

Sayı : 27798170/161.1.1/42237

Konu : 111T338 numaralı proje-Sonuç Raporu

Sayın Doç. Dr. FATMA DUYGU ÖZEL DEMİRALP

Yürütücülüğünü yaptığınız 111T338 numaralı ve "Türkiye'de Yayılış Gösteren Bazı Engerek Zehirlerinin Protein Özellikleri ve Sitotoksiteleri ile Koagülasyona Etkilerinin Araştırılması ve Biyoteknolojik Kullanım Potansiyellerinin Değerlendirilmesi" başlıklı projenizin **Sonuç Raporu**, Grup Yürütme Komitemizin 27.02.2015 tarih ve 23 sayılı toplantısında görüşülmüştür. İlgili raporun kabulüne ve rapor dönemine ait Proje Teşvik İkramiyesinin ödenmesine karar verilmiştir.

Projenizin Sonuç Raporu dönemine ait Proje Teşvik İkramiyesi üniversiteniz tarafından projeniz için açılan banka hesabına transfer edilecektir. Proje Teşvik İkramiyesinin ödenebilmesi için, ödeneklerin proje hesabına transferini takiben, işbu yazı ve ekte verilen "PTİ Ödemeler Listesi" ile üniversitenizin ilgili birimine başvurmanız gerekmektedir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Dr. DİLEK CANDAN

KBAG - KİMYA, BİYOLOJİ ARAŞTIRMA DESTEK GRUBU

Grup Yürütme Komitesi Sekreteri

EK: PTİ Ödemeler Listesi (1 sayfa)

Bilgi Notu:

TÜBİTAK tarafından kabul edilebilir geçerli bir mazeret bildirilmeksizin, proje gelişme raporlarının sözleşmede belirtilen tarihlerde, proje sonuç raporlarının ise, sözleşmede belirtilen proje bitiş tarihinden itibaren 2 (iki) ay içinde gönderilmemesi halinde, ilgili rapor dönemine ait PTİ'ler ödenmeyecektir.

Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) tarafından desteklenen projelerin çıktısı, sonuç ve etkilerini nicelik ve nitelik olarak artırmak amacıyla 03/11/2012 tarihinden sonra sonuçlanan projelerin yürütücü ve araştırmacılarını ödüllendirmek için Proje Performans Ödülü (PPÖ)(ppo.tubitak.gov.tr) uygulamasına başlanmıştır. Bu uygulamaya paralel olarak proje çıktılarının değerlendirilmesi de ARDEB Proje Takip Sistemi'nden (pts.tubitak.gov.tr) yapılmaktadır. Bu kapsamda projenize ait çıktılar PTS'ye yüklenmesi önem taşımaktadır.



**Türkiye'de Yayılış Gösteren Bazı Engerek Zehirlerinin
Protein Özellikleri ve Sitotoksiteleri ile Koagülasyona
Etkilerinin Araştırılması ve Biyoteknolojik Kullanım
Potansiyellerinin Değerlendirmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 111T338

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Fatma Duygu ÖZEL DEMİRALP

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN
Prof. Dr. Leyla Zümrüt UYSAL
Doç. Dr. Mehmet Zülfü YILDIZ

Bursiyerler:

Naşit İĞCI
Selen PEKER
Hatice YILDIZHAN



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÖZET	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Toksinoloji ve "Venomiks"	1
1.2 Türler Arası ve Aynı Türün Farklı Coğrafik Popülasyonlarının Zehirleri Arasındaki Farklılıkların Belirlenmesinin Önemi	3
1.3 Proje Kapsamında Zehri İncelenen Türlerin Seçilme Nedenleri	4
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Yılan Zehirlerinin Genel Özellikleri	5
2.2 Engerek Zehirlerinin Genel Özellikleri	6
2.3 Projeye Dahil Edilen Türlerin Zehirleriyle İlgili Daha Önce Yapılan Çalışmalar	7
2.3.1 <i>Macrovipera lebetina</i>	7
2.3.2 <i>Montivipera xanthina</i>	8
2.3.3 <i>Vipera ammodytes</i>	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1 Yılanların Araziden Toplanması ve Beslenmesi	10
3.2 Zehir Sağımı ve Zehirlerin Saklanması	11
3.3 Kimyasallar ve Cihazlar	12
3.4 Protein Miktar Tayini	15
3.5 İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (2D-PAGE) ile Zehir Proteomik Profillerinin Karşılaştırılması	15
3.5.1 Birinci Boyut: İzoelektrik Odaklama	15
3.5.2 İkinci Boyut: SDS-PAGE	16
3.5.3 Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi	16
3.6 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Zehirlerin Fraksiyonlanması	17
3.7 Ters-Faz Kromatografisi ile Zehirlerin Fraksiyonlanması	17
3.8 SDS-PAGE ile Fraksiyonların Moleküler Ağırlıklarına Göre Ayrılması	17
3.9 LC-ESI-MS/MS Ardışık Kütle Spektrometresi ile De Novo Amino Asit Dizileme	18
3.9.1 Ters Faz Kromatografi ve SDS-PAGE ile Zehir Proteinlerinin İki Boyutlu Ayrımı	18
3.9.2 Protein Bantlarından Jel İçinde Sindirim ile Peptit Ekstrakte Edilmesi	18
3.9.3 Ardışık Kütle Spektrometresi ile De Novo Amino Asit Dizileme	19



