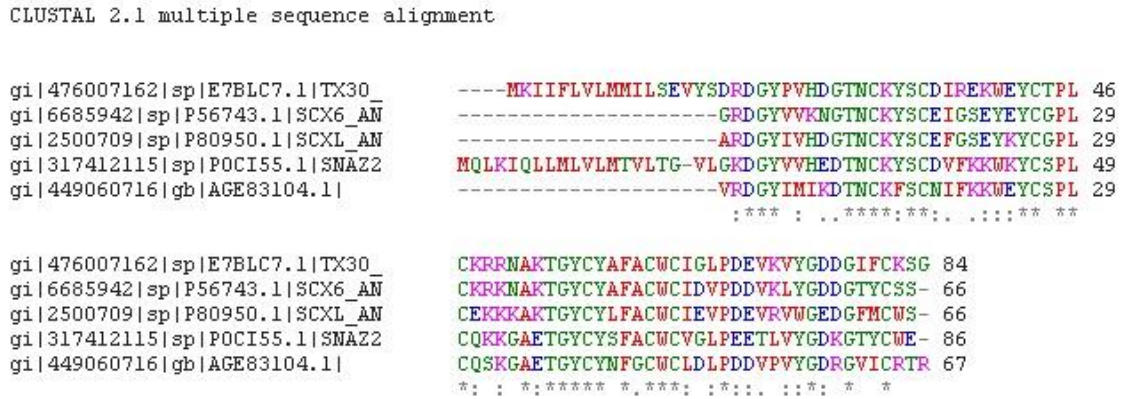
Tarama sonuçları alındıktan sonra seçilen ilk beş proteinle aynı program üzerinden Alignment yapıldı. Bu işlem sayesinde benzer proteinlerin sekans karşılaştırılması yapıldı. Sonuçta verilen amino asit karşılaştırmaları Şekil 5.12' de görülmektedir.



Şekil 5.12. EBI üzerinden yapılan taramada ilgili beş proteinin amino asit sekans benzerliği

Şekil 5.12’de gösterilen çoklu dizi eşleme işlemi sonucunda, Acra3’ün ve seçilen proteinlerin birincil yapıları arasındaki benzerlik ortaya çıkarıldı. Protein yapısı içerisinde, 8 sistin amino asitinden dolayı oluşan 4 disülfid bağı vardır. Bunların dışında sekans analizi için yapılan klonlama işleminden kaynaklanan 17 tane sinyal molekülü (amino asit) vardır.

EBI üzerinde yer alan ClustalW2 kullanılarak aynı peptidler için dizi benzerliğine tekrar bakıldı ve birincil yapıyı oluşturan amino asit zincirindeki amino asit benzerliği farklı bir sunucu üzerinden tekrar görüldü (Şekil 5.13).



Şekil 5.13. ClustalW2 sunucusu üzerinden yapılan çoklu dizi eşlemesi

5.5. Bu1 İçin Çoklu Dizi Eşleme(Multiple Sequence Alignment)

Acra3 gibi FASTA formatında gen bankasına kaydedilen (erişim numarası JQ038136) Bu1 peptidi için de işlemler aynı şekilde tekrar edildi.

BU1 AMİNO ASİT SEKANSININ FASTA FORMATI

>gi|387935379|sp|P0DJH8.1|SCX1_BUTMA RecName: Full=Alpha-toxin Bu1
GVRDAYIADDKNCVYTCAKNSYCNTECTKNGAESGYCQWLGKYGNWCWCIKL
PDKVPIRIPGRCRGR

FASTA formatında yazılan Bu1 sekansının bilgileri;

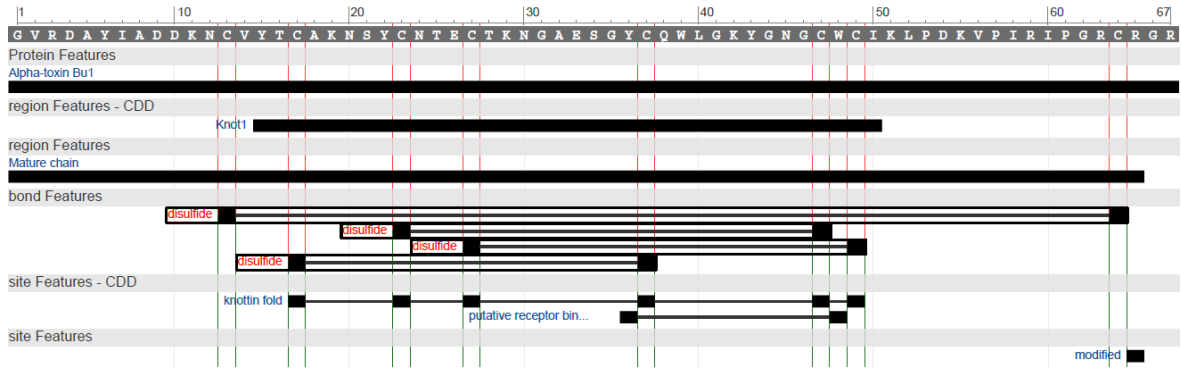
Adı: Alpha-toxin Bu1

Organizma:Buthacus macrocentrus (Turkish scorpion)

ID numarası:SCX1_BUTMA

Erişimnumarası:P0DJH8

Bu1 için NCBI'da yapılan ilk sorgulamada, kayıtlı benzer 100 peptid tespit edildi. Ardından UniProt kullanılarak da benzer peptidler tekrar tarandı (Şekil 5.14-15).

