

Calchas nordmanni Venomunda Bulunan Peptidlerin Antibakteriyal Aktivitesinin Araştırılması

Ayşegöl Kamaoğlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

şubat 2014

The Research about the Antibacterial Activity of Peptides Situated in Venom of *Calchas nordmanni*

Ayşegül Kamaoğlu

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

February 2014

Calchas nordmanni Venomunda Bulunan Peptidlerin Antibakteriyal Aktivitesinin
Araştırılması

Ayşegül Kamaoğlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Figen Çalışkan

[Bu Tez TÜBİTAK tarafından “212T254” no’lu proje çerçevesinde desteklenmiştir]

şubat 2014

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ayşegül Kamaoğlu'nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Calchas nordmanni Venomunda Bulunan Peptidlerin Antibakteriyal Aktivitesinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Figen Çalışkan

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Figen Çalışkan

Üye : Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emel Ergene

Üye : Doç. Dr. Nalan Yılmaz Sarıözlü

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

Prof. Dr. Nimetullah Burnak
Enstitü Müdürü

ÖZET

Calchas nordmanni yakın zamana kadar Artvin-Erzurum çevresinde endemik olduğu sanılan fakat son zamanlardaki çalışmalarla Türkiye'nin bir çok bölgesinde ve bazı Yunan adalarında bulunduğu ortaya çıkan Iuridae familyasına ait bir akrep türüdür. Günümüzde antibiyotiklere direnç kazanan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların önemli halk sağlığı problemlerinden birisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışma; akrep venomunun antibakteriyal etkinliğinin belirlenmesi üzerine odaklanmıştır.

Bu amaçla, seçilen klinik önemi olan bakterilere karşı ham venomun antibakteriyal etkinliği belirlenmiştir. Ardından; yüksek performans sıvı kromatografisinde fraksiyonlanmıştır. Bu fraksiyonların Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis ve Micrococcus luteus bakterileri üzerinde agar difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyal aktiviteleri araştırılmıştır. En geniş inhibisyon zonuna sahip olan Bacillus cereus'a ait çalışmalar bir adım daha ileri taşınmış ve yüksek performans sıvı kromatografisinde yeniden fraksiyonlanarak etkin peptid/peptidler bulunmaya çalışılmıştır. Aktivitesi belirlenen pikler arasında en geniş inhibisyon zonuna sahip olan 21.3 dakika alıkonma süreli fraksiyon olmuştur. Bu fraksiyon Trici-Tricine jel elektroforezinde yürütülmüş ve molekül ağırlığının 3,4 kDa ile 6,2 kDa arasında olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma, Calchas nordmanni venomunun elektroforetik profilini ve seçilen bakterilere karşı antibakteriyal etkili bileşenlerin varlığını ilk kez bildirmektedir. Elde edilen sonuçların yeni antibiyotiklerin tasarımında yardımcı olması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Calchas nordmanni, akrep, venom, antibakteriyal aktivite.

SUMMARY

Calchas nordmanni that was thought to be endemic to Artvin-Erzurum region till recent studies claimed that it also exists in lots of regions in Turkey and some Greek Islands, is a species of scorpion from Iuridae family. Nowadays, it is known that infections, which are caused by antibiotic resistant bacteria, are one of the serious public health problems. Because the new antibacterial molecules to control these bacteria are required all over the world, this study is focused to define the antibacterial activity of scorpion's venom.

For this purpose, crude venom's antibacterial activity against clinically important bacteria was determined. Then they were separated to one minute fractions by high performance liquid chromatography. The antibacterial activities of these fractions on *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* bacteria were determined by using agar diffusion method. The studies on *Bacillus cereus*, that has the widest inhibition zone, were researched one step more and they were studied to find the active peptides peak by peak fractionation on high performance liquid chromatography. The fraction which has 21.3 minutes retention time, was the peak, that has the widest inhibition zone, between the peaks which activities have been determined. This fraction was analyzed by Tris-Tricine gel electrophoresis and its molecular weights determined between 3.4 and 6.2 kDa.

This study declares the electrophoretic profile of *Calchas nordmanni*'s venom and the presence of antibacterial active components against to chosen bacterias, to the world literatures for the first time.

Keywords: *Calchas nordmanni*, scorpion, venom, antibacterial activity.

TEŞEKKÜR

Bilgisi ve tecrübesiyle çalışmalarına yön veren ve bu tezi hazırlamamda danışmanlığımı yapan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN'a teşekkür ederim.

212 T 254 no'lu proje ile çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a; bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, laboratuvarının tüm olanaklarını benden esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a; ESOGÜ Venom Araştırma Laboratuvarı'nda beraber çalışma fırsatı bulduğum, tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşlarım Uzman Biyolog Neslihan ATLIAKIN ve Uzman Biyolog Didem DAYIOĞLU'na; bana yeni ufuklar açan ve imkanlar sağlayan sevgili arkadaşım Uzman Biyolog Arzu İŞCAN'a; tez yazım çalışmalarım sırasında emeği geçen ve zor anlarımda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Biyolog Alim KARA'ya, Biyolog Mine GÜRCAN'a, Berna YILMAZ'a ve Yiğit LAFCI'ya; arazi çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili kuzenim Fatih KAMAOĞLU'na; akreplerin toplanması sırasında öncülüğümüzü yapan ve bize yol gösteren hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan ÇALIŞKAN'a; ESOGÜ Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yaptığım çalışmalar sırasında desteğiyle deneylerimi tamamlamamda katkısı olan Uzman Biyolog Meltem ÇELİKDEMİR'e; attığım her adımda, aldığım her kararda arkamda duran, tüm sabır, özveri ve sevgileriyle yoluma ışık olan canım annem Fevkiye KAMAOĞLU, canım babam Sebahattin KAMAOĞLU ve canım ablam Zeynep KAMAOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Akrelerin Genel Özellikleri	4
2.2 Akrelerin Sistematikteki Yerleri	6
2.3 Akrelerin Biyolojileri	8
2.4 Akrep Venomunun Özellikleri	10
2.5 Akrep Toksinlerinin Sınıflandırılması	11
2.5.1 Sodyum kanalına etkili akrep toksinleri (NaScTxS)	12
2.5.2 Potasyum kanalına etkili akrep toksinleri (KTxS)	13
2.5.3 Klor kanalına etkili akrep toksinleri	13
2.5.4 Kalsiyum kanalına etkili akrep toksinleri	14
2.6 Akrep Venomlarından Saflaştırılan Peptidlerin Farmakolojik Etkileri	14
3. ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLER	16
3.1 Antimikrobiyal Peptidlerin ve Etki Mekanizmaları	16
3.2 Antimikrobiyal Peptidlerin Kimyasal ve Yapısal Özellikleri	17
3.3 Akrep Venomlarından ve Hemolenfinden İzole Edilen Antibakteriyal Peptidler	18
4. MATERYAL VE YÖNTEM	20
4.1 Materyal	20
4.1.1 Akrelerin toplanması ve bakımı	20
4.1.2 Kullanılan kimyasallar	20
4.1.3 Kullanılan çözeltiler	21
4.1.4 Kullanılan cihazlar	23

İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2 Yöntem	25
4.2.1 Ham venomun elde edilmesi	25
4.2.2 Venom protein miktarının belirlenmesi	25
4.2.3 Ham venomun HPLC’de saflaştırılması ve peptidlerin eldesi	26
4.2.4 SDS-PAGE çalışmaları	26
4.2.4.1 <u>Molekül ağırlıkları 6,5-205 kDa arasındaki peptidler için SDS-PAGE</u>	27
4.2.4.2 <u>Molekül ağırlıkları 26 kDa’dan küçük peptidler için SDS-PAGE</u>	27
4.2.5 Antibakteriyal aktivite deneyleri	28
4.2.5.1 <u>Agar difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi</u> ..	28
5. SONUÇLAR	30
5.1 Arazi Çalışmaları ve Akrelerin Toplanma Sonuçları	30
5.2 Ham Venomun Elde Edilmesi ve Sonuçlar	31
5.3 Ham Venomun Agar Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Antibakteriyal Etkinliğinin Araştırılması ve Sonuçları	31
5.4 Ham Venomun HPLC’de Saflaştırılması ve Agar Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Belirlenen Antibakteriyal Aktivite Sonuçları	33
5.5 Ham Venomun ve Antibakteriyal Peptidin SDS-PAGE’de Molekül Ağırlığının Belirlenmesi ve Sonuçları ..	42
6. TARTIŞMA	44
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Akrelerin vücut kısımları (Yağmur, 2011).....	4
2.2 Ultraviyole ışık altında <i>Calchas nordmanni</i> görüntüsü.....	5
2.3 Doğum yapan akrebin yavrularını sırtına alış davranışı (Lourenço, 2000).....	8
5.1 Akrelerin toplandığı bahçe duvarının görüntüsü (Esiroğlu/Trabzon).....	27
5.2 Binoküler mikroskobunda görüntülenen inhibisyon zonları, a) <i>B. cereus</i> , b) <i>P. aeruginosa</i> , c) <i>B. subtilis</i> , d) <i>M. luteus</i> , e) <i>P. vulgaris</i>	29
5.3 <i>C. nordmanni</i> ham venomuna ait 1'er dakika aralıklarla fraksiyonlanan yürüyüşün 230 nm'deki kromatogramı (0-60 %B).....	30
5.4 <i>B. cereus</i> NRRL B-3711 üzerinde etkili dakika fraksiyonlarının (df) binoküler mikroskobunda görüntülenen inhibisyon zonları, a) 4.df , b) 7.df, c) 12.df, d) 17.df, e) 21.df, f) 24.df, g) 25.df, h) 34. df, i) 37. df, j) 39. df, k) 46. df, l) 51. df, m) 52. df, n) 55. df, o) 56. df, p) 57. df, r) 58. df.	32
5.5 <i>P. vulgaris</i> NRLL B- üzerinde etkili dakika fraksiyonlarının (df) binoküler mikroskobunda görüntülenen inhibisyon zonları, a) 8. df, b) 11. df, c) 12. df, d) 14. df, e) 16. df, f) 19. df, g) 20. df, h) 21. df, i) 23. df, j) 24. df, k) 25. df, l) 27. df, m) 28. df, n) 29. df, o) 31. df, p) 32. df, r) 36. df, s) 39. df, t) 41. df, u) 48. df, v) 54. df.....	34
5.6 <i>B. cereus</i> üzerinde farklı alıkonma sürelerine sahip peptidlerin meydana getirdiği inhibisyon zonlarının binoküler görüntüleri, a) 20.8. dakika, b) 21.3. dakika, c) 32.9. dakika, d) 33.2. dakika, e) 51.8. dakika.....	36
5.7 <i>C. nordmanni</i> ham venomunun(2) ve molekül ağırlık markırının (1) SDS-PAGE jel görüntüsü.....	37

- 5.8 C. nordmanni ham venomunun HPLC ayırımı sonrasında, 21.3 dakika alıkonma süreli peptidinin (2) ve molekül ağırlığı markırının (1) Trice-Tricine jel görüntüsü.....38

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.1 Antibakteriyal aktivite gösteren bakteriler ve inhibisyon zonu çapları.....	29
5.2 B. cereus NRRL B-3711 üzerinde antibakteriyal etki gösteren dakika fraksiyonları ve ortalama inhibisyon zonu çapları.....	31
5.3 P. vulgaris NRLL B-123 üzerinde antibakteriyal etki gösteren dakika fraksiyonları ve ortalama inhibisyon zonu çapları.....	33
5.4 HPLC’de alıkonma sürelerine göre toplanan pikler ve protein miktarları.....	35
5.5 B.cereus üzerinde antibakteriyal etkinliği belirlenen piklerin alıkonma süreleri ve ortalama inhibasyon zonu çapları.....	36

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Akrepler eklem bacaklılar arasında yer alan ve venomları (zootoksin) çok sayıda biyoaktif bileşen içeren canlı grubudur. Soğukkanlı hayvanlar arasında en düşük metabolik hıza sahiptirler. Böylece en zor ortamlarda hayatta kalabilirler ve çok uzun süre açlığa dayanabilirler. Ilık ve nemli yerlerde yaşamayı severler. Ekvatora yaklaştıkça vücut büyüklükleri ve tür çeşitlilikleri artar (Özkan ve Karaer, 2007).

Akrep venomları kompleks bir karışımdan oluşmaktadır. Bu sıvı karışım; mukus, inorganik tuzlar, düşük molekül ağırlıklı organik moleküller, enzimler, nükleotidler, aminler ve nörotoksik peptidler olarak adlandırılan birçok küçük proteinleri içermektedir. Bunların yanı sıra serotonin ve enzim inhibitörleride akrep venomlarında bulunmaktadır (Bosmans and Tytgat, 2007; Plessis, et al., 2008). Akrep venom çalışmaları özellikle insanlar için tehlikeli olan türler üzerine odaklanmasına rağmen günümüzde hala literatürlerde venom bileşenleri hakkında bilgisi olmayan türler %98'den daha fazla orandadır. Bilinen akrep türlerinin çeşitliliğine karşın günümüzde ancak 50 akrep türü protein ya da peptid karakterizasyonu için kullanılmıştır. Proteomik analizler, tek bir akrebin venomunda 100'den fazla peptid bileşeninin varlığını göstermektedir. Gerçekleştirilen venom tanımlama çalışmaları ile akrep biyoçeşitliliği göz önüne alındığında yaklaşık 100.000'den fazla sayıda peptid bileşenin akrep venomlarında var olduğu düşünülmektedir. Ancak günümüze kadar yaklaşık 400 farklı akrep venom peptidi tanımlanabilmiştir. Bu konudaki bilgilerimizin hala sınırlı

olmasıyla birlikte günümüzde akrep venomları; iyon kanallarının yapı araştırmalarında ve aktivasyon/inaktivasyon çalışmalarında, protein ilaç tasarımı, akrep zehirlenmesine karşı antiserum (anti-venom) üretiminde ve biyopestisid üretiminde kullanılmaktadır. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda memelilere toksik olmayan akrep peptidlerinin tedavi amaçlı kullanımları araştırılmaktadır. Akrep toksinleri özgülükleri ve yüksek etkinlikleri nedeniyle iyon kanal fonksiyonunu gösteren çeşitli reseptör proteinlerin tanımlanması için kullanılan farmakolojik araçlardır (Bosmans ve Tytgat, 2007).