3.10 Kısmi De Novo Peptit Dizileri Kullanılarak Biyoinformatik Analizle Protein Tanımlama ("Bottom-Up" Yaklaşımı)	19
3.11 Tanımlanan Proteinlerin Toplam İçeriğe Olan % Oranının Belirlenmesi	19
3.12 LC-ESI Kütle Spektrometresi ile Protein Kütle Profilinin Çıkarılması ("Top-Down" Yaklaşımı).....	20
3.13 In Vitro Sitotoksosite Testi.....	21
3.14 In Vitro Koagülasyon Testleri	21
3.15 In Vitro Platelet Agregasyonu Testleri	21
3.16 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile Zehirlerin Moleküler Karakterizasyonu	22
4. BULGULAR	23
4.1 Yılanların Araziden Toplanması	23
4.2 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Zehir Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	24
4.3 İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi (2D-PAGE) ile Zehir Protein Profillerinin Karşılaştırılması	25
4.4 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Zehirlerin Fraksiyonlanması	29
4.4.1 Jel Filtrasyon Kromatografisinin Optimizasyonu.....	29
4.4.2 Ham Zehir Proteinlerinin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Kısmi Saflaştırılması	34
4.5 Ters-Faz Kromatografisi ile Zehirlerin Fraksiyonlanması	35
4.6 SDS-PAGE ile Ters-Faz Fraksiyonlarının Moleküler Ağırlıklarına Göre Ayrılması	38
4.7 LC-ESI-MS/MS Ardışık Kütle Spektrometresi ile De Novo Amino Asit Dizileme ve Protein Tanımlama ("Bottom-Up" Yaklaşımı)	40
4.8 LC-ESI Kütle Spektrometresi ile Protein Kütle Profilinin Çıkarılması ("Top-Down" Yaklaşımı).....	46
4.9 In Vitro Sitotoksosite Testi Bulguları.....	50
4.10 In Vitro Koagülasyon Testlerinden Elde Edilen Bulgular.....	52
4.11 In Vitro Platelet Agregasyonu Testlerinden Elde Edilen Bulgular	53
4.12 FTIR ile Zehirlerin Moleküler Karakterizasyonu.....	57
4.12.1 Optimizasyon Çalışması	57
4.12.2 Zehir Örneklerinin FTIR ile Karakterize Edilmesi	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	63
5.1 Projenin İş Paketlerinin Genel Değerlendirmesi	63
5.2 Projenin Amaçları Doğrultusunda Ulaşılan Hedefler ve Çıktıları/Yaygın Etkisi	66
5.2.1 Üç Engerek Türünün Zehir İçerik Varyasyonlarının Belirlenmesi	66
5.2.2 Kütle Spektrometresi ile Protein Tanımlama.....	67
5.2.3 FTIR ile Zehir Moleküler Karakterizasyonu	68



5.2.4 Sitotoksosite Testleri	68
5.2.5 Kromatografi ile Zehir Örneklerinin Fraksiyonlanması	69
5.2.6 Kan Pıhtılaşması ve Platelet Agregasyonu Çalışmaları	69
5.2.7 Proje Çıktıları.....	70
5.3 Engerek Türlerinin Araziden Bulunması ve Tür Teşhisleri.....	70
5.4 Jel Tabanlı Protein Profillerinin Değerlendirilmesi: SDS-PAGE ve 2D-PAGE.....	71
5.5 Kütle Spektrometresi Tabanlı Zehir Proteomu Karakterizasyonu	72
5.5.1 <i>De Novo</i> Amino Asit Dizileme Tabanlı Protein Tanımlama Stratejisi.....	72
5.5.2 Tanımlama Sonuçlarının Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi	74
5.5.3 <i>Macrovipera lebetina obtusa</i> Zehrinden Tanımlanan Proteinler	76
5.5.4 <i>Montivipera xanthina</i> Zehrinden Tanımlanan Proteinler.....	77
5.5.5 <i>Vipera ammodytes</i> Zehrinden Tanımlanan Proteinler	78
5.6 In Vitro Sitotoksosite Bulgularının Tartışılması	79
5.7 In Vitro Koagülasyon ve Platelet Agregasyonu Testi Sonuçlarının Tartışılması.....	82
5.8 FTIR Sonuçlarının Tartışılması	84
5.9 Proje Bulgularının, İncelenen Yılan Zehirlerinin Biyoteknolojik Kullanımı Açısından İrdelenmesi.....	86
5.10 Neden Daha Fazla Türün Zehri İncelenmeli?	94
5.11 Projenin Türkiye'de Yılan Zehri Araştırmalarına Yaptığı Katkılar	95
5.12 Yılan Zehirlerinin Sistematikte Kullanım Potansiyeli	96
5.13 Öneriler.....	97
KAYNAKLAR	100