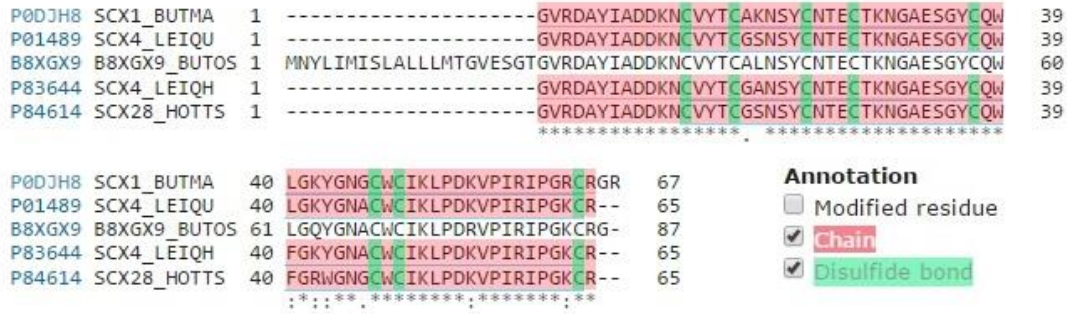


Şekil 5.14. NCBI taramasında bulunan Alpha-toxin BU1 grafiksel gösterimi

Query: B20141208945YVZ857D	Match	E-value	Score	Ident.
<input checked="" type="checkbox"/>	P0DJH8 SCX1_BUTMA - Alpha-toxin Bu1 - Buthacus macroce... - View alignment	6e-56	418	100.0%
<input checked="" type="checkbox"/>	P01489 SCX4_LEIQU - Alpha-toxin Lqq4 - Leiurus quinques... - View alignment	2e-50	385	94.0%
<input checked="" type="checkbox"/>	B8XGX9 B8XGX9_BUTOS - Putative alpha toxin Tx2 - Buthus occitanus... - View alignment	2e-50	387	92.0%
<input checked="" type="checkbox"/>	P83644 SCX4_LEIQH - Toxin Lqh4 - Leiurus quinques... - View alignment	7e-50	381	92.0%
<input checked="" type="checkbox"/>	P84614 SCX28_HOTTS - Alpha-toxin Bs-Tx28 - Hottentotta tamu... - View alignment	2e-49	379	91.0%

Şekil 5.15. UniProt blast taramasında bulunan benzer ilk beş peptid ve benzerlik değerleri

Bu peptidlerden benzer ilk beş peptidle ClustalW2 sunucusu üzerinden çoklu dizi eşlemesi yapılarak aralarındaki benzerliklere bakıldı (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. Benzer beş amino asit dizilimi ile yapılan dizi eşlemesi

Yapılan bu taramalarda kendisiyle aynı familyadan olan *A. crassicauda*'dan saflaştırılan Acra3 peptidinde olduğu gibi, *B. macrocentrus*'tan saflaştırılan Bu1 saf peptidinin içinde de 8 sistin rezidüsü ve onların arasında oluşan 4 tane disülfid bağı mevcuttur ve toplam 65 amino asit rezidüsüne sahiptir.

5.6. Acra3 ve Bu1 İçin Homolojik Modelleme

Çoklu dizi eşleme işlemi yapılarak protein sekansları arasındaki benzerlik görüldükten sonra, Acra3 ve Bu1 peptidinin ikincil yapısının tahmini için ExpASY Bioinformatic Resource Portal'ı içindeki SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>) protein modelleme sunucusu üzerinden çalışmaları yapıldı.

Öncelikle modellemenin yapılabilmesi için şablon bir yapı tayin edilmesi gereklidir. Bu yüzden SWISS-MODEL içerisindeki şablon belirleme (template identification) işlemi Acra3 ve Bu1 peptidlerine uygulandı. Acra3 için proje adı ACRA3_66aa olmak üzere, sistem modelleme için 19 tane şablon yapı belirlendi. Bu1 içinde HH Search şablon kütüphanesinden 19 yapı, Gapped blast veri tabanından 26 şablon yapı belirlendi. Bu şablon yapılar skorlarına bağlı uyumluluklarına göre sıralandı (Şekil 5.17-19).

Workunit: P000012 ACRA3_66aa

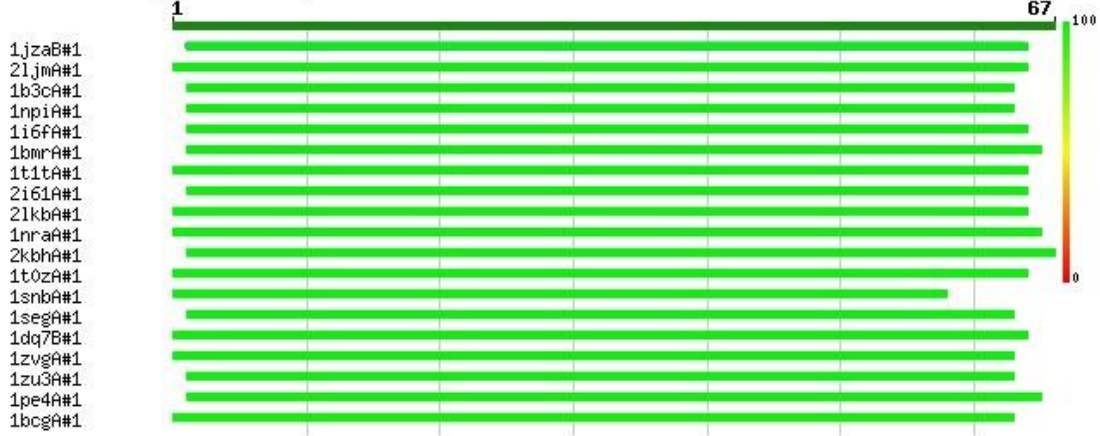
InterproScan



Gapped Blast



HHSearch Template Library Search



Şekil 5.17. Acra3 için Swiss-Model'de yapılan şablon taraması sonucu bulunan benzerlik yüzdelerine göre sıralanmış 19 yapı

HHSearch template library search: [+/-]

Query TARGET
Match_columns 67
No_of_seqs 102 out of 117
Neff 4.0
Searched_HMMs 30501
Date Fri Nov 14 22:20:21 2014

No Hit	Prob	E-value	P-value	Score	SS	Cols	Query HMM	Template HMM
1 ExpDB 1jzaB 2.2	100.0	3.3E-32	1.1E-36	185.5	6.6	64	2-65	1-66 (66)
2 ExpDB 2ljmA 99	100.0	2.3E-31	7.4E-36	181.2	7.0	65	1-65	16-82 (82)
3 ExpDB 1b3cA 99	100.0	1.1E-30	3.7E-35	177.6	6.4	62	2-64	1-64 (64)
4 ExpDB 1npiA 1.16	100.0	2.8E-30	9E-35	175.6	7.0	61	2-64	1-61 (61)
5 ExpDB 1i6fA 99	100.0	4.7E-29	1.5E-33	169.3	6.1	60	2-65	1-60 (60)
6 ExpDB 1bmrA 99	99.9	3.5E-25	1.1E-29	149.4	6.5	61	2-66	2-67 (67)
7 ExpDB 1t1tA 99	99.9	2.2E-24	7.3E-29	145.2	6.3	60	1-65	1-62 (62)
8 ExpDB 2i61A 1.2	99.9	3E-24	9.9E-29	144.6	5.6	60	2-65	1-62 (62)
9 ExpDB 2lkbA 99.9	99.9	6.2E-24	2E-28	143.0	6.4	61	1-65	1-66 (66)
10 ExpDB 1nraA 99	99.9	1.1E-23	3.6E-28	141.7	6.2	60	1-66	1-62 (63)
11 ExpDB 2kbhA 99.9	99.9	1.4E-23	4.7E-28	141.1	6.2	60	2-67	2-66 (66)
12 ExpDB 1t0zA 2.6	99.9	1.6E-23	5.3E-28	140.8	5.2	61	1-65	1-65 (72)
13 ExpDB 1snbA 1.9	99.9	3.3E-23	1.1E-27	139.2	5.7	55	1-59	1-60 (64)
14 ExpDB 1segA 1.3	99.9	5.1E-23	1.7E-27	138.2	5.8	57	2-64	2-63 (64)
15 ExpDB 1dq7B 2.2	99.9	8.9E-23	2.9E-27	137.0	6.0	59	1-65	1-64 (64)
16 ExpDB 1zvgA 1.2	99.9	2.2E-22	7.3E-27	135.0	5.9	58	1-64	3-65 (66)
17 ExpDB 1zu3A 1.33	99.9	2.9E-22	9.7E-27	134.3	5.8	57	2-64	2-63 (64)
18 ExpDB 1pe4A 99	99.3	1E-12	3.3E-17	85.3	4.7	64	2-66	1-67 (67)
19 ExpDB 1bcgA 2.1	98.6	7.8E-09	2.5E-13	65.3	0.9	60	1-64	2-70 (74)