Akrep venomlarında, doğuştan gelen bir bağışıklıkla bakteriyel enfeksiyonlardan koruyan ya da toksinin etkisini güçlendirdiği düşünölen antibakteriyel peptidlerin var olduğu bilinmektedir. Bakteriyel enfeksiyonların tarih boyunca halk sağlığını tehdit ettiği bilinmektedir. Günümüzde varolan yada kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmış bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların kontrolü için yeni antibakteriyel moleküllerin keşfi ve tasarımı uluslararası bir ihtiyaçtır. Venomlar da ilaç araştırmalarında önemli rol almakta ve yüksek seçicilikteki özgülükleri nedeni ile günümüzde keşfedilen yeni farmakolojik aktif moleküllerin temelini oluşturmaktadır. Akrep venomlarından 2000’li yılların başında ilk izole edilen antimikrobiyal peptidler olan *Hadrurus aztecus*’tan “hadrurin” ve *Pandinus imperator*’dan “scorpine” nin keşfi ile akrep ham venomunda bulunan geniş spektrumlu antimikrobiyal etkili peptidlerin izolasyonu ve tanımlanması araştırılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, antibiyotiklerin dirençli bakterilerde etkisinin azalması ve tedavilerin başarısızlıkla sonuçlanması nedeniyle yeni değerlere ihtiyaç duyulmasından dolayı akrep venomlarından antibakteriyel etkili yeni peptidlerin saflaştırılmasıdır. Bu kapsamda *Calchas nordmanni* türü akrepler, Trabzon iline bağlı Esiroğlu ilçesinden toplanmıştır. Toplanan akreplerden elektrostimölasyon yöntemi ile ham venom elde edilmiş, venomun antibakteriyel etkinliği tarama bakterileri olan 4 adet Gram negatif (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* NRRL B-123) ve 4 adet Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Bacillus subtilis* NCIB 3610,

Micrococcus luteus NCIB 196) bakteri üzerinde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak ham venom Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile fraksiyonlarına ayrılmış ve fraksiyonların Gram pozitif *Bacillus cereus* NRRL B-3711 ve Gram negatif *Proteus vulgaris* NRRL B-123 üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. *Bacillus* bakterileri hem insan hem de hayvanlarda patojen olmaları, suda ve toprakta yaygın olarak bulunmaları, aktarılabılır plazmid veya kromozomal kökenli direnç genlerini taşımaları nedeniyle antibiyotik direncinin çevreye yayılmasında ve direnç genlerinin evriminde önem taşımaktadırlar. Bu nedenle çalışmaların devamı için *Bacillus cereus* NRRL B-3711 bakterisi üzerine odaklanılmıştır. *Bacillus cereus* NRRL B-3711 üzerine antibakteriyal etkinliği belirlenen fraksiyonun Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) tekniği ile molekül ağırlığı belirlenmiştir.

BÖLÜM 2

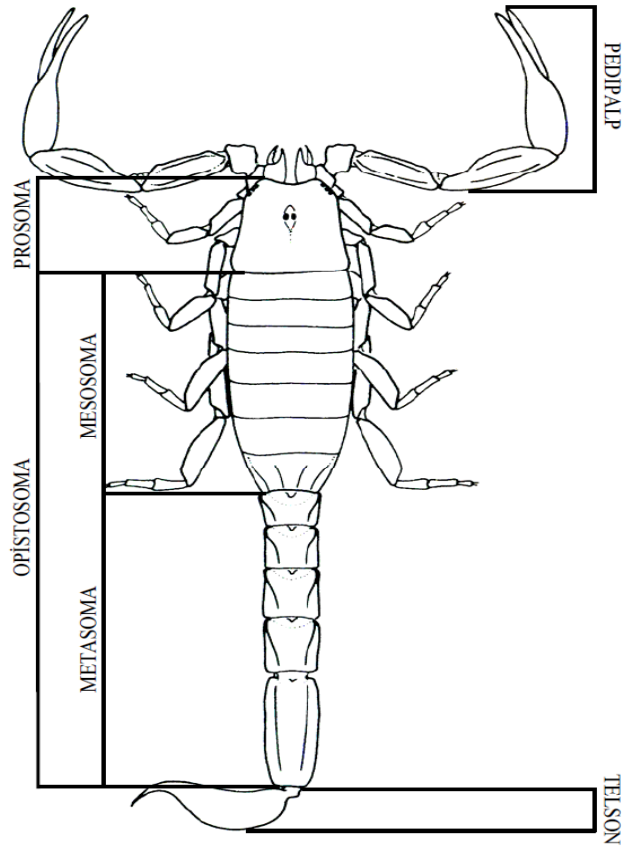
GENEL BİLGİLER

2.1 Akrelerin Genel Özellikleri

Akreler sudan karaya çıkan ilk hayvan gruplarından. Silurien Dönemi'nde sularda yaşadıkları, yaklaşık 420 milyon yıl önce Geç Silurien'de ise karaya çıktıkları fosil kanıtlarla ortaya konmuştur. Karbonifer Devri'nin sonundan günümüze kadar geçen sürede yapısal özellikleri, fizyolojileri, davranış ve ekolojileri çok az değişikliğe uğramıştır. Bu nedenle yaşayan fosiller olarak da bilinmektedirler (Gwee, et al., 2002; Salman, 2006; Yağmur, 2011).

Akreler, karakteristik şekilleri nedeniyle kolay tanınabilen, boyları 13-220 mm arasında değişen eklembacıklılardır. Akrelerin vücutları dorso-ventral basık olup prosoma (sefalotoraks) ve opistosoma (abdomen) olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Prosoma segmentsizdir ve sırt tarafı karapaks adı verilen kitin bir örtü ile örtülüdür. Prosomada; bir çift pedipalp, bir çift keliser, 4 çift bacak, bir çift median göz ile türlere göre değişen 2-5 çift arası lateral göz bulunur. Pedipalpler; av hayvanlarını yakalamak, yaralamak, tutmak ve ezmek için makas şeklinde farklılaşmıştır ve ekstremitelerin en büyüğüdür. Keliserler, prosomanın ilk çift ekstremitesidir ve av hayvanlarını tutmaya ve bazen de birbirlerine sürtülerek ses çıkarmaya yararlar. Bacaklar, her göğüs halkasında bir çift olmak üzere dört çifttir ve üzerinde yerdeki titreşimleri algılamaya yarayan ince tüyler bulunmaktadır. Median gözler, karapaks üzerindeki konumu sayesinde önemli bir görüş açısı sağlar. Lateral gözler gece görüşünü sağlar ve bu sayede çok zayıf ışıkların, hatta yıldızların ışıklarının bile algılanabildiği bildirilmiştir (Özkan ve Karaer, 2004; Yağmur, 2005; Kovařík, 2009).

Opistosoma iki bölümden oluşur; ön bölüm mesosoma (preabdomen), arka bölüm ise zehir bezlerinin ve iğnenin bulunduğu metasoma (postabdomen) olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Mesosoma'nın sırt tarafında "tergit", karın tarafında ise "sternit" adı verilen kitin plaka bulunmaktadır. Mesosoma'nın birinci segmenti dar ve küçük sternitlidir. Bu sternitin ortasında, kenarları yuvarlak ve ortası yarık bir kapak bulunur. Genital operkulum (eşeyssel operkül) adı verilen bu kapağın altında bir tek eşeyssel açıklık bulunur. İkinci segmentinin üzerinde de tarak (pektin) denen bir çift duyu organı bulunur. Sadece akrelerde bulunan bu yapı yerden gelen titreşimleri algılamada mekanik, eşini bulma ve nemli yerleri bulmada ise kimyasal reseptör olarak kullanılır. Metasoma (kuyruk)'daki en son halka telson olarak adlandırılır ve ucunda bir çift zehir bezine bağlı, sivri bir zehir iğnesi bulunur (Karataş, 2001; Yağmur, 2011).



Şekil 2.1. Akrelerin vücut kısımları (Yağmur, 2011).

Akrepler fotolimünesans özelliğine sahiptirler ve UV ışık (365 nm) altında fosforlu bir ışık verirler. Bu özelliğe floresans özellik adı verilir (Şekil 2.2). Bu özellik ilk olarak 1954 yılında bulunmuş ve türler arası emisyon yoğunluğuna göre farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Bu özelliğin sebebi, akrep doğduktan sonra üst derinin (kutikulasının) içinde 4-metil-7-hidroksi-kumarin birikmesidir. Bu nedenle yeni doğmuş yavrularda floresans özellik olmaz. 4-metil-7-hidroksi-kumarin alkolde bozulmadığı için, alkole atılarak tespit edilmiş örnekler de floresans özellik gösterir (Stahnke, 1972; Stachel, et al., 1999).



Şekil 2.2. Ultraviyole ışık altında *Calchas nordmanni* görüntüsü.

2.2. Akrelerin Sistematikteki Yerleri

Akrepler, tüm kıtalar ve adaların tropik ve subtropik bölgelerinde dağılım göstermektedirler. Yeni Zelanda dışında tüm dünyaya yayılmışlardır. Ekvatora yaklaştıkça tür sayısında bir artış görülür (Nenilin and Fet., 1992; Yağmur, 2005). Linnaeus (1758), “Systema Naturae” isimli kitabının 10. baskısında “Scorpio”cinsi altında 5 tür (*Scorpio afer*, *S. americanus*, *S. australis*, *S. europaeus*, *S. maurus*)

tanımlamıştır. Daha sonra Latreille (1802), akrepleri “Insecta Acera” diye isimlendirdiği grup altında ayrı bir familya “Famille des Scorpionides” olarak yer veren ilk yazar olmuştur. Takım ismi olarak “Scorpiones” terimi ise ilk kez Koch (1850) tarafından kullanılmıştır.

Dünyada 1982 akrep türü tanımlanmış, bunların 189 cins ve 14 familya (Akrauidae, Bothriuridae, Buthidae, Caraboctonidae, Chactidae, Chaerilidae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae, Iuridae, Pseudochactidae, Scorpionidae, Superstitioniidae, Typhlochactidae, Vaejovidae) altında toplandıkları kabul edilmiştir. Akrepler, Türkiye’de 4 familya, 22 türle temsil edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda Buthidae familyasına ait 10 tür; *Androctonus crassicauda*, *Mesobuthus gibbosus*, *Mesobuthuseupeus*, *Mesobuthus caucasicus*, *Mesobuthus nigrocinctus*, *Compsobuthus matthiesseni*, *Leiurus quinquestriatus*, *Leiurus abduhbayrami*, *Buthacus macrocentrus*, *Hottentottasaulcyi*, Euscorpiidae familyasına ait 4 tür; *Euscorpius italicus*, *Euscorpius carpathicus*, *Euscorpius mingrelicus*, *Euscorpius tergestinus*, Iuridae familyasına ait 7 tür; *Iurus asiaticus*, *Iurus kadleci*, *Iurus kinzelbachi*, *Iurus kraepelini*, *Calchas nordmanni*, *Calchas birulai* ve *Calchas gruberi* Scorpionidae familyasına ait 1 tür; *Scorpio maurus* tanımlanmıştır (Karataş, et al., 2005).

Calchas nordmanni türü akrebin sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir.

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Chelicerata

Classis: Arachnida

Subclassis: Dromopoda

Ordo: Scorpiones

Superfamilya: Vaejovoidea (Thorell, 1876)

Familiya 1: Iuridae (Pocock, 1893)

Genus 1: Calchas (Birula, 1899)

Calchas nordmanni (Birula, 1899)

Türkiye’de; Artvin-Erzurum yöresinde endemik olduğu sanılan Calchas nordmanni yakın geçmişte yapılan çalışmalar ile Bursa, Bilecik, Antalya, Hatay , Gaziantep, Malatya, ve Adıyaman’da tespit edilmiştir (Özkan ve Karaer, 2003; Yağmur, 2005). Yunan adalarında (Meis ve Sisam) da dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Fet and Braunwalder, 2000).

Calchas nordmanni genelde koyu kahverengi ya da siyah renkli bir akrep türüdür. Yürüme bacakları açık kahverengidir. Taş duvarlarda, evlerin içinde ya da taş altlarında buldukları bildirilmiştir (Yağmur, 2005).

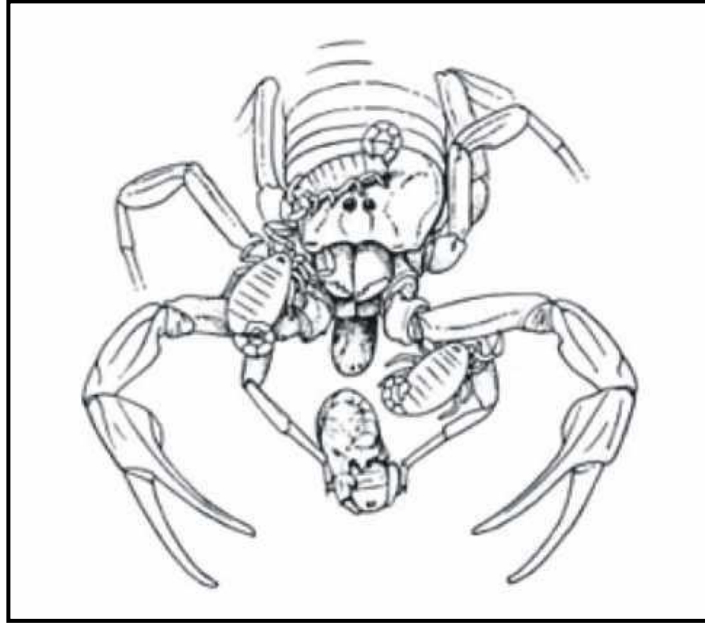
2.3. Akrelerin Biyolojileri

Akreler, taş altlarında, kaya çatlaklarında, tropik ormanlarda, bozkırlarda, kazdıkları yuvalarda ve mağaralarda yaşarlar. Birçoğu toprakta derinlere iner ve yuva yaparlar. Vücutları oransal olarak büyük olmasına karşın çok yassı yapılı olduğu için dar aralıklar ile ağaç kabuklarının altlarına ve duvar yarıklarına saklanabilirler (Özkan ve Karaer, 2007; Plessis, et al., 2008).

Akreler beslenmek ve üremek için aktif olarak hareket ederler. Akreler genelde gececil (nokturnal) türlerdir. Gece yuvalarından çıkıp pedipalplerini havaya kaldırarak dolaşırlar.

Bazen de yuvalarının girişinden, taşların altından, taş duvarların içinden ya da kaya çatlaklarında pedipalplerini çıkararak beklerler. Bu sayede pedipalplerin üzerindeki duyu organları yardımıyla çevreleri hakkında detaylı bilgiye sahip olurlar. Genelde böcek, örümcek ve çyanlarla beslenirler. Büyük akrepler kertenkele ve fare gibi omurgalıları da avlayabilirler. Akrepler besin ihtiyacı az olan ve çok dayanıklı hayvanlardır. *Androctonus australis*'in 1 sene kadar açlığa dayanabildiği tespit edilmiştir (Demirsoy, 1999; Özkan ve Karaer, 2007; Yağmur, 2011).