ÖZET

Doğal zehirler eski tarihlerden beri doğa bilimcilerin ve araştırmacıların ilgisini çekmiştir ve bunlar arasında en fazla araştırılan ise yılan zehirleri olmuştur. Son yıllarda peptit tabanlı ilaç geliştirme konusuna olan ilgi nedeniyle hayvansal zehirlerle ilgili araştırmaların sayısı oldukça artmıştır.

Projenin amacı, Türkiye'de yayılış gösteren tıbbi öneme sahip üç engerek türünün (*Macrovipera lebetina*, *Montivipera xanthina*, *Vipera ammodytes*) zehirlerinin proteomik ve spektroskopik yaklaşımlarla karakterize ederek farklılıkları tespit etmek, sitotoksitelerini ve koagülasyon üzerindeki etkilerini belirlemek ve biyoteknolojik kullanım potansiyellerini irdelemektir.

Bu amaçla proje kapsamında yapılan arazi çalışmalarıyla türler doğadan elde edilmiş ve bu üç türün zehri 1D-PAGE, 2D-PAGE, jel filtrasyon ve ters faz kromatografisi, kütle spektrometresi ve Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi gibi biyoanalitik teknikler ile profillenenek varyasyonları belirlenmiştir. Kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilen *de novo* amino asit dizileme tabanlı yaklaşım ile 3 türün zehirlerinin proteomik karakterizasyonları gerçekleştirilerek içerdikleri protein aileleri belirlenmiştir.

Ham zehirlerin ve seçilmiş fraksiyonların sitotoksiteleri, koagülasyon ve agregasyon üzerindeki etkileri belirlenerek yapılacak biyoaktivite rehberli karakterizasyon çalışmaları için rehber olacak sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tanımlanan proteinler ile korelasyon göstermektedir. *Macrovipera lebetina* ve *Montivipera xanthina* zehrinde belirgin olarak görülen anti-platelet aktiviteler, bu türlerin zehirlerinden patentli ürünlere dönüşecek yeni moleküllerin keşfedilme potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Proje kapsamında yapılan çalışmalar Türkiye'de ilk olma niteliğindedir ve bu alanın Türkiye'de gelişmesi için önemli bir bilgi birikimi oluşturmuştur. Projede elde edilen bilgiler ışığından gerçekleştirilecek devam projeleri ile aktif peptit ve proteinlerin saflaştırılması ve detaylı karakterizasyonları mümkün olabilecektir.

Anahtar kelimeler: Proteomiks, venomiks, yılan zehri, biyoaktivite, anti-platelet, biyoteknoloji



ABSTRACT

Natural venoms have always fascinated naturalists and researchers, and the most investigated one among them is snake venoms. Due to the great interest on peptide based drug development of late years, researches on animal venoms have significantly increased.

The aim of the project is to characterize the venom components of three medicinally important Turkish vipers by proteomic and spectroscopic methods and determine the variations, to assess their cytotoxicity and to evaluate their biotechnological usage potential with a special attention on their effects on coagulation cascade platelet aggregation.

For this purpose, vipers were found in the nature by field studies, their venoms were profiled by bioanalytical methods such as 1D-PAGE, 2D-PAGE, gel filtration and reverse phase chromatography, mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. Venom proteomes of three species included in the project were characterized and the protein families were identified by mass spectrometry based *de novo* amino acid sequencing approach.

Effects of crude venoms and selected fractions on blood coagulation and platelet aggregation, as well as their cytotoxic activity were screened, which will guide the further studies on the bioactivity guided characterization of the venom samples. Obtained bioactivity results Show correlation with the protein families identified. Detection of the significant anti-platelet activity of the venom of *Macrovipera lebetina* and *Montivipera xanthina* shows that these venoms are potential sources of novel bioactive molecules to be discovered and patented.

This project is a pioneering study in toxinology field in Turkey and has created an important knowledge for the development of this field in Turkey. In light of the information produced in this project, purification and detailed characterization of the active peptide and protein components will be possible with further studies.

Keywords: Proteomics, venomics, snake venom, bioactivity, anti-platelet, biotechnology