Şekil 5.18. Acra3 için Swiss-Model'de bulunan 19 şablon yapının benzerlik parametrelerinin değerleri

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
ExpDB 4hhfA 1.8	Crystal Structure of chemically synthesized sco...	106	4e-24	
ExpDB 1zvga 1.2	Crystal Structure Of Mutant K8DP9S Of Scorpion ...	96	8e-21	
ExpDB 1t7aA 1.5	Crystal structure of mutant Lys8Asp of scorpion...	96	8e-21	
ExpDB 1zutA 1.7	Crystal Structure Of Mutant K8DP9SR58K Of Scorp...	95	2e-20	
ExpDB 1t7bA 1.85	Crystal structure of mutant Lys8Gln of scorio...	94	3e-20	
ExpDB 1t7eA 1.4	Crystal structure of mutant Pro9Ser of scorpion...	94	4e-20	
ExpDB 1djtB 1.2	ATOMIC RESOLUTION STRUCTURE OF SCORPION ALPHA L...	94	5e-20	
ExpDB 1zveA 1.7	Crystal Structure Of Mutant K8G Of Scorpion alp...	94	5e-20	
ExpDB 1zu3A 1.33	Crystal Structure Of Mutant K8A Of Scorpion alp...	93	5e-20	
ExpDB 1zyvA 1.5	Crystal Structure Of Mutant K8DP9SR58KV59G Of S...	92	1e-19	
ExpDB 1chzA 1.76	A NEW NEUROTOXIN FROM BUTHUS MARTENSII KARSCHE	92	1e-19	
ExpDB 2atbB 1.6	Triple mutant 8D9D10V of scorpion toxin LQH alp...	92	2e-19	
ExpDB 1zywA 1.3	Crystal Structure Of Mutant K8DP9SR58KP60G Of S...	92	2e-19	
ExpDB 2y eoA 1.08	A39L MUTATION OF SCORPION TOXIN LQH ALPHA IT	90	6e-19	
ExpDB 2ascA 1.1	Scorpion toxin LQH alpha IT	87	3e-18	
ExpDB 1sn4A 1.3	STRUCTURE OF SCORPION NEUROTOXIN BMK M4	87	5e-18	
ExpDB 1lqqA 99.9	ANTI MAMMAL AND ANTI INSECT LQQIII SCORPION TO...	86	7e-18	
ExpDB 2kbaA 99.9	Solution Structure of BmK M10	86	1e-17	
ExpDB 2lkaA 99.9	Evolutionary diversification of Mesobuthus alp...	83	6e-17	
ExpDB 1kv0B 1.4	Cis trans Isomerization of Non prolyl Peptide B...	80	3e-16	
ExpDB 2kbaA 99.9	solution structure of BmKalphaTx11 major conf...	78	3e-15	
ExpDB 1segA 1.3	Crystal structure of a toxin chimera between Lq...	77	4e-15	
ExpDB 1omyA 2	Crystal Structure of a Recombinant alpha insect T...	75	2e-14	
ExpDB 1ahoA 0.96	THE AB INITIO STRUCTURE DETERMINATION AND REFI...	74	4e-14	
ExpDB 1snbA 1.9	STRUCTURE OF SCORPION NEUROTOXIN BMK M8	71	3e-13	
ExpDB 1dq7B 2.2	THREE DIMENSIONAL STRUCTURE OF A NEUROTOXIN FRO...	59	1e-09	

Şekil 5.19. Bu1 için Swiss-Model'de bulunan 19 şablon yapının benzerlik parametrelerinin değerleri

Swiss-Model sunucusunun bulduğu peptidler, kullanılan diğer sunucularda bulunan ve benzerlik yüzdesi uygun değerde olan birkaç yapıyı şablon olarak belirlememiştir. Bulunan şablon yapıların bir kısmı NMR, bir kısmı da X ışınları kristalografisi ile bulunan yapılardır. PDB-ID'lerinin yanında bulunan sayılar NMR veya kristalizasyon deneyleriyle bulunan yapının çözünürlüğünü gösterir.

Şablon yapı taramasına göre Acra3'e en yakın yapının, PDB-ID'si 1jza ve Chain-ID'si B olan yapı olduğu için otomatik modelleme yapıldığında şablon olarak 1jzaB'nin seçilmesi beklendi. Fakat otomatik modelleme yapıldığında, X ışınları kristalizasyonu ile bulunan 1jzaB değil, 1nraA NMR yapısının (Şekil 5.20) şablon yapı olarak belirlendiği görüldü.