Akrepler ayrı eşeylidirler. Genellikle dişiler erkeklerden daha büyüktür. Erkeğin dişinin pedipalplerinden tutarak, karşılıklı olarak 1 saat kadar dans ettikleri bilinmektedir. Erkek spermatoforunu uygun yere yapıştırarak dişinin bu spermatoforu genital açıklığından içeri almasını sağlar. Döllenme bitince ya da bu dans yapılırken dişinin erkeği yediği bilinmektedir (Tallarovic, et al., 2000; Lourenço, et al., 2003). Gebelik dönemleri 7-12 ay sürer ve 34-110 yavru doğururlar. Dişi akrepler doğumdan birkaç saat önce kendilerini doğum yapacakları duruş şekline (doğum pozisyonu) hazırlarlar. Duruş şekli; türlere göre değişiklik göstermekle birlikte genellikle son iki çift bacak üzerinde karın ve vücudun ön kısmı yerden olabildiğince yükseltilecek şekilde sağlanır. Kısaçılar vücuttan uzak ve bükük haldedir. Doğum süresi yavru sayısına, büyüklüğüne ve türlere göre değişkenlik gösterebilmekte, saatlerce hatta günlerce sürebilmektedir. Doğum sepeti içinde bulunan yavrular eşeyssel açıklıktan birer birer dışarı çıkarlar. Doğan yavrular bir zarla kaplıdır. Doğumdan hemen sonra bu zar ya yavrular tarafından ya da annelerinin yardımıyla yırtılır. Zardan ayrılan yavrular doğum pozisyonunu devam ettiren akrebin birinci çift bacaklarını kullanarak hemen sırtına çıkarlar (Şekil 2.3). Bu dönemde annelerinin sırtından düşen yavrular tekrar annelerinin sırtına çıkamadıkları için su kaybından ölürler. Yavrular birinci gömlek değişimini anne sırtında gerçekleştirirler. Akrepler ergin olmadan önce 1-3 yılda 6-9 gömlek değiştirirler. Embriyo sonrası gelişim 7-85 ay arasında değişiklik gösterir. Erginlik dönemleri 6-96 ay sürer. Tespit edilmiş en fazla ömür uzunluğu 24 yıl ile *Urodacus yashenkoi* türüne aittir (Lourenço, 2000; Özkan ve Karaer, 2007; Yağmur, 2011).



Şekil 2.3 Doğum yapan akrebin yavrularını sırtına alış davranışı (Lourenço, 2000)

2.4. Akrep Venomunun Özellikleri

Akrep venomu kompleks bir karışımdan oluşmaktadır. Bu sıvı karışım; mukus, inorganik tuzlar, düşük molekül ağırlıklı organik moleküller, enzimler, nükleotidler, aminler ve nörotoksik peptidler olarak adlandırılan birçok küçük proteinleri içermektedir. Bunların yanı sıra sitolitik peptidler, tripsin inhibitör benzeri peptidler, lizozimler, bradikinin güçlendirici benzeri peptid ve anyonik peptidlerde akrep venomlarında bulunmaktadır (Bosmans ve Tytgat, 2007; Plessis vd., 2008; Yuan, et al., 2010).

Akreplerin gelişmiş venom sistemlerine sahip olmalarıyla birlikte evrimsel süreçte büyük değişikliklere uğramadan hayatta kaldıkları bilinmektedir. Akrepler, zehirli hayvanların tümünden farklı olarak venomları kuyruk lateralinin ucunda yer almaktadır. Venom sistemlerinin konumu itibariyle zehirli hayvanlar arasında akrep

venomlarının bağımsız olarak geliştiği gözlenmiştir (Inceoglu, et al., 2003; Yibao Ma, 2011).

Venom bileşenlerinin protein kökenli olduğu 1950'lilerin ortasında anlaşılmıştır. Gelişen protein ayırma teknikleri ile yaklaşık 10 yıl sonra da ilk nörotoksin izole edilebilmiştir (Rodriguez de la Vega, et al., 2010). Bugüne kadar akrep venomlarından saflaştırılan peptidlerle birçok biyokimyasal ve moleküler çalışmalar yapılmıştır. Farklı akrep türlerinin venom peptidlerinden; insektisit, analjezik (Kozlov, et al., 2000; Xiong, et al., 1999), anti-epileptik (Wang, et al., 2001), anti-malaryal ve anti-mikrobiyal (Conde, et al., 2000; Torres-Larios, et al., 2000; Corzo, et al., 2001; Moerman, et al., 2002), anti-bakteriyal (Diaz, et al., 2009) etkiye sahip olan farmakolojik bileşenler izole edilmiştir.

2.5. Akrep Toksinlerinin Sınıflandırılması

Akrep venomunda, uyarılabilen ya da uyarılamayan iyon kanal fonksiyonlarını etkileyen; çoğunun toksik olduğu bilinen 100.000 farklı peptid bulundurmaktadır. Bugüne kadar akrep toksinlerinin yaklaşık 400 kadarının birincil yapıları tanımlanmıştır. Bu rakam olası farklı peptidlerin sayısının % 4'ünü oluşturmaktadır (Possani, et al., 2000; Goudet, et al., 2002).

Akreplerde bulunan peptid toksinlerinin farklı özelliklerine göre sınıflandırıldığı bilinmektedir. Moleküler boyutlarına göre, uzun zincirli toksinler ve kısa zincirli toksinler olarak ayrılmaktadırlar. Genel olarak kısa zincirli peptidler 22-47 aminoasit uzunluğunda iken, uzun zincirli peptidler 60-76 aminoasit uzunluğundadır. Farklı hayvanlar üzerindeki aktivitelerine göre, memeli özgül toksinler, böceklere (insekt) özgül toksinler ve kabuklulara (crustacea) özgül toksinler; mekanizmalarına göre,

nörotoksinler ve sitotoksinler; disülfid köprüsü içeren toksinler ve disülfid köprüsü içermeyen toksinler olarak sınıflandırılmaktadır (Zhijian, et al., 2006). Disülfid köprülü akrep toksinleri, farmakolojik fonksiyonlarına göre sodyum (Na^+) kanal toksinleri, potasyum (K^+) kanal toksinleri, klor (Cl^-) kanal toksinleri ve kalsiyum (Ca^+) kanal toksinleri olarak ayrılmışlardır. Disülfid köprüsü içermeyen akrep venom toksinleri biyoaktif peptidlerin geliştiği önemli bir sınıftır (Zhijian, et al., 2006).

2.5.1. Sodyum kanalına etkili akrep toksinleri (NaScTxs)

Na^+ kanal toksinleri, 60-76 aminoasit ve 4 disülfid köprüsü içeren nörotoksik akrep toksinleridir. Çekirdek yapısı üç disülfid köprüsü ile paketlenerek korunmakta, dördüncü disülfid köprüsü ise en az üç farklı yerleşimi birbirleri ile bir arada tutmaktadır (Possani, et al., 1999; Zhijian, et al., 2006). Bu toksinler için en yaygın olarak kullanılan sınıflandırma bağlanma ve yer değiştirme çalışmalarına göre yapılmaktadır. Memelilere ve böceklere karşı toksiklerdir. Memeliler için özgül nörotoksinlerdir, α tipi nörotoksinler ile β tipinörotoksinler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bunlardan α tipi nörotoksinler Na^+ kanallarının aktivasyonunu etkilemez fakat bu kanalın inaktivasyonunu yavaşlatır ve Na^+ kanal reseptörüne 3. bölgeden bağlanarak aksiyon potansiyelini uzatır. β tipi nörotoksinler Na^+ kanal reseptörüne 4. bölgeden bağlanarak kanal aktivasyonunu etkiler. β tipi nörotoksinler Na^+ kanal reseptörüne 4. bölgeden bağlanarak kanal aktivasyonunu etkiler. Na^+ kanallarına spesifik α ve β toksin tipleri arasında birçok varyasyon ve alt tipler bulunmaktadır (Jover, et al., 1980; Possani, et al., 1999a).

2.5.2. Potasyum kanalına etkili akrep toksinleri (KTxs)

K^+ kanal toksinleri 20-70 aminoasit ve 3 disülfid köprüsü içerirler. K^+ kanallarını bloke eden toksik peptidlerdir. Bu peptidler, kanalın dış girişine bağlanmakta ve kanalı tıkayarak iyon iletimini engellemektedirler. Uyarılabilir ve

uyarılamayan hücrelerdeki K^+ geçirgenliğini bloke eden ya da değiştiren akrep venomlarından elde edilen günümüzde bilinen yaklaşık 140 peptit bulunmaktadır (Tytgat, et al., 1999; Rodríguez de la Vega and Possani, 2004).

K^+ kanallarında rol oynayan peptitler α -KTx, β -KTx ve δ -KTx akrep toksinleri olarak üç grupta sınıflandırılmaktadır (Tytgat, et al., 1999). Son yıllarda, akrep venomunda zayıf K^+ kanal toksinleri içeren yeni bir familya (κ -KTx) saptanmıştır (Nirthanan, et al., 2005). Bu peptidlerin tümü disülfid bağları ile bir α -heliks bölgesine bağlı üç anti-paralel beta dizisi içeren biçimdedir. En iyi tanımlanmış olan peptidler (ChTX, IbTX ve AgTX) voltaja bağlı K^+ kanalları ya da Ca^{2+} ile aktive edilmiş K^+ kanallarının Kv1 ailesinin üyeleri ile etkileşirler (Garcia, et al., 2001). İlk olarak tanımlanan K^+ kanalları için özgül toksin *Centruroides noxius* akrep venomundaki Noksiustoksin (NTX) dir (Possani et al., 1982).

2.5.3. Klor kanalına etkili akrep toksinleri

Cl^- kanal toksinleri düşük molekül ağırlıklı polipeptidlerdir, 35-38 aminoasit ve 4 disülfid köprüsü içerirler. Bugüne kadar Cl^- kanalına etkili pek çok akrep venom toksinleri ve toksin benzeri peptidler belirlenmiştir. Bunlardan en dikkat çekici olanı *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* akrebinin ham venomundan saflaştırılan molekül ağırlığı 4,1 kDa olan “chlorotoxin” dir. Klorotoksin fare epitelindeki Cl^- kanallarını bloke edebilir ve de özellikle glia hücrelerinde patolojik değişikliklerle Cl^- kanallarına bağlanabilir yapıdadır (Tytgat, et al., 1998; Zhijian, et al., 2006).

2.5.4. Kalsiyum kanalına etkili akrep toksinleri

Ca^{2+} kanal toksinleri, temelde 33 aminoasit ve 3 disülfid köprüsü içerirler. Akrep venomlarından Ca^{2+} kanalına spesifik birkaç akrep toksini izole edilmiştir. Bunlar

Pandinus imperator türü akrepten IpTxA ve IpTxi (Valdivia and Possani, 1998); ve Scorpio maurus palmatus türü akrepten 'maurocalcine (Mca)'dir (Fajloun, et al., 2000). IpTxA ve Mca bazik aminoasitler yönünden zengin tek zincirli polipeptidler olup, 33 aminoasitten oluşur ve çapraz bağlı 3 disülfid köprüsü içerirler (Cys3-Cys17, Cys10-Cys21, Cys16-Cys32). IpTxi 104 aminoasitten oluşur, 15 kDa molekül ağırlığına sahip büyük alt birimli bir heterodimerdir ve 27 aminoasit uzunluğunda kovalent bağlı küçük alt birime sahiptir. Ayrıca Parabuthus transvaalicus türü akrepten saflaştırılan kurtoksin üzerine çalışmalar yapılmıştır. Kurtoksin α_{1G} T-tipi Ca^{+2} kanalına yüksekaffiniteyle bağlanarak ve kanalı modifiye ederek inhibe etmektedir (Chuang, et al.,1998).

2.6. Akrep Venomlarından Saflaştırılan Peptidlerin Farmakolojik Etkileri

Günümüzde akrep venomları iyon kanalları yapı araştırmalarında ve aktivasyon/inhibasyon çalışmalarında, protein ilaç tasarımında, akrep zehirlenmelerine karşı antiserum üretiminde ve biyopestisid üretiminde kullanılmaktadır. Yeni toksin dizilimlerinin belirlenmesi, işlevlerinin ve yapısal niteliklerinin tanımlanması ile bilimsel araştırmalarda ve aynı zamanda tıbbi ve ticari uygulamalarda büyük ilgi görmektedir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda memelilere toksik olmayan akrep peptidlerinin tedavi amaçlı kullanımları araştırılmaktadır. Akrep toksinleri spesifiklikleri ve yüksek etkinlikleri nedeniyle iyon kanal fonksiyonunu gösteren çeşitli reseptör proteinlerin tanımlanması için kullanılan farmakolojik araçlardır (Bosmans and Tytgat, 2007).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda memelilere toksik olmayan akrep venom peptidlerinin tedavi amaçlı kullanımları araştırılmaktadır. Buthus martensii türü

akrep venomunun malignant glioma kültür hücrelerinde iyon kanallarına etkileme yolu ile apoptosizi uyardığı belirlenmiştir (Wang and Ji, 2005).

BÖLÜM 3

ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLER

3.1. Antimikrobiyal Peptidler ve Etki Mekanizmaları

Tüm canlıların mikroorganizmalara karşı kendilerini koruyabilmeleri için bağışıklık sistemleri sayesinde antimikrobiyal etkili peptidler ürettiği ve bu peptidler sayesinde immün sistemde meydana gelebilecek olan enfeksiyonlara karşı mikroorganizmaları etkisiz hale getiren özel bir immün yanıt oluşturduğu bilinmektedir (Bals, 2000). Antimikrobiyal peptidler (AMP), özellikle mukozayla kaplı yüzeylerde bulunan epitelyum hücreler ve fagositik hücreler tarafından, düşük enerjiyle hızlı bir şekilde sentezlenmekte ve kolaylıkla büyük miktarlarda saklanabilmektedir. Depo edildiği yerlerde hazır bekleyen bu peptidler, enfeksiyondan kısa bir süre sonra yüksek miktarlara ulaşarak ve birbirleri ile ya da lizozim, laktoferrin gibi konağa ait diğer doğal savunma faktörleriyle ve çeşitli antibiyotiklerle de sinerjist etki meydana getirerek birçok mikroorganizma türünün üremesini hızla inhibe etmektedir (Dale and Fredericks, 2005).

Omurgalı canlılarda, daha önce böceklerde bulunan peptidlere analog olan, antimikrobiyal etki için hazır halde bekleyen geniş spektrumlu mikrobisidal peptidleri temel alan bir immün yanıt vardır (Hancock and Diamond, 2000). Salgıların antimikrobiyal aktiviteleri keşfedildikten sonra izole edilen antimikrobiyal bileşiklerin Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler için seçici olduğu gösterilmiştir (Brogden, 2005). Bu bileşikler nazal mukusta bulunan ve sonradan lizozim olarak adlandırılacak bakteriyolitik bileşiği, temel antimikrobiyal proteinleri ve temel lineer doku polipeptidlerini içermiştir. Bu antimikrobiyal maddelerin normal dokularda ve

sıvılardaki varlığı ile mikroorganizmalara olan doğal direnç arasındaki ilişki uzun zaman önce kurulmuştur. Bu maddeler enfeksiyon ajanını öldürmek veya üremesini yavaşlatmak için uyarılabilen, aynı zamanda doğal ve edinsel bağışıklık arasında köprü görevi gören bileşikler olarak tanımlanmış ve antimikrobiyal peptid araştırma alanı doğmuştur (Ruh, 2012).

AMP'ler sadece membrana sahip olan hedeflere etki etmektedir. Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler, mantarlar, parazitler, HIV ve herpes virüsler gibi zarflı virüsler ve hatta kanser hücreleri AMP'lerin hedefi olabilmektedir. AMP'lerin etki mekanizmaları başlıca iki grupta incelenmektedir. Bunlar transmembran por oluşturucu mekanizmalar ve hücre içi öldürme mekanizmalarıdır (Hancock and Diamond, 2000; Brogden, 2005). Transmembran por oluşturucu mekanizmalar arasında membran permeabilizasyonuna yönelik öne sürülen modeller arasında en çok kabul görenler; kilim modeli, fiçı modeli, ve toroidal-por modelidir. Hücre içi öldürme mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamasına rağmen AMP'lerin hücre içi bazı hedefleri olduğu belirtilmiştir. AMP'ler bakterilerde hücre duvar sentezini inhibe edebilmekte ve sitoplazmik membranda birtakım değişikliklere sebep olarak septum oluşumunu inhibe edebilmektedirler. AMP'lerin DNA, RNA, protein sentezi veya enzimatik aktiviteler gibi hücresel işlevleri de inhibe edebildikleri belirtilmiştir (Huang, et al., 2010; Ruh, 2012).