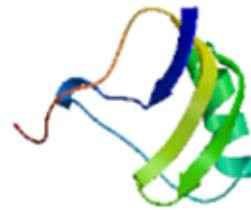
[\[Template\]\[Show Template Cluster 1nraA\]](#)

1nraA|99.9| Solution Structure of an Old World like Neurotoxin from the Venom of the New World Scorpion *Centruroides Sculpturatus* Ewing (Jablonsky, 1995)

[\[Display Alignment in DeepView\]](#)

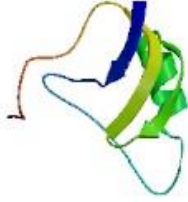
Probab=99.89 E-value=6.7e-24 Score=141.91 Aligned_columns=59 Identities=51%

```
Q gi|476007162|s 1 DRDGYPVHDGTNCKYSCDIREKWEYCTPLCKRRNAKTGYCYA--
Q Consensus 1 ~kdGY~v~~~~gCky~C~~~g~n~yC~~~Ck~~g~~~GYCy~~-
~aCwCegLpd~~~~w~ 58 (66)
-|++++|++|+|+ .|++++|++++|++++|++++|
+|++++|++++|+++ .
T Consensus 1 krDGYi~~~~nC~y~C----
n~yCn~~Ck~~ga~sGYC~~~g~ACwC~~LPd~vpi-k 55 (63)
T ExpDB|1nraA|99 1 KKDGYPV-DSGNCKYECL--
DDYCNDLCLERKADKGYCYWGKVCYCYGLP DNSPT-K 55 (63)
Q gi|476007162|s 59 DDGIFCK 65 (66)
Q Consensus 59 ~~~~~C~ 65 (66)
.++ +|+
T Consensus 56 ~~g-kC~ 61 (63)
T ExpDB|1nraA|99 56 TSG-KCN 61 (63)
```



Şekil 5.20. 1nraA peptidinin aminoasit dizilimi

Sunucu tarafından seçilen şablon yapı 1Nra, *Centruroides Sculpturatus* Ewing akrepinden elde edilen bir peptidtir ve amino asit sayısı 63, sekans benzerlik değeri %51'dir. 1nraA ile yapılan modellemeye bulunan üç boyutlu ikincil yapı Şekil 5.21'de verilmiştir.

Model Summary ?**Model information:**

Modelled residue range: 1 to 66
 Based on template: [1nraA]* (99.9 Å)
 Sequence Identity [%]: 44.12
 E-value: 1.10e-23

Quality information: [details]*
 QMEAN Z-Score: -1.17

**Quaternary structure information:**

Template (1nra): MONOMER
 Model built: SINGLE CHAIN

Ligand information:

Ligands in the template: none.
 Ligands in the model: none.

Şekil 5.21. Acra3'ün 1nraA şablon yapı ile modellemesinden oluşan ikincil yapının bilgileri

Şekil 5.21'deki oluşturulan modelde dizi benzerliği %44.12 ve benzerliğin başka bir ölçüsü olan Z skor mutlak değeri 1.17 çıktı. Oluşan modelde 3 tane beta tabakası ve 1 tane alfa helis yapısı olduğu görüldü [49].

Benzerlik değeri daha yüksek olabilecek bir model oluşturabilmek için, diğer 18 şablon yapı arasından otomatik modellemede seçilen şablon yapının özelliklerine en yakın olan peptide bakıldı ve bu peptidin 61 amino asiti olan, PDB kodu 1i6fA peptid olduğu bulundu. Şekil 5.22'de bu şablon yapının amino asit dizilimi verilmiştir.

[Template] [Show Template Cluster 1i6fA]

1i6fA|99.9| NMR SOLUTION STRUCTURE OF THE INSECT SPECIFIC NEUROTOXIN
 VARIANT 5 CSE V5 FROM THE SCORPION CENTRUROIDES SCULPTURATUS EWING

[Display Alignment in DeepView]

Probab=99.95 E-value=4.7e-29 Score=169.29 Aligned_columns=60 Identities=45%

Q TARGET	2	RDGYPVHDGTNCKYSCDIREKWEYCTPLCKRRNAKTGYCYAFACWCIGLPDEVKVVYGDG	61 (67)
Q Consensus	2	kdGY~v~gCky~C~g~n~yC~Ck~g~GVCy~aCwCe~Lpd~v~w~	61 (67)
		+++ +++ ++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++	
T Consensus	1	kdGYi~gCky~C~---n~yC~Ck~g~GVC~aCwC~gLPd~v~i~w~	56 (60)
T ExPDB 1i6fA 99	1	KDGYPV-DSKGCKLSCVA---NNYCDNQCKMKKASGGHCYAMSCYCEGLPENAKVSDSAT	56 (60)

Q TARGET	62	IFCK	65 (67)
Q Consensus	62	~C~	65 (67)
		+ .	
T Consensus	57	n~CG	60 (60)
T ExPDB 1i6fA 99	57	NICG	60 (60)

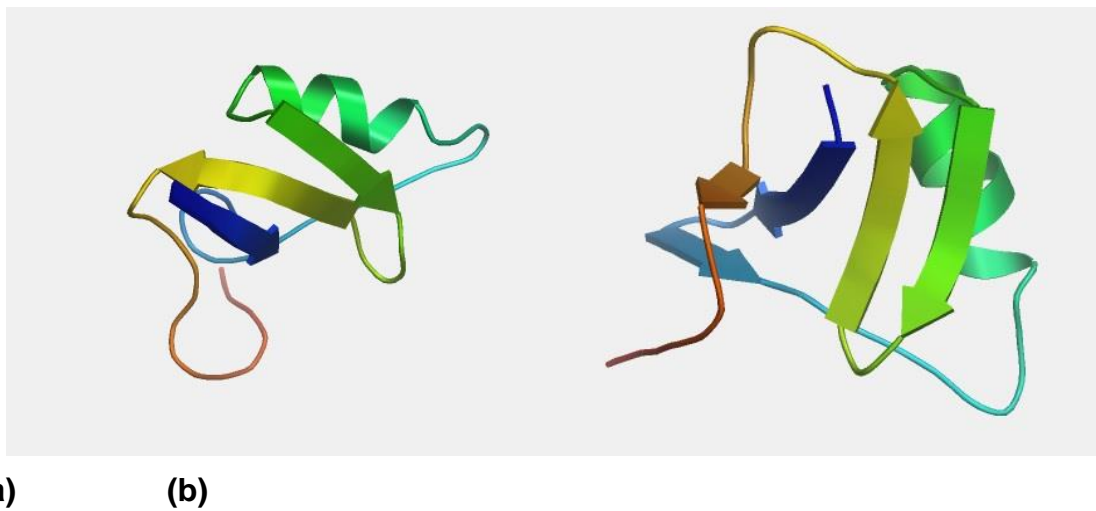
Şekil 5.22. 1i6fA peptidinin aminoasit dizilimi

1i6fA şablon yapısı da 1nraA gibi NMR yapısıdır veyine Scorpion Centruroides Sculpturatus Ewing'dan elde edilen nörotoksin yapıdır. Bu benzerlikte olan diğerpeptidlere göre benzerlik oranı %45 ile en iyi değerde olduğu için modellemespesifik olarak 1i6fA ile tekrar yapıldı (Şekil 5.23).