3.2 Antimikrobiyal Peptidlerin Kimyasal ve Yapısal Özellikleri

AMP'ler hidrofobik ve hidrofilik kısımları olan 12-50 aminoasitten oluşan pozitif yüklü moleküllerdir. Bu özellikler, moleküllerin su içeren ortamlarda çözünebilmesini ve lipidce zengin membranlara girebilmesini sağlamaktadır. Bu moleküllerin net yükünün pozitif olmasının nedeni bazik amino asitlerin (arjinin, lizin ve

histidin) asidik amino asitlerden sayıca fazla olmasıdır (Hancock and Chapple, 1999; Hancock and Diamond, 2000).

AMP'lerin fiziko-kimyasal özelliklerinin benzer olmasına ve küçük yapıları olmalarına rağmen, üç boyutlu yapılarının farklılık göstermelerinden dolayı dört gruba ayrılmaktadırlar. En çok karşılaşılan gruplar membranlar ile teması girdikten sonra amfipatik α -heliks yapısı oluşturan düzensiz peptidler ve 2-4 disülfid köprüsü ile stabilize edilen β -tabaka peptidlerdir. Daha az yaygın olan gruplar ise bir veya iki amino asit (prolin, triptofan veya histidin gibi) hakimiyeti olan uzatılmış peptidler ve tek bir disülfid bağından oluşan düğüm (loop) peptidlerdir. Diğer katyonik antimikrobiyal peptidler ise laktoferrin gibi daha büyük katyonik proteinlerin proteolitik kesimi sonucu oluşmaktadır. En önemli yapısal özellikleri, peptidin yüklü ve hidrofilik kısımlarının molekülün hidrofobik bölümlerinden ayrıldığı bir şekil alabilmesidir. Bu kısımlar amfipatik yapılar veya yüklü iki bölümü ayıran hidrofobik bir bölümden oluşan katyonik çift taraflı yapılar haline gelmektedir (Hancock and Lehler, 1998; Salzet, 2002).

3.3 Akrep Venomlarından ve Hemolenfinden İzole Edilen Antibakteriyel Peptidler

Akrelerde antibakteriyel peptidlerin varlığının zehir bezini patojen enfeksiyonlardan korumak ya da potansiyel toksin hareketi için olacağı öne sürülmektedir. Bundan yola çıkarak antimikrobiyal peptid çalışmalarında akrep venomlarından ve/veya hemolenfinden izole edilen peptidler üzerinde yoğunlaşmıştır.

Akrelerde belirlenen ilk antimikrobiyal peptid defensin tiptedir ve *Leiurus quinquestriatus habraeus* türü akrebin hemolenfinden izole edilmiştir (Cociancic, et al.,

1993). Daha sonra Buthidae, Scorpionidae, Ischnuridae ve Iuridae familyasına ait akreplerin hemolenfinden yada venomundan sitolitik ve antibakteriyal etkili peptidler izole edilmiştir (Conde, et al., 2000; Torres-Larios, et al., 2000; Corzo, et al., 2001; Dai, et al., 2002; Moerman, et al., 2002; Rodriguez de la Vega, et al., 2004; Uawonggul, et al., 2007). Hadrurus aztecus türü akrepten izole edilen Hadrurin (Torres-Larios, et al., 2000); Opisthacanthus madagascariensis'den IsCT 1 ve IsCT 2 (Dai, et al., 2001; Dai, et al., 2002); Isometrus maculates venomundan elde edilen Imcroporin (Zhao, et al., 2009); Vaejovis mexicanus venomundan izole edilen Vejovine peptidi (Cynthia, et al., 2011); Pandinus imperator türü akrepten izole edilen Pandinin 1 ve 2 (Corzo, et al., 2001), multi ilaç dirençli gram negatif bakterilerin büyümesini engellemiştir. Mesobuthus martensii Karsch türü akrepten izole edilen BmKbpp peptidinin antimikrobiyal etkisinin yanı sıra çok fonksiyonlu bir peptid olduğu ve bu peptidin immün düzenleyici ve bradikinin güçlendirici etkinliğinin olduğu belirtilmiştir (Zeng, et al., 2004). Scorpiops tibetanus türü akrep venomundan izole edilen ScT2, gram pozitif bakterilerin büyümesini durdururken gram negatif bakterilerin büyümesini durdurucu etkisi olmadığı belirlenmiştir (Cao, et al., 2012). Heterometrus spinifer türü akrepten elde edilen HsAp, gram negatif ve gram pozitif bakterilerin ve fungusların büyümesini durdurmuştur (Nie, et al., 2012). Kuzey Afrika akrebi olan Androctonus amorexi türü akrep venomundan biyosentetik öncül kodlayan cDNA'ların nükleotid sekansları arasında AamAP1 ve AamAP2 adı verilen iki yeni antimikrobiyal peptidin birincil yapıları bildirilmiştir. Bu iki peptid sekanslarının kimyasal sentezinin ardından AamAP1 peptidinin analogu olan AamAP-S1 peptidinin antimikrobiyal ve hemolitik aktiviteleri değerlendirilmiş ve bir dizi kanser hücresi üzerinde durdurucu etkileri belirlenmiştir (Ammar, et al., 2012).

BÖLÜM 4

MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyal

4.1.1 Akrelerin toplanması ve bakımı

Çalışmada kullanılmak üzere *Calchas nordmanni* türü akrepler Trabzon ilinin Esiroğlu ilçesinden 2012 ve 2013 yılının ağustos ayında UV lamba kullanılarak toplanmıştır. Toplanan akrepler üzerlerine havalandırma delikleri açılmış olan plastik kutularda 23-25 °C'de, doğal havalandırma olarak ESOGU Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Venom Araştırma Laboratuvarında (ESOGU VAL) çalışmalar süresince canlı olarak saklanmıştır. Akrepler haftalık olarak *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvaları ile beslenmiştir. *Tenebrio molitor* larvalarında aynı zamanda laboratuvarımızda ayrıca beslenecektir (Gopalakrishnakone, et al., 1995; Çalışkan, 2002).

4.1.2 Kullanılan kimyasallar

Çalışmalar süresince analitik saflıktaki kimyasal maddeler kullanılmıştır.

1. Akrilamid (Sigma A3575N (%30 mix) ve AppliChem A3812)
2. Amonyum persülfat (AppliChem A2941)
3. Bis-akrilamid (AppliChem A3636)
4. Bromofenol blue (AppliChem A2331)
5. Coomassie Brilliant Blue R-250 (AppliChem A1092)

6. Glisin (AppliChem A1067)
7. Sodyum dodesil sülfat (AppliChem A2263)
8. N.N.N'.N'-tetrametilenetilendiamin (TEMED) (AppliChem A1148)
9. Tricine (Sigma T0377)
10. Metanol (Sigma 34885)
11. Asetik asit (Riedel-de Haën)
12. Trisbase (Sigma T1503)
13. Tris-HCl, (Sigma, 88438)
14. Ultra-düşük molekül ağırlık markerı (M.W. 1,060-26,600)
15. Dithiothreitol (DTT) (Sigma, D-0632)
16. Triton X 100 (Sigma 234729)
17. Asetonitril (J.T Baker HPLC gradient grade 8143)
18. Moleküler ağırlık markerı 6,5 kDa-26,6 kDa (Sigma M4038)
19. Moleküler ağırlık markerı 1 kDa-205 kDa (Sigma 3546)
20. Trifloroasetik asit (J.T Baker 9470-01)
21. Nutrient broth ve nutrient agar (HIMEDIA)
22. Hidroklorik asit (Riedel-de Haën 07102)
23. Gliserol (Riedel-de Haën 07102)

4.1.3 Kullanılan çözeltiler

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında ESOĞÜ Venom Araştırma Laboratuvarı protokolleri kullanılmıştır.

- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'nde kullanılan çözeltiler:

1) Tampon A çözeltisi: %0.12 derişimli trifloroasetik asitin (TFA) sudaki çözeltisi kullanılmıştır.

2) Tampon B çözeltisi: %0.10 derişimli trifloroasetik asitin asetonitril içindeki çözeltisi kullanılmıştır.

- SDS-PAGE çalışmalarında kullanılan çözeltiler:

1) %30'luk Akrilamid-mix çözeltisi: 29 gr akrilamid, 1 gr bis-akrilamid tartılır, 60 ml deiyonize su içinde çözülerek 37°C'ye ısıtılır ve çözünmesi sağlanır. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde deiyonize su ile tamamlanır ve koyu renk şişede +4°C'de saklanır.

2) %20'li SDS (pH: 7.2) çözeltisi: 20 gr SDS üzerine 80 ml deiyonize su eklenir ve 68°C'ye ısıtılır, pH 7.2'ye derişik HCl ile ayarlanır ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır. %10'luk SDS için 1/1 oranında seyreltilerek kullanılır.

3) Tricine jel tamponu: 3 M Tris-HCl (pH 8.45): 18.15 gr Tris Base, 150 mg SDS tartılarak 50 ml'ye deiyonize su ile tamamlanır.

4) %40'luk Akrilamid-mix çözeltisi: 38.66 gr akrilamid ve 1.33 gr bis-akrilamid tartılarak deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5) %70'lik Gliserol çözeltisi: %87'lik gliserolden 80.45 ml alınır, deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

6) %2.5'luk Triton X çözeltisi: 2.5 ml Triton X pipetlenerek deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

7) Katot tamponu 10X (pH 8.25): 24.2 gr Tris Base, 35.84 gr Tricine, 2 gr SDS deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlanır.

8) Anot tamponu 10X (pH 8.9): 48.4 gr Tris Base deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlanır.

9) 5X Yürütme tampon çözeltisi: (Tris-Glisin) (çalışmada 1X olarak kullanılmıştır) 7.55 gr tris-base, 47 gr glisin, 25 ml %10'luk SDS'in deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.

10) Yükleme jeli için 1M Tris-HCl Jel tampon çözeltisi: 12.11 gr Tris-base, pH 6.8 olacak şekilde HCl eklenir ve deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.

11) Yürütme jeli için 1.5M Tris-HCl Jel tampon çözeltisi: 27.24 gr Tris-base pH 8.8 olacak şekilde HCl eklenir ve deiyonize su ile 150 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

12) Destain Tamponu: 25 ml metanol, 37.5 ml asetik asitim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.

13) 2X temizleme çözeltisi: 35 ml asetik asitin deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.

14) %10'luk Amonyum persülfat (APS) çözeltisi: 0.25 gr APS tartılır ve 2.5 ml su eklenerek küçük hacimlere bölünür ve -20°C de saklanır.

15) 250 mM DTT çözeltisi: 0.77125 gr DTT tartılarak 20 ml'ye 0.01 M sodyum asetat (pH: 5.2) ile tamamlanır.

16) 2X jel örnek tampon çözeltisi: 1 ml 1 M Tris-HCl (pH:6.8), 2ml 250 mM DTT, 2 ml %20 SDS, 0.004 gr bromofenol blue, 2 ml gliserol eklenir ve 10 ml'ye deiyonize su ile tamamlanır

17) Coomassie brilliant blue boyama tampon çözeltisi: 0.1 gr coomassie blue, 40 ml metil alkol, 10 ml asetik asit, 50 ml deiyonize su ile hazırlanır.

18) 0.01M asetat çözeltisi (pH: 5.2): 0.0272 gr sodyum asetat tartılır ve 20 ml'ye deiyonize su ile tamamlanır.

4.1.4. Kullanılan cihazlar

1. Elektrostimülatör (Maksimum Kapasite, 50 V, 10 Hz)
2. Santrifüj: Hettich Micro 200R
3. Vakum Kurutucu: Labconco Centri Vap Concentratör
4. Hassas Terazi: SHIMADZU AU×220
5. HPLC: SHIMADZU Prominence series (SDP-M20A DAD)

6. HPLC Kolonları: Inertsil C 18 Protein & Peptid Coloumn 4,6×250 mm,
Nucleosil C 18 Protein & Peptid Coloumn 4,6×250 mm
7. Biometra Mini Jel Dikey Elektroforez Tankı
8. Biometra Güç Kaynağı (Power Pack P25T)
9. Ultrasonic Banyo: ELMAsonic
10. Derin Dondurucu: -20 Bosch
11. Orbital Çalkalayıcı: Biometra WT17
12. Nano Drop: Thermo Scientific 2000
13. UV Kabin: Chemocell LRCX-UV-Teknomar
14. Su Banyosu: Memmert
15. Binoküler Mikroskop: Leica MZ16 sterio mikroskop ile bağlantılı Leica DFC
490 görüntüleme sistemi
16. ELISA: Claffold Triturus
17. Etüv: Santez
18. pH metre: OHAUS starter3000
19. Manyetik karıştırıcı: Heildoph Mr hei-Standard

4.2. Yöntem

4.2.1. Ham venomun elde edilmesi

Akreplerden ham venom eldesinde elektriksel etki oluşturarak sağma yöntemi kullanılmıştır. 3-5 saniye boyunca elektrostimulator ile 20 volt'luk akım pens yardımıyla tutulan *C. nordmanni* türü akrebin telsonuna iki elektrot kullanılarak uygulanmıştır (Gupta, et al., 2007). Sağım süresince akrep venomları 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerin içerisinde toplanmıştır. Elde edilen ham venom distile su içerisinde çözülerek 30 dakika süreyle 4°C'de 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında peptid toksinleri içeren süpernatant bir pipet yardımıyla alınarak yeni bir mikrosantrifüjtüpüne aktarılmış ve vakumlu kurutucuda kurutulmuştur. Kuruyan venomlar etiketlenerek çalışmalarda kullanılana kadar - 20 °C'de tüplerin ağzı parafilm ile sarılarak saklanmıştır. Aynı işlemler düzenli olarak ayda 1 kez olmak üzere tekrar edilmiştir (Caliskan, et al., 2012).

4.2.2. Venom protein miktarının belirlenmesi

HPLC ve SDS-PAGE çalışmalarında kullanılmak üzere ham venom stoğundan alınan venom hassas terazide tartım yolu ile elde edilmiş ve cihaza yüklenmiştir (Possani, et al., 1982). Hassas terazi ile belirlenemeyecek kadar küçük miktarlarda olan peptid miktarlarının ölçümü de Thermo NanoDrop spektrofotometre ile yapılmıştır. 100 µl distile suda çözülen ham venomdan 2,5 µl alınarak cihaza yüklenmiş ve ölçümler A₂₈₀ yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Götze and Saborowski, 2011).