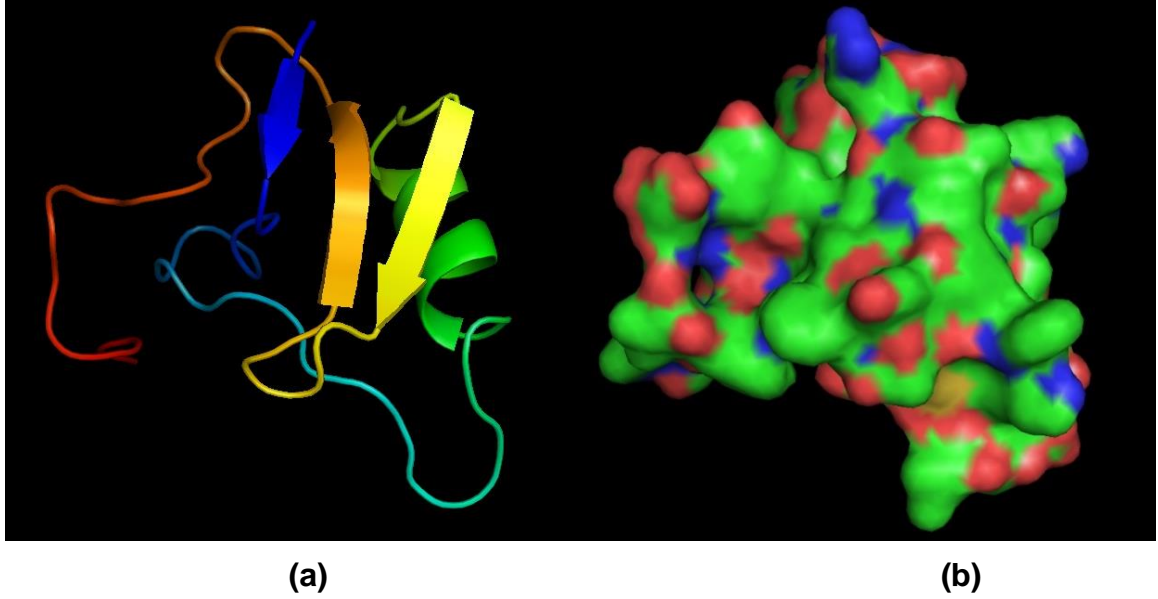
Şekil 5.23. Acra3'ün 1i6fA şablon yapı ile modellemesinden oluşan ikincil yapının bilgileri

Şekil 5.23'te görülen yeni model yapıda dizi benzerliği %42.19, Z skor mutlak değeri ile E değeri diğer modele göre daha yüksek ve sırasıyla, 1.46 ve 4.70×10^{-29} 'dur. 1i6fA ile yapılan modellemede 1nraA'dan farklı olarak 5 tane beta tabakası vardır. Şekil 5.24'te iki farklı model yapının alfa helis ve beta tabakalarını içeren ikincil yapıları ayrıntılı olarak gösterildi [49].



Şekil 5.24. a) 1nraA ile yapılan modelleme, b) 1i6fA ile yapılan modelleme

Yapılan modellemeler içinde en iyi sonuç 1nraA şablon peptidi ile elde edilen modeldi. Model yapının pdb uzantılı dosyası PyMOL programında [50] kullanılarak tekrar Acra3'ün üç boyutlu yapısına ulaşıldı (Şekil 5.25).



Şekil 5.25. Acra3 molekülünün homolojik modelleme ile elde edilen üç boyutlu yapısı **a)** alfa sarmalı ve beta tabakaları, **b)** moleküleryüzeyde elektronik yük dağılım gösterimi

Homolojik modelleme ile Acra3'ün üç boyutlu yapısı çıkarıldığında, yapısında bir α -sarmalı ile üç tane anti-paralel β tabakası ve uzun döngüler bulundu. Modellemede kullanılacak şablon yapının bulunabilmesi için yapılan çoklu dizi eşlemelerinde, Acra3 aminoasit sekansındaki 8 sistin rezidüsünden dolayı yapısında 4 disülfid bağı olduğu saptandı. Şekil 5.8'e tekrar bakıldığında, NCBI üzerinden yapılan BLAST taramalarında bu disülfid bağlarının, Cys 30-81, Cys 34-57, Cys 43-62 ve Cys 47-54 arasında oluştuğu görüldü.

Bu1 peptidi için yapılan otomatik modelleme de ise program, Şekil 5.19'da bulunan şablon yapılardan 106 skor değeriyle benzerliği en yakın ve ID numarası 4hhfA olan peptidle modelleme yaptı (Şekil 5.26).

```
>[Template]|4hhfA|1.8| Crystal Structure of chemically synthesized  
scorpion alpha toxin OD1  
Length = 65
```

```
Score = 106 bits (265), Expect = 4e-24, Method: Composition-based stats.  
Identities = 58/65 (89%), Positives = 62/65 (95%)
```

```
Query: 1 GVRDAYIADDKNCVYTCAKNSYCNTTECTKNGAESGYCQWLKGYGNGCWCICKLPDKVPIRI 60  
GVRDAYIADDKNCVYTCA N YCNTTECTKNGAESGYCQW+G+YGN CWCICKLPD+VPIRI  
Sbjct: 1 GVRDAYIADDKNCVYTCASNGYCNTTECTKNGAESGYCQWIGRYGNACWCICKLPDEVPIRI 60
```

```
Query: 61 PGRCR 65  
PG+CR  
Sbjct: 61 PGKCR 65
```

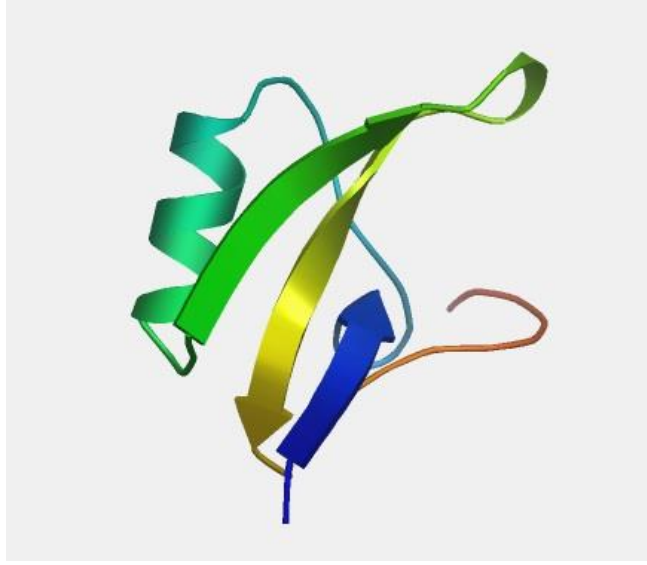
Şekil 5.26. 4hhfA peptidinin aminoasit dizilimi

4hhfA şablon yapısı (Crystal Structure of chemically synthesized scorpion alpha toxin OD1), çözünürlüğü 1.8 olan kristal yapı çözümünden bulunmuş bir yapıdır. Bu şablonla yapılan modelleme Şekil 5.27'de verilmiştir.