4.2.3. Ham venomun HPLC'de saflaştırılması ve peptidlerin eldesi

Ham venom saflaştırma çalışmalarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kullanılmıştır. Çalışma için C18 ters faz analitik protein peptid kolonu tercih edilmiştir. Çalışmalarda hareketli fazın akış hızı 1 dakikada 1 ml olacak şekilde ayarlanmış ve 60 dakika süresince 230 ve 280 nm dalga boyunda absorbans izlenerek ham venomun ayırımı gerçekleştirilmiştir (Batista, et al., 2000; Corzo, et al., 2001). Hareketli faz doğrusal gradient olarak uygulanmış, bölüm 4.1.3. de verildiği gibi A ve B olarak adlandırılan iki farklı bileşimdeki çözeltiler kullanılmıştır (Caliskan, et al., 2012).

HPLC'de fraksiyonlar çalışma başlangıcında her bir tüp içerisine 1 dakikalık elüsyon gelecek şekilde, etkin dakikaların belirlenmesinden sonra, kolondaki alıkonma sürelerine göre ayrı mikrosantrifüj tüpler içerisine manuel olarak toplanarak kurutulmuş ve etiketlenerek -20°C'de saklanmıştır (Caliskan, et al., 2006).

4.2.4. SDS-PAGE çalışmaları

SDS-PAGE ile ham venomun ve HPLC'de ayırımı yapılan ve taramalar sırasında belirlenen en etkin antibakteriyal peptidin elektroforetik profili ortaya çıkartılmıştır. Yöntem peptidlerin molekül ağırlıkları göz önüne alınarak iki farklı şekilde uygulanmıştır.

4.2.4.1 Molekül ağırlıkları 6,5-205 kDa arasındaki peptidler için SDS-PAGE

Çalışmaların protokolü, Laemmli (1970)'ye göre modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Ayırma jeli % 12 monomer çözeltisi (akrilamid/bis) olacak şekilde, %10 SDS içeren 1.5 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8) ile hazırlanmıştır. Yükleme jeli, % 4 monomer çözeltisi içerecek şekilde 0.5 M Tris-HCl tamponu (6.8) ile hazırlanmıştır. Polimerizasyon için amonyum persülfat, katalizör olarak da TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) kullanılmıştır. Örneklere ıslı ve DDT gibi etkenler ile denatürasyon ve indirgeme işlemleri uygulanmış, jelde 120 V akımda 2 saat süresince oda sıcaklığında yürütülmüştür. İşlem sonrasında peptid bantların görünmesi için %0.1 Coomassie Blue R-250 içeren çözeltide (% 40 metanol, % 10 asetik asit ve % 50 su içerisinde) 1 saat süresince orbital çalkalayıcıda çalkalanarak boyanmıştır. Ardından boyanın atılımı için destain çözeltisinde (%10 metanol ve %5 asetik asit) yıkanmıştır. Bu yöntem ile molekül ağırlığı bilinen standart marker (6.5-205 kDa) aynı jel ile birlikte yürütülmüş ve molekül ağırlığı belirlenerek ham venoma ait peptidlerin elektroforetik profili ortaya çıkartılmıştır.

4.2.4.2 Molekül ağırlıkları 26 kDa'dan küçük peptidler için SDS-PAGE

HPLC'de ayırımı yapılan ve taramalar sırasında belirlenen en etkin antibakteriyal peptid için Tricine-SDS PAGE yöntemi uygulanmıştır. Ayırma jeli %10 monomer çözeltisi (akrilamid/bis), yükleme jeli, %4 monomer çözeltisi (akrilamid/bis) olacak şekilde, %0.3 SDS içeren 3 M Tris-HCl tamponu (pH 8.45) ile hazırlanmıştır. Polimerizasyon için amonyum persülfat, katalizör olarak TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) kullanılmıştır. Örneklere ıslı ve DTT gibi etkenler ile denatürasyon ve indirgeme işlemleri uygulanmış ve 100 V akımda 2 saat süresince oda sıcaklığında yürütülmüştür. İşlem sonrasında bantların görünmesi için Coomassie Blue R-250 ile boyanmıştır. Tank tampon çözeltileri olarak tankın üst kısmında katot tampon çözeltisi, alt kısmı için ise anot tampon çözeltisi olmak üzere iki farklı çözelti sistemi

hazırlanmıştır. Ayrıca molekül ağırlığı bilinen standart markır (1-26.6 kDa aralığında) aynı jel ile birlikte yürütülmüştür (Schägger and von Jagow, 1987).

4.2.5 Antibakteriyal aktivite deneyleri

Çalışmalarda kullanmak için klinik önemi olan 4 Gram negatif (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* NRRL B-123) ve 4 Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Bacillus subtilis* NCIB 3610, *Micrococcus luteus* NCIB 196) bakteri suşları belirlendikten sonra antibakteriyal aktivitelerin belirlenmesi için deneyler yapılmıştır.

4.2.5.1 Agar difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi

Ham venom ve ham venomdan elde edilen fraksiyonların antibakteriyal etkinliği saptamak amacıyla agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır (NCCLS, 2003). Çalışmada kullanılacak olan saf bakteri kültürleri nutrient broth (HIMEDIA)'a ekilerek 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Torres, et al., 2009). 9 cm çapındaki steril cam petrilere, distile suda çözülerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu yapılan Nutrient agar (HIMEDIA)'dan 25 ml aktarılmıştır. İnkübasyonu tamamlanan kültürler mililitredeki mikroorganizma sayısını sabitlemek amacıyla dilüsyon yöntemiyle McFarland standardına göre 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml) olacak şekilde standardize edilmiş (Torres, et al., 2009) ve her bir petriye 100 µl inoküle edilerek, spatül yardımıyla agar yüzeyine yayılmıştır. Distile su içerisinde çözülmüş halde bulunan ham venom ve fraksiyonlarının konsantrasyonları, her birinden 20 µg/5 µl olmak üzere

petrilere aktarılmış ve 35°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçülmüştür.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

5.1 Arazi Çalışmaları ve Akrelerin Toplanma Sonuçları

1-7 Eylül 2012, 10-15 Ağustos 2013 ve 25-31 Ağustos 2013 tarihleri arasında Trabzon iline bağlı Esiroğlu ilçesinde arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu arazi çalışmalarında sırasıyla 45, 20 ve 38 adet Calchas nordmanni türü akrep toplanmıştır. Gece gerçekleştirilen arazi çalışmalarında akreplere sıklıkla eski taş duvarlar ve evlere yakın bahçe duvarlarında (Şekil 5.1) rastlanmıştır.



Şekil 5.1. Akrelerin toplandığı bahçe duvarının görüntüsü (Esiroğlu/Trabzon)

5.2 Ham Venomun Elde Edilmesi ve Sonuçlar

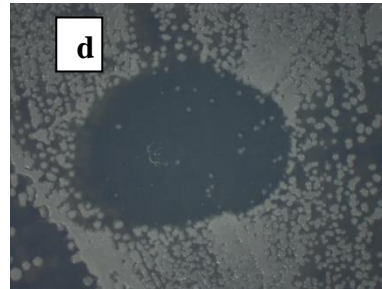
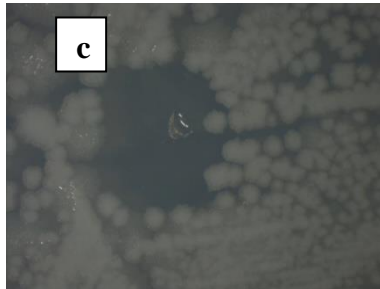
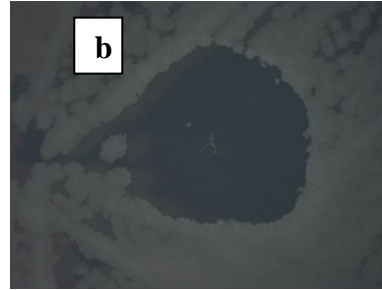
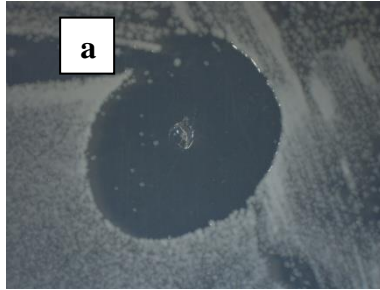
Çalışmalarda kullanılmak üzere *Calchas nordmannitürü* akrelerin elektrostimulasyon yöntemiyle ayda bir kez sağımı yapılmış ve ham venom elde edilmiştir. Yaz mevsiminde diğer mevsimlere oranla daha fazla miktarda ham venom elde edilmiştir. Ayrıca *Calchas nordmanni* 'nin ESOGU Venom Araştırma laboratuvarında bulunan diğer türlerden (*Androctonus crassicauda*, *Buthacus macrocentrus*, *Mesobuthus gibbosus*, *Leiurus abduallahbayrami*) daha az venom ürettiği belirlenmiştir. Bu türün diğer türlere kıyasla daha az venoma sahip olması boyut olarak küçük olması ve telson yapısının küçüklüğu sonucu ham venom depo kapasitesinin daha az olması ile açıklanabilir.

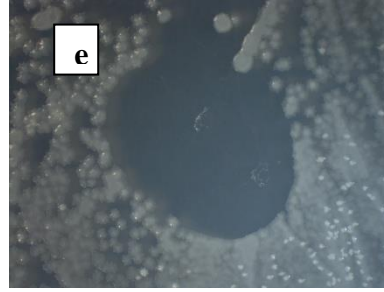
5.3 Ham Venomun Agar Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Antibakteriyal Etkinliğinin Araştırılması ve Sonuçları

alışmalar için stok olarak saklanmış olan *C. nordmanni* ham venomdan 400 µg alınarak 100 µl distile su içerisinde çözülmüş ve agar difüzyon yöntemi ile antibakteriyal aktivite saptamak için kullanılmıştır. Çalışma için seçilen 8 bakteri (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* NRLL B-123, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* NRRLB-3711, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* NCIB 196)'nin her biri için farklı petriler ve bunların birer paralelleri hazırlanmış ve ekimleri yapılmıştır. Ekimi yapılan petrilerin üzerine her 5µl'ye yaklaşık 20 µg ham venom gelecek şekilde hazırlanmış olan venomlar eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ekilerek venom damlatılan petrilerde ve bunların paralellerinde inhibisyon zonu gözlenmezken; *Bacillus cereus* NRRLB-3711, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* NRLL B-123, *Bacillus subtilis* ve *Micrococcus luteus* NCIB 196 petrilerinde ve bunların paralellerinde inhibisyon zonları net bir şekilde gözlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösteren ham venomlar ve bunlarının ortalama inhibisyon zon çapları izelge 5.1'de, binoküler mikroskop yardımı ile çekilen fotoğrafları ise Şekil 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Antibakteriyal aktivite gösteren ham venomun meydana getirdiği ve inhibisyon zonu çapları.

Bakteri türü	Ortalama inhibisyon zonu çapları
<i>B. cereus</i> NRRLB-3711	8 mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7 mm
<i>B. subtilis</i>	4 mm
<i>M. luteus</i> NCIB 196	7 mm
<i>P. vulgaris</i> NRLL B-123	8 mm
<i>S. typhimurium</i>	İnhibisyon yok
<i>K. pneumoniae</i>	İnhibisyon yok
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	İnhibisyon yok

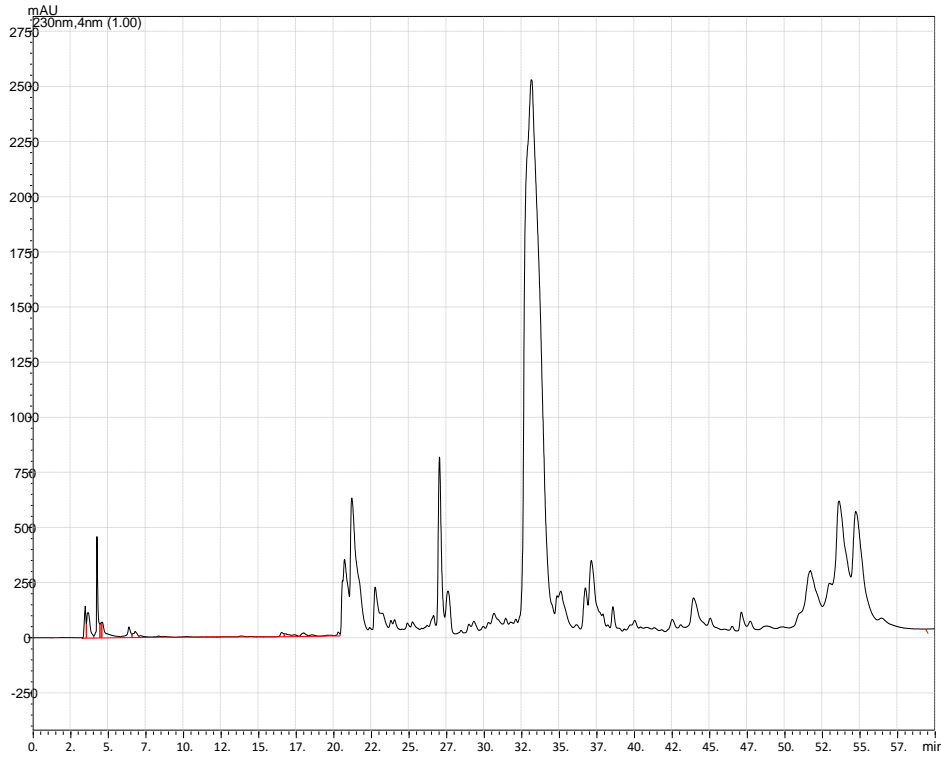




Şekil 5.2. C. nordmanniham venomunun çeşitli test bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisi **a)**B. cereus, **b)**P. aeruginosa, **c)** B. subtilis, **d)**M. luteus, **e)** P. vulgaris.

5.4 Ham Venomun HPLC’de Saflaştırılması ve Agar Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Belirlenen Antibakteriyal Aktivite Sonuçları

Saflaştırma çalışmasında kullanılmak üzere 1 mg tartılan ham venom, 200 µl tampon A içerisinde çözülerek HPLC’ye yüklenmiş ve ters faz sistemi kullanılarak ayırımlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 60 dakika süresince, 0-60 %B tampon çözeltisi olacak şekilde gradient faz uygulanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında HPLC’de ayırımı gerçekleştirilen her 1 dakikalık fraksiyon farklı mikrosantrifüj tüplere alınarak toplamda 60 farklı fraksiyon elde edilmiş ve antibakteriyal etki çalışmalarında kullanılmıştır. Ham venoma ait kromatogram Şekil 5.3 ile aşağıda verilmiştir.