Şekil 5.27. Bu1'in 4hhfA şablon yapı ile modellemesinden oluşan ikincil yapının bilgileri

Uygun şablon yapılar spesifik olarak seçilip modelleme yapıldığında en uygun sonuç 4hhfA şablon yapısı ile modellemeden elde edilen sonuç oldu. Bu sonuca göre dizi benzerliği %89,23 ve Z skor değeri 0,69 çıktı. Bu model yapı Şekil 5.28'de gösterilmiştir.



Şekil 5.28. 4hhfA ile yapılan modelleme

Tıpkı *A. crassicauda* gibi Buthidae familyasından olan *B. Macrocentrus*'dan izole edilen Bu1 için bulunan tahmini yapı da Acra3 yapısına benzemektedir. Yapısında bir alfa helis ve üç tane anti paralel beta tabakası vardır. Bu yapının oluşmasında rol oynayan amino asit dizilimine bakıldığında, Cys 13-64, Cys 17-37, Cys 23-47 ve Cys 27-49 rezidüleri arasında disülfid bağları olduğu görüldü [49].

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yaygın olarak görülen ve etnomedikal ve toksikolojik öneme sahip *A. crassicauda* ve *Buthacus macrocentrus* cinsi akrep venomlarının incelendiği bu tezde, öncelikle *A. crassicauda*'dan saflaştırılan Acra3 peptidinin tek kristal formunun elde edilmesi ve X-ışınları difraksiyonu yöntemiyle kristal yapısının aydınlatılması amaçlanmıştır. Fakat yapılan kristalizasyon çalışmalarında Acra3'ün tek kristal yapısı elde edilemediği için atomik ölçekte üç boyutlu yapı analizi yapılamamıştır. Bu nedenle nano boyutta yapı analizi için, makromoleküllerin sıvı çözeltilerinin incelenmesine olanak sağlayan SAXS yöntemi kullanılmıştır. Aynı zamanda homolojik modellemeyle de, Acra3'ün tahmini ikincil yapısı elde edilmiştir. Tezin bu kısmında *A. crassicauda* ile aynı familyadan olan *Buthacus macrocentrus* türü akrepten saflaştırılan Bu1 peptidi de modellenmiştir.

Tez kapsamında çalışılan iki peptid de Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Venom Araştırma Laboratuvarı'nda saflaştırıldı. Acra3 peptidinin saflaştırma çalışmalarında bulunduğu için, çalışmanın tüm süreçleri sadece Acra3 için anlatılmıştır. Fakat Bu1 peptidi de aynı süreçlerden geçirilerek saflaştırılmıştır. Elektrostimülasyon yöntemiyle akreplerden alınan venomlar, HPCL sisteminde ters fazda yürütülerek saf peptidler elde edilmiştir. *A. crassicauda*'dan saflaştırılan Acra3 peptidi, kristalizasyon çalışmalarını başlatmak için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'nden, Hacettepe Üniversitesi X-ışınları Laboratuvarı'na, farklı zamanlarda ve miktarlarda gönderilmiştir. HPLC sistemindeki farklı yürütmelerin toplamında elde edilen yaklaşık 1mg Acra3 peptidi ile, Imperial College, Biyomoleküler Tıp Bölümü'nde ilk kristalizasyon çalışmaları yapılmıştır. Burada farklı iki konsantrasyonda (7,5 mg/ml ve 10,5 mg/ml) Acra3 çözeltisi hazırlanmıştır. 7,5 mg/ml konsantrasyondaki Acra3 için ICL 13 MORPHEUS ve ICL 14 PGA kristalizasyon tarama kiti robot teknolojisi ile yapılan deneylerde sitting drop yöntemi kullanılarak X-ışınları için uygun kristal yapılar elde edilmeye çalışıldı. Fakat sadece ICL 13 MORPHEUS kiti ile yapılan deneylerde çökeltme ve mikrokristal görünümlü yapılar oluştuğu için, ICL 14 PGA kiti ile 10mg/ml konsantrasyondaki Acra3 peptidi için deneyler tekrarlanmıştır. Fakat tüm deneylerde Acra3 için tek kristal oluşumu gözlenememiştir. Kristal yapıya bu deneylerle ulaşılamadığı için, az miktarda Acra3 Cardiff Üniversitesi'ne

gönderilmiş ve burada düşük konsantrasyonda (5mg/ml) sıvı Acra3 çözeltisine robot kristalizasyonu uygulanmış ve belli bir süre sonra mikroskopla kontrol edilen platelerde sadece tuz kristali gözlemlenmiştir. Sonuç olarak Acra3 peptidinin tek kristalleri elde edilemediği için üç boyutlu yapı analizi yapılamamıştır.

Kristal form elde edilemediğinden, Acra3'ün yapısı hakkında bilgi almamızı sağlayacak SAXS deneyleri ilk olarak Hacettepe Üniversitesi, X-Işınları Laboratuvarı'nda Hecus SWAXS sisteminde yapılmıştır. Distile su ile çözülerek dört farklı konsantrasyonda hazırlanan ve Acra3_228, 229, 230, 231 olarak adlandırılan Acra3 çözeltileri için Hecus SWAXS sisteminde ölçümler alınmıştır. Buradan alınan verilerle saçılma grafikleri çizdirilmiş, ve saçılma eğrilerinin Guinier bölgesinde analizi yapılarak jirasyon yarıçapları hesaplanmıştır. Bu sistemde yapılan deneylerde jirasyon yarıçapları beklenenden çok büyük çıkmıştır ve moleküllerin kümelenmesi tüm veri setini etkilediği için moleküler biçimi tanımlayacak uygun modeli bulmak mümkün olmamıştır. Bu nedenle Acra3 peptidi EMBL-P12 BioSAXS demet hattına gönderilmiş ve buradan gelen veriyle GNOM'da yapılan analiz sonucunda $R_G=34,3\text{\AA}$ olarak bulunmuştur. Fakat buradan elde edilen jirasyon yarıçapının da beklenenden büyük olması ve $q \cdot R_G$ limit değerinin 1.4'den fazla olması örnekte yine kümelenme olduğunu açıkça göstermektedir. Ancak, bu kez SAXS verisinin daha şiddetli olması, ve moleküler kümelenmenin daha az olması nedeniyle daha iyi fit işlemleri yapılabilmıştır ve daha uyumlu sonuçlar elde edilebilmiştir. Hesaplanan uzaklık dağılım fonksiyonumoleküler yapının basık küresel modele / elipsoide daha yakın olduğunu göstermiştir. DAMMIN programı ile elde edilen üç boyutlu ab initio modelde yine elipsoid forma uygundur. Böylece tek bir molekül yerine, kümelenmiş durumdaki birkaç molekülün üç boyutlu yapısı nano ölçekte başarıyla modellenmiştir.