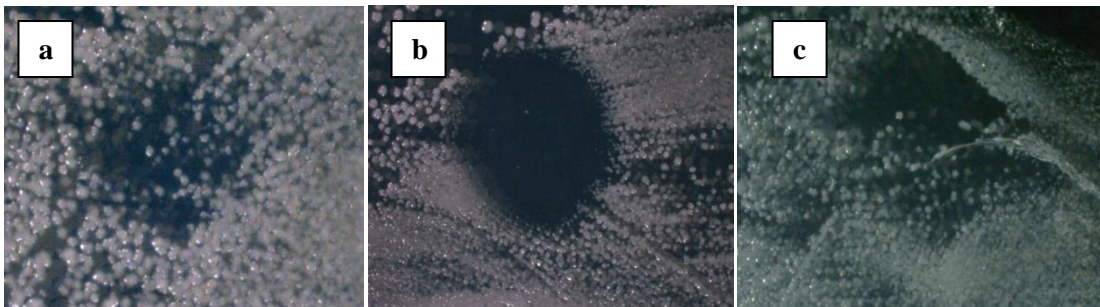


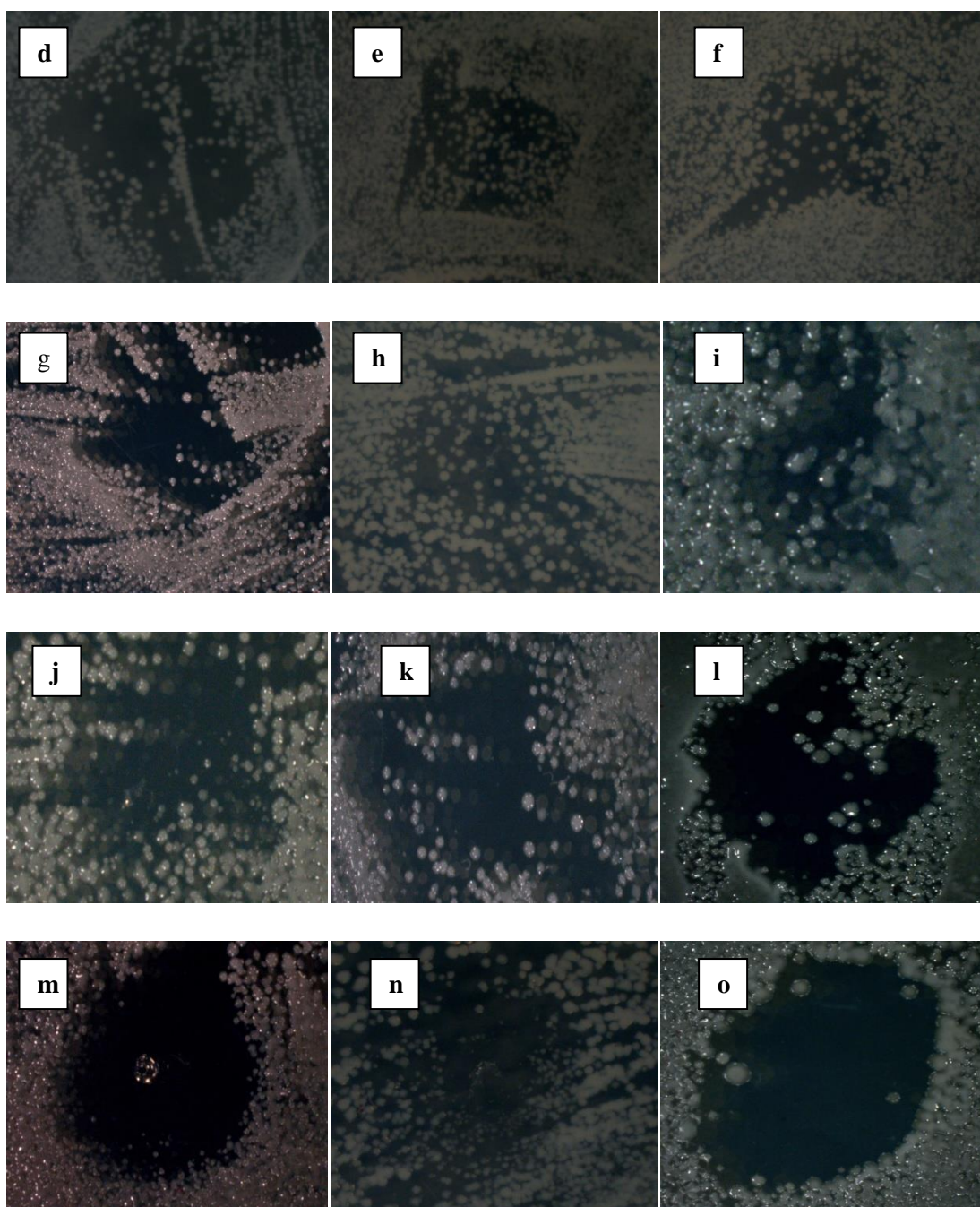
Şekil 5.3. *C. nordmanni* ham venomuna ait 1'er dakika aralıklarla fraksiyonlanan yürüyüşün 230 nm'deki kromatogramı (0-60 %B).

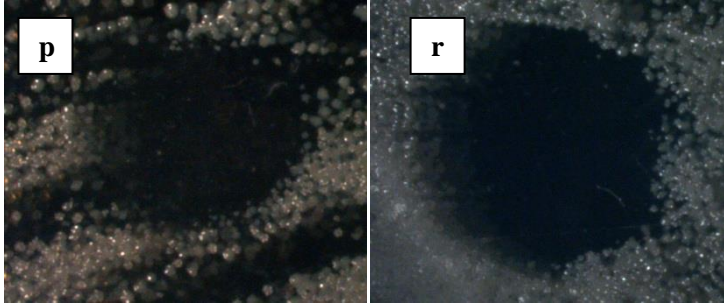
HPLC'de birer dakika aralıklar ile fraksiyonlanan yürüyüşlerden elde edilen 60 örnek için, *B. cereus* NRRL B-3711 ve *P. vulgaris* NRLL B-123 bakterileri üzerinde agar difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyal aktivite çalışmaları yapılmıştır. 60 farklı tüp içerisinde bulunan peptidler 20 µl distile su içerisinde çözülmüş ve alt bölüm 4.2.6.1. ile verilen yönteme göre hazırlanan petri yüzeylerine 5 µl olacak şekilde eş zamanlı olarak uygulanmıştır (Corzo, et al., 2001). Venom peptidlerinin bakteriler ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda; *B. cereus* NRRL B-3711 üzerinde 4, 7, 12, 17, 21, 25, 34, 37, 39, 46, 51, 52, 55, 56, 57 ve 58; *K. P. vulgaris* NRLL B-123 üzerinde 8, 11, 12, 14, 16, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 36, 39, 41, 48, 53 ve 54. dakika fraksiyonlarında inhibisyon zonları gözlemlenmiş ve binoküler mikroskopunda görüntülenmiştir. Etki görülen dakika fraksiyonları ve tekrarlarından elde edilen ortalama inhibisyon zonu çapları Çizelge 5.2'de, görüntüleri ise Şekil 5.4 ve 5.5,'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2. *B. cereus* NRRL B-3711 üzerinde antibakteriyal etki gösteren dakika fraksiyonları ve ortalama inhibisyon zonu çapları.

Bakteri Türü	
<i>B. cereus</i> NRRL B-3711	
HPLC Dakika Fraksiyon No	Ortalama inhibisyon zon çapı
(dk)	(mm)
4	5
7	7
12	6
17	6
21	9
24	9
25	9
34	5
37	4
39	6
46	10
51	10
52	7
55	5
56	12
57	5
58	6





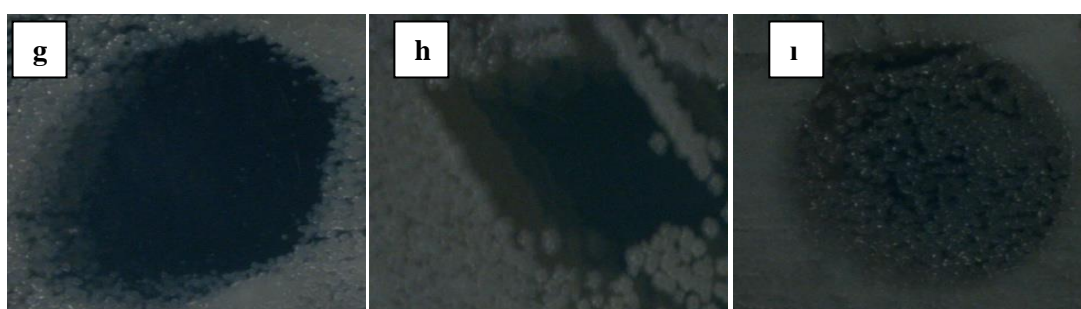
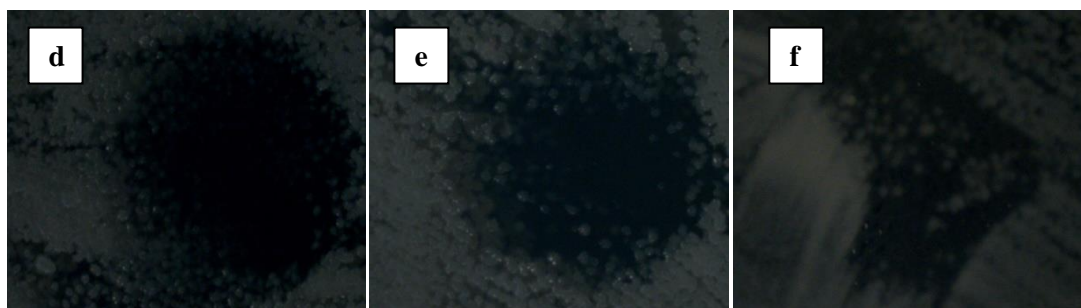
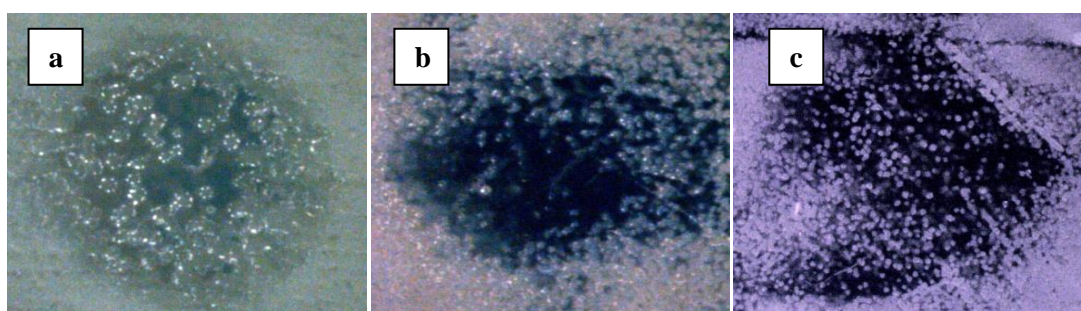


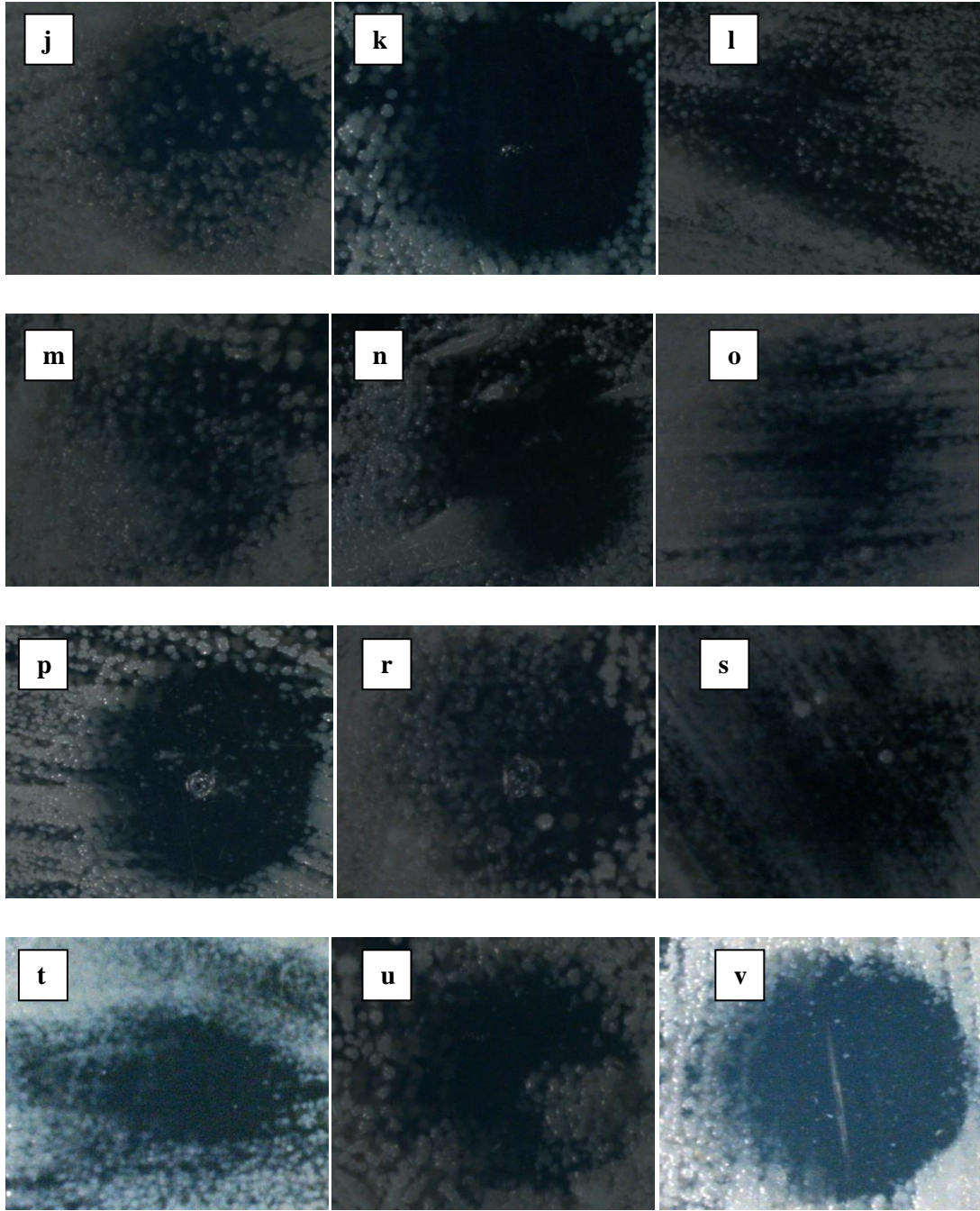
Şekil 5.4. *B.cereus* NRRL B-3711 üzerinde etkili dakika fraksiyonlarının (df) binoküler mikroskopunda görüntülenen inhibisyon zonları, **sa**) 4.df, **b)** 7.df, **c)** 12.df, **d)** 17.df, **e)** 21.df, **f)** 24.df, **g)** 25.df, **h)** 34. df, **i)** 37. df, **j)** 39. df, **k)** 46. df, **l)** 51. df, **m)** 52. df, **n)** 55. df, **o)** 56. df, **p)** 57. df, **r)** 58. df.

Çizelge 5.3. *P. vulgaris* NRLL B-123 üzerinde antibakteriyal etki gösteren dakika fraksiyonları ve ortalama inhibisyon zonu çapları.