Proteinlerin molekül ağırlıkları ile jirasyon yarıçapları arasında doğrusal bir ilişki olmamasına karşın, beklendiği gibi aminoasit sayısı, dolayısıyla moleküler ağırlık arttıkça çözeltideki proteinlerin jirasyon yarıçapları, doğrusal olmasa da yaklaşık olarak artmaktadır. Örneğin, **Ribonuclease** için $M_w=12,700$ Da, $R_g=1,48$ nm; **Lysozyme** için $M_w=14,800$ Da, $R_g=1,45$ nm ve **B-lactoglobulin** için $M_w=36,700$ Da, $R_g=2,17$ nm' dir.

Akrep venomlarından elde edilen peptidlerin SAXS çalışmasına literatürde rastlanmadığı için Acra3 ile doğrudan bir karşılaştırma yapılamamıştır. Ama sözü edilen diğer proteinlerden, örneğin Lysozyme neredeyse iki kat ağırlığa sahip olmasına karşın jirasyon yarıçapı 14,5 Å 'dur. Çözeltideki proteinlerin kümelenmesi ve parçacıklar arası etkileşmenin varlığı nedeniyle SAXS deneyinden Acra3 için jirasyon yarıçapı beklenenden büyük olarak $R_g=34,3$ Å bulunmuştur; peptidin 66 aminoasite sahip olduğu ve molekül ağırlığının 7620 Da olduğu biyokimyasal karakterizasyondan bilinmektedir.

SAXS deneylerinin sonuçları, kümelenmenin varlığının açık delilidir. Kümelenme önlenerek yeni deneyler yapılabilir ve tek bir peptid molekülünün nano ölçekte moleküler biçimi belirlenebilir. Deneysel çalışmalarımızın bir sonucu olarak eğer proteinlerin homojen çözeltilerinde ciddi kümelenme varsa bu örneklerin kolayca kristalleşmeye de yatkın olmadıklarını gösterdiğini söyleyebiliriz. Ayrıca, bizim Acra3 örneğimizde olduğu gibi, eğer protein ve peptidlerde sistin molekülleri varsa kristalizasyonlarının daha zor ve uğraştırıcı olduğu da literatürde belirtilmektedir [25].

Kristalleştirme ve sıvı çözeltide SAXS çalışmaları sürdürülürken, Acra3'ün üç boyutlu yapısının kuramsal olarak belirlenebilmesi amacıyla *biyoinformatik* yaklaşımlar kullanıldı ve Acra3'ün üç boyutlu tahmini yapısı elde edildi. Bu kesimde aynı zamanda Bu1 peptidi ile de çalışılmıştır. Önceden yapılan biyokimyasal karakterizasyonda Acra3'ün 66aa, Bu1'in 65 aa'ya sahip olduğu bilinmektedir. İki peptid içinde farklı sunucular üzerinden çoklu dizi eşlemesi yapıp, uygun şablon yapılar belirlenmiş ve birer model oluşturulmuştur. İki peptidin de ikincil yapısında 3 beta tabakası ve bir alfa sarmalı olduğu görülmüştür. Her iki peptidde aynı familyadan akreplerden saflaştırıldığı için yapılarının birbirine benzer çıkması doğaldır. Na⁺ kanala duyarlı akrep toksinlerinin, 60-76 amino asit rezidüsü uzunluğunda, dört disülfid köprüsü ile sıkı bağlı peptidler olduğu bilinmektedir.

Yapılan çalışmalarda en güvenilir sonucu verecek X-ışınları difraksiyon yöntemi, Acra3 için tek kristal form oluşmadığından uygulanamamış olsa da SAXS yöntemi kullanılarak, Acra3 için düşük çözünürlüklü bir model oluşturulmuş ve analizlerde bu modelin doğruluğunu desteklemiştir. Bu1 ve Acra3 için protein veri bankasında

şu an için kayıtlı yapılara benzetilerek yapılan homolojik modelleme, zaman içinde yeni şablon yapılarla tekrarlanarak daha iyi sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] S. Cestèle, “Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels” *Biochimie*, vol. 82, no. 9–10, pp. 883–892, Sep, **2000**.
- [2] K. M. Giangiacomo, Y. Ceralde, and T. J. Mullmann, “Molecular basis of alpha-KTx specificity” *Toxicon*, vol. 43, no. 8, pp. 877–86, Jun, **2004**.
- [3] X.-P. Zuo and Y.-H. Ji, “Molecular mechanism of scorpion neurotoxins acting on sodium channels: insight into their diverse selectivity” *Mol. Neurobiol.*, vol. 30, no. 3, pp. 265–78, Dec, **2004**.
- [4] K. M. Blumenthal and A. L. Seibert, “Voltage-gated sodium channel toxins: poisons, probes, and future promise” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 38, no. 2, pp. 215–38, Jan, **2003**.
- [5] K. G. Gazarian, T. Gazarian, R. Hernández, and L. D. Possani, “Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines” *Vaccine*, vol. 23, no. 26, pp. 3357–68, May, **2005**.
- [6] P. T. J. Tan, A. Veeramani, K. N. Srinivasan, S. Ranganathan, and V. Brusic, “SCORPION2: a database for structure-function analysis of scorpion toxins” *Toxicon*, vol. 47, no. 3, pp. 356–63, March, **2006**.
- [7] L. D. Possani, B. Becerril, M. Delepierre, and J. Tytgat, “Scorpion toxins specific for Na⁺-channels” *Eur. J. Biochem.*, vol. 264, no. 2, pp. 287–300, Sep, **1999**.
- [8] 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**.
- [9] 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, Jun, **2006**.
- [10] F. Caliskan, B. I. Garcia, F. I. V Coronas, R. Restano-Cassulini, F. Korkmaz, Y. Sahin, G. Corzo, and L. D. Possani, “Purification and cDNA cloning of a novel neurotoxic peptide (Acra3) from the scorpion *Androctonus crassicauda*, *Peptides*, vol. 37, no. 1, pp. 106-12, Sep, **2012**.
- [11] 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**.
- [12] F. Caliskan, V. Quintero-Hernandez, 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 March, **2012**.
- [13] N. E. Chayen and E. Saridakis, “Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal.”, *Nat. Methods*, vol. 5, no. 2, pp. 147–53, Feb, **2008**.
- [14] *Protein Safılaştırma ve Karakterizasyonu*, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, (ed: Telefoncu A.), İzmir, 1-3, **1996**.
- [15] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry, Volume 1*. Wiley, p.1392, 78-89, **1995**.
- [16] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principle of Instrumental Analysis*. Thomson Brooks/Cole, p. 1039, **2007**.
- [17] R. K. Scopes, *Protein Purification*. New York, NY: Springer New York, 100-103, **1982**.
- [18] P. Brown, *High Pressure Liquid Chromatography: Biochemical and Biomedical Application*. Elsevier Science, p. 214, 3, **2012**.
- [19] *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media, p. 413, **2004**.
- [20] A. Weston and P. R. Brown, *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices*. Academic Press, p. 280, **1997**.
- [21] <http://www.glsiences.com/c-product/hplc/lc-columns/inertsil-wp300-c18/> (Eylül, **2014**).
- [22] G. P. Espino-Solis, G. Estrada, T. Olamendi-Portugal, E. Villegas, F. Zamudio, S. Cestele, L. D. Possani, and G. Corzo, “ Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus*, *Toxicon*, vol 57, no. 5, pp. 739-46, Apr. **2011**.
- [23] <http://www.separations.us.tosohbioscience.com/Products/HPLCColumns/lonExchange/CationExchange/TSKgelSP-5PW.htm> (Eylül, **2014**).
- [24] G. Corzo, E. Diego-Garcia, H. Clement, S. Peigneur, G. Odell, J. Tytgat, L. D. Possani, and A. Alagon, “An insecticidal peptide from the therapsid *Brachypelma smithi* spider venom reveals common molecular features