Bakteri Türü	
<i>P. vulgaris</i> NRLL B-123	
HPLC Dakika Fraksiyon No	Ortalama inhibisyon zonu çapı (mm)
8	5
11	5
12	6
14	6
16	6
19	5
20	7
21	5
23	6
24	5
25	7
27	5

28	6
29	6
31	6
32	7
36	5
39	4
41	5
48	5
53	3
54	6





Şekil 5.5. *P. vulgaris* NRLL B-3711 üzerinde etkili dakika fraksiyonlarının (df) binoküler mikroskopunda görüntülenen inhibisyon zonları, **a)** 8. df, **b)** 11. df, **c)** 12. df, **d)** 14. df, **e)** 16. df, **f)** 19. df, **g)** 20. df, **h)** 21. df, **i)** 23. df, **j)** 24. df, **k)** 25. df, **l)** 27. df, **m)** 28. df, **n)** 29. df, **o)** 31. df, **p)** 32. df, **r)** 36. df, **s)** 39. df, **t)** 41. df, **u)** 48. df, **v)** 54. df.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda daha sonraki çalışmalar için *B. cereus* NRLL B-3711 seçilmiş ve yeni deneyler bu bakteri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birer

dakika aralıklarla fraksiyonlanan venom peptidleri ile yapılan çalışmalarda, etki görülen dakika fraksiyonlarını tek tek elde etmek amacıyla yeniden HPLC’de saflaştırma yapılmıştır. Kromatogram yine aynı koşullarda (0-60 %B) yürütülmüş ancak bu defa her bir pik alıkonma sürelerine göre farklı mikrosantrifüj tüplere alınmıştır. *B. cereus* NRRL B-3711 üzerinde 21, 24, 25, 34,51 52, 55 ve 56. dakika fraksiyonlarında belirlenen etkilerden yola çıkarak 288 ID kodlu yürüyüşe ait kromatogramın bu aralıklarda bulunan piklerinin protein miktarları ölçülmüş ve yeni bir antibakteriyal aktivite deneyi için hazırlanmıştır. Alıkonma sürelerine göre toplanan peptidlerin protein miktarları Çizelge 5.4 ile verilmiştir.

Çizelge 5.4. HPLC’de 288 numaralı kromatogramda fraksiyonlanan piklerin alıkonma süreleri ve protein miktarları

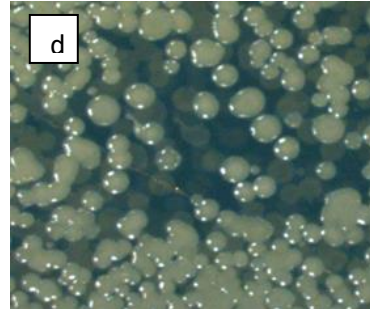
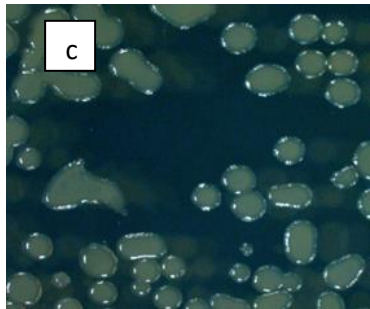
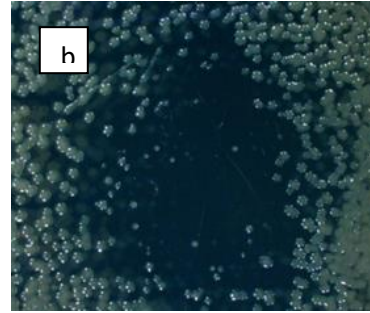
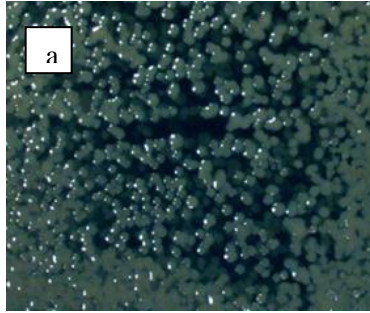
288 ID	
Alıkonma süresi (dk)	Protein miktarı
20.8	24,5 µg/100µl
21.3	63,2 µg/100µl
22.8	20,1 µg/100µl
32.9	305,2 µg/100µl
33.2	722,3 µg/100µl
51.8	57,4 µg/100µl
53.0	27,7 µg/100µl
53.7	153,2 µg/100µl
54.8	134,s1 µg/100µl

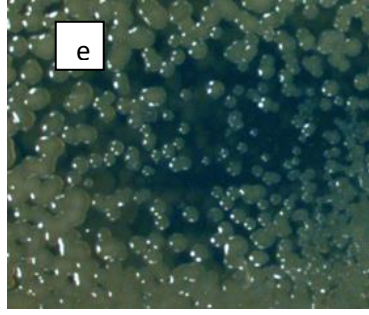
Protein miktarları belirlenen farklı alıkonma süreli peptidler, her 5 µl distile su içerisine 20 µg peptid gelecek şekilde ayarlanmıştır. Örnekler, 4.2.5.1. belirtilen

yönteme göre hazırlanan petri yüzeylerine eş zamanlı olarak uygulanmış ve 35°C’de 24saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 20.8, 21.3, 32.9, 33.2 ve 51.8 dakika alıkonma sürelerinde gelen peptidlerde inhibisyon zonları görülmüştür. *B. cereus* NRRL B-3711’ye karşı antibakteriyal etki gösteren peptidlerin alıkonma süreleri ve belirlenen inhibisyon zonu çapları Çizelge 5.5 ile, binoküler mikroskobu görüntüleri Şekil 5.6 ile verilmiştir.

Çizelge 5.5. *B.cereus* üzerinde antibakteriyal etkinliği belirlenen piklerin alıkonma süreleri ve ortalama inhibisyon zonu çapları.

Alıkonma süresi (dk)	Ortalama inhibisyon zonu çapı (mm)
20.8	6
21.3	12
32.9	5
33.2	5
51.8	9



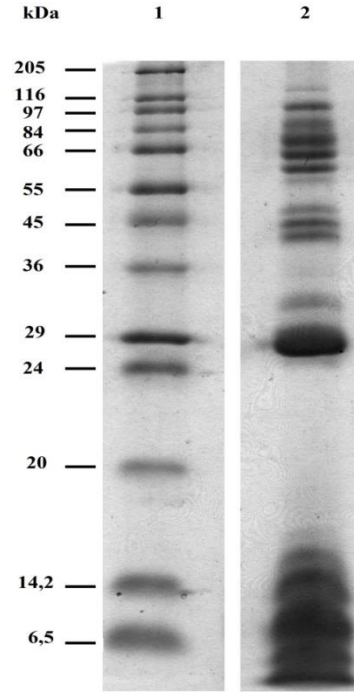


Şekil 5.6. *B. cereus* üzerinde farklı alıkonma sürelerine sahip peptidlerin meydana getirdiği inhibisyon zonlarının binoküler görüntüleri, **a)** 20.8. dakika, **b)** 21.3. dakika, **c)** 32.9. dakika, **d)** 33.2. dakika, **e)** 51.8. dakika.

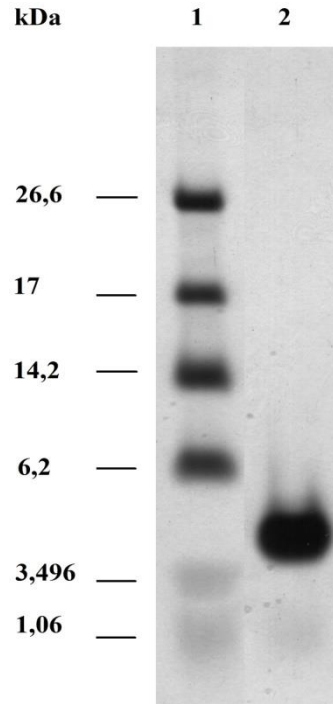
5.5. Ham Venomun ve Antibakteriyal Peptidin SDS-PAGE’de Molekül Ağırlığının Belirlenmesi ve Sonuçları

Ham venomdan 20 µg SDS-PAGE jeline yüklenmiştir ve Şekil 5.7 ile gösterilen jel görüntüsü elde edilmiştir.

Agar difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyal aktivite çalışmalarında inhibisyon zonu gözlenen 21.3, 32.9 ve 33.2 dakika alıkonma sürelerine sahip peptidlerden 21.3 dakika alıkonma süresine sahip olan peptidin 20 µg miktarının SDS-PAGE jeline yüklenmesi sonucunda peptid görülememiştir. Bunun üzerine bu peptidin daha düşük molekül ağırlığına sahip olabileceği düşünülmüş ve Trici-Tricine jel elektroforezi kullanılmış ve Şekil 5.8 ile gösterilen jel görüntüsü elde edilmiştir. Markır ile birlikte yürütülen peptidin molekül ağırlığının 3,5 kDa ile 6,2 kDa arasında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.7.C. nordmanni ham venomunun(2) ve molekül ağırlık markırının (1) SDS-PAGE jel görüntüsü.



Şekil 5.8.C. nordmanni ham venomunun HPLC ayırımı sonrasında, 21.3 dakika alıkonma süreli peptidinin (2)ve molekül ağırlığı markırının (1) Trici-Tricine jel görüntüsü.

BÖLÜM 6

TARTIŞMA

Akrepler, 1982 türle ve 420 milyon yıllık geçmişleriyle yeryüzündeki en eski hayvan gruplarından biridir. Eklembacaklılar sınıfına aittirler. Karbonifer Devri'nin sonunda (yaklaşık 300 milyon yıl önce) ortaya çıkan akrepler modern akrep nesli olarak adlandırılır. Bu nesilden gelen akrepler günümüze kadar çok az değişikliğe uğramaları nedeniyle yaşayan fosiller olarak bilinirler (Yağmur, 2011; Rein, 2012). Akrepler genellikle tropikal ve subtropikal iklim kuşaklarında yaygındır ve Yeni Zellanda dışında tüm dünyada yayılış gösterirler. Calchas nordmanni türü akrepler ise yakın zamana kadar Artvin-Erzurum yöresinde endemik olarak bilinmekteydi. Son zamanlarda C.nordmanni ile ilgili yapılan çalışmalarla Antalya, Artvin, Diyarbakır, Bilecik, Siirt, Şanlıurfa ve kıyılarımıza yakın yer alan iki Yunan adasında (Meis ve Sisam)'da dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Vachon, 1971, Kinzelbach, 1980; Sissom, 1987; Kovářik, 1996; Fet ve Braunwalder, 2000). Ayrıca Fet ve Braunwalder (2000)deki yayılış haritasında Antakya, Malatya, Halfeti (Şanlıurfa) ve Nemrut Dağı (Adıyaman)'da da yayıldığı belirtilmiştir. Gerçekleştirilen arazi çalışmalarında C.nordmanni türü akrepler Trabzon ilinin Esiroğlu ilçesinden toplanarak yeni bir lokalite bildirilmiştir. Ayrıca Maçka ilçesinde de aynı tür akreplerin varlığı tesbit edilmiştir. Yağmur (2005) çalışmalarında incelenen tüm örneklerin taş altından toplandığını bildirmiştir. Yaptığımız arazi çalışmalarında taş altları dışında bahçe ve ev duvarlarından da C.nordmanni türü akrepler toplanmıştır. C.nordmanni türü akreplerin literatürde yalnızca sistematikteki yerleri hakkında bilgi bulunurken, ham venom ve bileşenlerinin biyolojik ve farmakolojik etki çalışmaları ile ilgili bilgi bulunmamaktadır.

ESOGÜ Venom Araştırma Laboratuvarı'nda araziden toplanan akreplerin elektrostümlatör yardımıyla sağımı gerçekleştirilmiş ve elde edilen ham venomlar hücresel atık ve mukuslardan arındırılmıştır. Peptid miktarının belirlenmesi için

NanoDrop spektrofotometre ile 280 nm absorbans da ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda her sağılan akrep başına ortalama 0.23 mg peptid elde edilmiştir. Candido ve Lucas (2004) *Tityus serrulatus* türü akreplerle yaptıkları çalışmalarında her sağılan akrep başına ortalama 0.4 mg peptid elde etmişlerdir. Bu türe kıyasla *C. nordmanni*'nin venom veriminin daha düşük olmasının sebebi telson yapısının daha küçük olması ve bu nedenle venom depolama kapasitesinin daha az olması ile açıklanabilir.

Bu çalışmada elde edilen ham venomun klinik açıdan önemi olan toplam 8 farklı bakteri üzerinde antibakteriyal etkisi araştırılmıştır. Ham venomun seçici olarak Gram negatif *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* NRLL B-123 ve Gram-pozitif *B. cereus* NRRL B-3711, *B. subtilis* NCIB 3610, *M. luteus* NCIB 196 üzerinde antibakteriyal etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmaların devamı için bu bakterilerden inhibisyon zon çapı en geniş olan Gram-pozitif *B. cereus* NRRL B-3711 ve Gram negatif *P. aeruginosa* ATCC 27853 seçilmiştir. Ham venomun HPLC'de birer dakika aralıklarla 60 dakika süresince fraksiyonlarına ayrılması sonrasında gerçekleştirilen agar difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçları değerlendirdiğimizde 12., 21., 24., 25., ve 39. dakika fraksiyonlarının iki bakteri üzerinde de etkin olduğu görülmüştür. 12. dakika fraksiyonunun her iki inhibisyon zon çapının ortalama 5 mm olduğu belirlenmiştir. Ancak 21., 24., 25., ve 39. dakika fraksiyonlarının Gram-pozitif *B. cereus* NRRL B-3711 üzerinde inhibisyon zon çapının daha geniş olduğu belirlenmiştir. *Pandinus imperator*'dan izole edilen antibakteriyal etkili peptidler Pandinin1 ve Pandinin2, Gram pozitif türlerde , Gram negatif türlere oranla daha etkilidir (Corzo, et al., 2001). Bu etkinlik Gram pozitif bakterilerin, Gram negatif bakterilere oranla sitolitik antimikrobiyallere karşı daha az dayanıklı olması olarak açıklanabilir. Ancak, 12. dakikada böyle bir ayırımın görülmemesi fraksiyon içerisindeki peptid ya da peptidlerin güçlü bir sitolitik etki göstermesi olarak yorumlanabilir. Sonuçlar bölümünde belirtildiği gibi diğer pek çok fraksiyonun (Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3) seçici olarak belirlenen iki bakteri üzerinde etkinliği belirlenmiştir. Ancak, özellikle 21, 24 ve 25 dakikalarda fraksiyonlanan peptidlerin geniş bir inhibisyon zonuna sahip olmaları nedeniyle ileri çalışmalarda bu fraksiyonlar için ham venom yeniden HPLC'de

saflaştırılmış, ancak bu kez fraksiyonlar dakika yerine herbir pike ait olacak şekilde alıkonma sürelerine göre toplanmıştır.

Antibakteriyal etkiden sorumlu peptidin belirlenmesi amacı ile çalışmalara *B. cereus* NRRL B-3711 ile devam edilmiştir. Bu kapsamda bu tür üzerinde etkisi belirlenen dakikalar ve çevrelerindeki pikler yeniden fraksiyonlanarak antibakteriyal etkinliği araştırılmıştır. 20.8 ve 51.8 dakika alıkonma sürelerine sahip olan peptidlerde belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmiş ancak bakterilerin berrak zon üzerinde yeniden ürediği belirlenmiştir. Buna karşın, 21.3, 32.9 ve 33.2 dakika alıkonma süreli fraksiyonlarda belirgin ve berrak bir zon gözlenmiştir. Çalışmaların ilerleyen aşamalarında kullanılmak üzere antibakteriyal etkili fraksiyonlardan inhibisyon zonu çapı en büyük olan 21.3 dakika alıkonma süreli peptid seçilmiştir.