among spider species from different genera, *Peptides*, vol. 29, no.11, pp. 1901-8, Nov. **2008**.

- [25] Bergfors, T., Editor. **Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips.**, International University Line, La Jolla, California, 300 pp., **1999**.
- [26] J. Drenth, *Principles of Protein X-Ray Crystallography*, vol. 0. Springer Science & Business Media, pp.348, 1-7, **2007**.
- [27] S. Khurshid, E. Saridakis, L. Govada, and N. E. Chayen, "Porous nucleating agents for protein crystallization.," *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 7, pp. 1621–33, Temmuz, **2014**.
- [28] <http://hamptonresearch.com/>, Crystal Growth Techniques, (Ağustos, **2014**).
- [29] <http://hamptonresearch.com/> (Mayıs, **2014**).
- [30] D. I. Svergun, M. H. J. Koch, P. A. Timmins, and R. P. May, *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*, Oxford University Press, pp. 358, **2013**.
- [31] R.-J. Roe, *Methods of X-ray and Neutron Scattering in Polymer Science*. Oxford University Press, p. 331, 155-167, **2000**.
- [32] S. Doniach and R. Das, "Structural Studies of Proteins and Nucleic Acids in Solutions Using Small Angle X-Ray Scattering (SAXS), in *Structural Studies of Proteins and Nucleic Acids in Solution Using Small Angle X-ray Scattering*, p.26, **2008**.
- [33] C. D. Putnam, M. Hammel, G. L. Hura, and J. a Tainer, "X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution", *Q. Rev. Biophys*, vol. 40, no. 3, pp. 191-285, Aug **2007**.
- [34] <http://www.bioisis.net/tutorial/4> (Eylül, **2014**).
- [35] D. I. Svergun, *Structure Analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering*, Plenum Pres, New York, p.333, **1987**.
- [36] Haydyn D. T. Mertens and D. I. Svergun, "Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering", *J. Struct. Biol.*, vol. 172, no. 1, pp. 128-41, Oct. **2010**.
- [37] Svergun D.I., Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495-

503, **1992**.

- [38] <http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/sample.html> (Aralık, **2014**).
- [39] <http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/p12/> (Aralık, **2014**).
- [40] P.V.Konarev, V.V.Volkov, A.V.Sokolova, M.H.J.Koch and D. I. Svergun PRIMUS - a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst.* 36, 1277-1282., **2003**.
- [41] D. I. Svergun Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J.* 2879-2886, **1999**.
- [42] Atalay, R.Ç. "Neden Biyoinformatik , Avrasya Dosyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri" Cilt: 8, Sayı: 3, s. 129-141., **2002**.
- [43] Al Karadaghi, S. <http://www.proteinstructures.com/index.html> (Aralık, **2014**).
- [44] C.-I. Brändén and J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*. Garland Pub., p.410, **1999**.
- [45] E. Buxbaum, *Fundamentals of Protein Structure and Function*. Springer Science & Business Media, p.378, **2007**.
- [46] ACD/**ChemSketch**, version 11.02, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, **2008**.
- [47] Protein Analitiği, ed: Azmi Telefoncu, Ali Kılınç, "Proteinin Üç Boyutlu Yapısını Bulmak İçin İşlemsel Yöntemler", Uğur Sezerman, p.285, İzmir, **2009**.
- [48] <http://www.deu.edu.tr/UploadedFiles/Birimler/16928/Proteinlerin%20Yap%C4%B1sal%20Organizasyonu.pdf> (Aralık, **2014**).
- [49] Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22,195-201., **2006**.
- [50] DeLano, W.L., The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>, **2002**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Ad Soyad : Damla Koçak

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Bekar

E-posta : dkocak@hacettepe.edu.tr

Adresi : Atatürk Sit. Hayri Çeçen Sok. Oral 82 Apt. 31/56 Oran/Ankara

Eğitim

Lise : Cumhuriyet Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi

Yabancı Dil Düzeyi: IELTS sınavından Mayıs 2013'te 9 üzerinden 6 aldım.

İş Deneyimi: Kasım 2013'ten beri Hacettepe Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışıyorum.

Deneyim Alanları: X-ışınları kullanılarak uygulanan analiz yöntemleri.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi:

Tübitak 1001 Araştırma Projesi, Proje No: 110T865

Nörotoksik Peptid Acra3 Proteininin *Androctonus Crassicauda* (Türk Siyah Akrebi) Akrep Zehirinden Saflaştırılması, Kristalleştirilmesi ve Kristal Yapısının Aydınlatılması

Tezden Üretilmiş Yayınlar: Tez çalışmasından henüz bir yayın yapılmamıştır.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:

17-19 Mayıs 2014, 4. Ulusal Kristalografi Toplantısı, Diyarbakır, Poster Sunumu

28 Ağustos - 6 Eylül 2014, First European Crystallography School, İtalya, Poster Sunumu