Akrep venomları çok çeşitli biyolojik aktif bileşenler içerirler. Bunların içinde 3-9 kDa molekül ağırlığındaki nörotoksinlerin büyük önemi vardır. Nörotoksinler tanımlama, saflaştırma ve voltaj kapılı iyon kanallarının fonksiyonel karakterizasyonunda paha biçilemez ajanlardır. Bu toksinlerin pek çok sınıfının iyon kanalları ve reseptörlerinin yapı-fonksiyon ilişkileri çalışmalarında mükemmel ligandlar olduğu gösterilmiştir. Uyarıcı toksinler sodyum kanallarına etkisi nedeniyle ve pek çoğunun özel insektisit olarak kullanılabilir olması nedeniyle önemlidir (Zhijian, et al., 2006). Akrep toksinleri molekül ağırlığına göre sınıflandırıldığında K^+ kanal toksinlerinin 20-70 aminoasit uzunluğunda ve molekül ağırlığının 3-5 kDa aralığında, Na^+ kanal toksinlerinin ise 60-76 aminoasit uzunluğunda ve 6,5-8,5 kDa aralığında olduğu bilinmektedir (Possani and Rodriguez de la Vega, 2006). Bu nedenle *C. nordmanni* ham venomunda bulunan antibakteriyal etkili 21.3 dakika alıkonma süreli fraksiyon Trici-Tricine jel sisteminde molekül ağırlık markırı ile yürütülmüştür. Trici-Tricine jel sonuçları tek bir bant içermektedir ve molekül ağırlığının 3,5 kDa ile 6,2 kDa arasında olduğunu göstermektedir. Jelde tek bir bant görülmesi kütle spektrofotometresi verileri olmadan teknik olarak peptidin saflığı hakkında kesin bir bilgi vermemektedir. Ancak molekül ağırlığı peptidin K^+ kanal toksinleri ailesinden olabileceğini

göstermektedir. Ham venomun elektroforetik profil bulguları ise ham venomun içerdiği peptidlerin molekül ağırlıkları açısından 6,5 kDa'dan küçük ve 116 kDa'dan daha büyük olduğunu ortaya koymuştur

Günümüzde antibiyotiklere dirençli bakteriyal enfeksiyonların önemli halk sağlığı problemlerinden birisi olduğu bilinmektedir. Modern ilaçların tasarımı için giderek yeni ve etkin değerlere ihtiyaç duyulmaktadır. Venomlarda ilaç araştırmalarında önemli rol almakta ve yüksek seçicilikteki özgüllükleri nedeni ile günümüzde keşfedilen yeni farmakolojik aktif moleküller arasında yer almaktadırlar. Bu çalışma C. nordmanni'nin ham venomun elektroforetik ve kromatografik profilini ilk kez ortaya çıkartarak, ham venom ve fraksiyonlarında antibakteriyal etkili peptidlerin varlığını gösteren başlangıç çalışmasıdır.

BÖLÜM 7

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ammar, A., Zhou, M., Wang, L., Chen, T., Walker, B., Shaw, C., 2012, Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion *Androctonus amoreuxi*: Biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog, *Peptides*, 35, 291-299.
- Bals, R., 2000, Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection, *Respir Res*, 1, 141-150.
- Batista, C.V., Gomez-Lagunas, F., Lucas, S., Possani, L.D., 2000, Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the First Member of a New Subfamily of Scorpion Toxin That Blocks K⁺ channels, *FEBS Letters*. 486, 117-120.
- Bosmans, F., and Tytgat, J., 2007, Voltage-Gated Sodium Channel Modulation by Scorpion A-Toxins, *Toxicon*, 49, 142-158.
- Brogden, K.A., 2005, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 238–250.
- Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Batista, C.V.F., Zamudio, F.Z., Coronas, F.I., Possani L.D., 2012, Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: General characterization of the venom and description of Bu1, a potent mammalian Na⁺ channel α -toxin, *Toxicon* 59, 408–415.
- Cynthia, A., Hernández-Aponte, Silva-Sanchez., J., Quintero-Hernández, V., Rodríguez-Romero, A., Balderas, C., Possani, L.D., Gurrola, G.B, 2011, Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*, *Toxicon*, 57, 84–92.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Chuang, R.S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., Swartz, K.J., 1998, Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin, *Nat. Neurosci.*, 1, 668–674.
- Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A., and Hoffmann, J., 1993, Purification and Characterization of A Scorpion Defensin, a 4 kDa Antibacterial Peptide Presenting Structural Similarities With Insect Defensins And Scorpion Toxins, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 194, 17-22.
- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D., 2000, Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom, *FEBS Lett.*, 471, 165–168.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K.J., He, W., Norton, R.S., and Nakajima, T., 2001, Characterization of Unique Amphipathic Antimicrobial Peptides From Venom of The Scorpion *Pandinus imperator*, *Biochemical Journal*, 359, 35-45.
- Çalışkan, F., 2002, *Androctonus crassicauda* Türü Akrep Venomunun Biyolojik Etkinliğinin Araştırılması Üzerine Ön Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73s.
- Dai, L., Yasuda, A., Naoki H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2001, IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286, 820–825.
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2002, Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 1514–1522.
- Demirsoy, A., 1999, Yaşamın Temel Kuralları II/1 (Omurgasızlar = Invertebrata) – Böcekler Dışında–, Meteksan, Beytepe, Ankara, 734-741.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Diaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J.D., Sherman, N.E., Fox, J.W., 2009, Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na permeability changes, *Toxicon*, 54, 802–817.
- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeb, M., Rochat, H., Allen, P.D., Pessah, I.N., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2000, Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca²⁺release channel/ryanodine receptors, *FEBS Lett.*, 469, 179–185.
- Fet, V. and Braunwalder, M.E., 2000a, The scorpions (Arachnida: Scorpiones) of the Aegean area: current problems in taxonomy and biogeography, *Belg. J. Zool.*, 130 (Suppl 1), 17-22.
- Gopalakrishnakone, P., Cheah, J. And Gwee, M.C.E., 1995, Black Scorpion (*Heterometrus Longimanus*) As A Laboratory Animal Maintenance of Colony of Scorpion For Milking of Venom For Research, Using A Restraining Device, *Laboratory Animals*, 29, 456-458.
- Goudet, C., Chi, C.W., Tytgat, J., 2002, An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch, *Toxicon*, 40, 1239–1258.
- Götze, S. and Saborowski, R., 2011, NanoDrop fluorometry adopted for microassays of proteasomal enzyme activities, *Analytical Biochemistry*, 413, 203–205.
- Gwee, M.C.E., Nirthanan, S., Khoo, H., Gopalakrishnakone, P., Kini, R.M., Cheah, L., 2002, Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 29, 795 –801.
- Inceoglu, B., Lango, J., Jing, J., Chen, L., Doymaz, F., Pessah, I.N., 2003, One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* as an alternative type of venom with distinct mechanism of action, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 922-927.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Jover, E., Couraud, F., Rochat, H., 1980, Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1607–1614.
- Karataş, A., 2001, Doğu Akdeniz Akrep (Scorpiones) Faunası, Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 93s.
- Karatas, A., Caliskan, F., Caliskan, H., Sirin, U., and Karatas, A., 2005, The scorpion fauna of Turkey, 7, International meeting of experts on envenomation from poisonous animals, March, Cuernavaca, Mexico, 119 p.
- Kılıç, M., 2010, antimikrobiyal peptidler ve glutatyon-s-transferaz izozimlerinin *Tinea versicolor*, *Tinea inguinalis*, *Tinea pedis*, *Tinea corporis* ve candidal intertrigo infeksiyonlarındaki ekspresyonları, Doktora tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 58 s.
- Kobayashi, M., Hattori, S., Daduang, S., 2007, Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom, *Toxicon*, 49, 19–29.
- Koch, C.L., 1850, Scorpionen. In: Uebersicht des Arachnidensystems, J. L. Lotzbeck, Nurnberg, 5, 86-92.
- Kovařík, F., 2009, Illustrated catalog of scorpions. Part I. Introductory remarks; keys to families and genera; subfamily Scorpioninae with keys to *Heterometrus* and *Pandinus* species, Clairon Production, Prague, 170 p.
- Kozlov, S., Lipkin, A., Nosyreva, E., Blake, A., Windass, J.D., Grishin, E., 2000, Purification and cDNA Cloning of an Insecticidal Protein from the Venom of the Scorpion *Orthochirus scrobiculosus*, *Toxicon*, 38, 361-371.
- Latreille, P.A., 1802, Histoire naturelle générale et particulière des Crustacés et des insectes. Tome 3. Familles naturelles des genres. Paris: F. Dufart, xii + 467 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Linnaeus, C., 1758, *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*, Laurentii Salvii, Holmiae (Stockholm), 824 p.
- Lourenço, W. R., 2000, Reproduction in scorpions, with special reference to parthenogenesis, *European Arachnology*, p 71-85.
- Lourenço, W.R., Andrzejewski, V. and Cloudsley-Thompson, J. L., 2003, The life history of *Chactas reticulatus* Kraepelin, 1912 (Scorpiones, Chactidae), with a comparative analysis of the reproductive traits of three scorpion lineages in relation to habitat, *Zool. Anz.*, 242, 63-74.
- Lourenço, W.R., 2012, Fluorescence in scorpions under UV light; can chaerilids be a possible exception?, *Comptes Rendus Biologies*, 335, 731-734.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Eldere, J.V., Walt, J. and Verdonck, F., 2002, Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from Southern Africa, *European Journal of Biology*, 269, 4799-4810.
- NCCLS, 2003., Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 8th ed. NCCLS document M2-A8. NCCLS, Wayne, Pa.
- Nenilin, A. V. and Fet, V., 1992, Zoogeographical analysis of the world scorpion fauna (Arachnida, Scorpiones), *Arthropoda Selecta*, 1(2), 3-31.
- Nie, Y., Zeng, X.C., Yang, Y., Luo, F., Luo, X., Wu, S., Zhang, L., Zhou, J., 2012, A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*, *Peptides*, 38, 389-394.
- Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J.S., Sato, K., Tytgat, J., 2005, Assignment of Voltage-Gated Potassium Channel Blocking Activity To Kappa-Ktx1.3, A Non-Toxic Homologue of Kappahefutoxin-1, From *Heterometrus spinifer* venom, *Biochem. Pharmacol.*, 69, 669-678.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Ozkan, O. and Karaer, Z., 2003, The scorpions in Turkey, Turk Bull. Hyg. Exp. Biol., 60(1),55-62.
- Özkan, Ö. ve Karaer, K. Z., 2004, Akrelerin Vücut Yapıları, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 28(1), 54-58.
- Özkan, Ö. ve Karaer, K. Z., 2007, Akrelerin Biyolojisi, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 64, 1, 51-60.
- Plessis, L.H., Elgar, D. and Plessis, J.L., 2008, Southern African scorpion toxins: An overview, Toxicon, 51, 1-9.
- Possani, L.D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B., 2000, Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels, Biochimie 82, 861-868.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999a, Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. Eur. J. Biochem., 264, 287-300.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, J., 1982, The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, Carlsberg Res. Commun., 285-289.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Garcia, B.I., D'Ambrosio, C., Diego-García, E., Scaloni, A., Possani, L.D., 2004, Antimicrobial peptide induction in the haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. Cell. Mol. Life Sci., 61, 1507-1519.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2010, Mining On Scorpion Venom Biodiversity, Toxicon, 56, 1155-1161.
- Ruh, E., 2012, Bazı antimikrobiyal peptidlerin *Plasmodium falciparum* karşı etkinliğinin vitro olarak saptanması, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 119 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Salman, S., 2006, Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi, Palme Yayınları., 501 s.
- Schägger, H., and G. von Jagow, 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa., *Analytical Biochemistry*, 66, 368-379.
- Stachel, S., Stockwell, S.A. and Vrankken, D.L.V., 1999, The fluorescence of scorpions and cataractogenesis, *Chemistry and Biology*, 6, 531-539.
- Stahnke, H.L., 1972, UV light, a useful field tool, *Bioscience*, 22, 604-607.
- Tallarovic, S. K., Melville, J. M. and Brownell, P. H., 2000, Courtship and mating in the giant hairy desert scorpion, *Hadrurus arizonensis* (Scorpionida, Iuridae), *Journal of Insect Behavior*, 13 (6), 1-12.
- Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F.Z. and Possani, L. D., 2000, Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*, *European Journal of Biochemistry*, 267, 5023-5031.
- Torres, A.F.C., Dantas, R.T., Toyama, M.H., Filho, E.D., Zara, F.J., Rodrigues de Queiroz, M.G., Pinto, N.A.N., Rosa de Oliveira, M., Daniela de Oliveira Toyama., Monteiro, H.S.A., Martins, A.M.C., 2009, Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase, *Toxicon*, 1-10.
- Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin- Eaucloire, M.F., Van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1999, A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies, *Trends Pharmacol. Sci.*, 20, 444-447.
- Tytgat, J., Debont, T., Rostoll, K., Muller, G.J., Verdonck, F., Daenens, P., Van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1998, Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. *FEBS Lett.*, 441, 387-391.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Uawonggul, N., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Arkaravichien, T., Bunyatratkata, W., Ruangjirachuporn, W., Jeerranaiprepame, P., Nakamura, T., Matsuda, M.,
- Valdivia, H.H. and Possani, L.D., 1998, Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function, *TCM*, 8, 111–118.
- Wang, W., Ji, Y., 2005, Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vitro and inhibits glioma tumor growth in vivo, *Journal of Neuro-Oncology*, 73, 1-7.
- Wang, C.G., He, X.L., Shao, F., Liu, W., Ling M.L., Wang, D.C., Chi, C.W., 2001, Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensii karsch*, *European Journal of Biochemistry*, 268, 2480-2485.
- Yağmur, E.A., 2005, Gaziantep Akrepleri (Ordo: Scorpiones) ve Zoocoğrafik Dağılımları, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 136 s.
- Yağmur, E.A., 2011, Güneydoğu Anadolu Akrep (Arachnida: Scorpiones) Faunası: Sistematığı ve Zoocoğrafyası, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 220 s.
- Yuan, W., Cao, L., Ma, Y., Mao, P., Wang, W., Zhao, R., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2010, Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene STCT 1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*, *Peptides*, 31, 22-26.
- Xiong, Y., Lan, Z., Wang, M., Liu, B., Liu, X., Fei, H., Xu, I., Xia, Q., Wang, C., Wang, D., and Chi, C., 1999, Molecular characterization of new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from the scorpion *Buthus martensii karsch*, *Toxicon*, 37, 1165-1180.
- Zeng, X.C., Wang, S.X., Zhu, Y., Zhu, S.Y., Li, W.X., 2004, Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii Karsch*, *Peptides*, 25, 143–150.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Zhao, Z., Ma, Y., Dai, C., Zhao, R., Li, S.R., Wu, Y., Cao, Z., Li, W., 2009, Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 3472–3477.

Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., Wenxin, L., 2006, Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification, *Toxicon*, 47, 348–355.