



T.C.
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI
Araştırma Destek Programları Başkanlığı

Sayı : 27798170/161.1.1/E.152900

07/07/2017

Konu : 114Z946 Numaralı Proje - Sonuç Raporu

Sayın Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Yürütücülüğünü yaptığınız **114Z946** numaralı ve "**Kafkas Engereği (*Vipera kaznakovi*) Zehirinin Biyolojik Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Rehberli İzolasyon Yöntemi Kullanılarak Çeşitli Kanser Hücreleri ve Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkilerinin in vitro Olarak Araştırılması**" başlıklı projenizin **Sonuç Raporu**, Grup Yürütme Kurulumuzun **23/06/2017** tarih ve **49** sayılı toplantısında görüşülmüştür. İlgili raporun kabulüne ve rapor dönemine ait Proje Teşvik İkramiyesinin (PTİ) 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. Demet DAŞKIN
KİMYA, BİYOLOJİ ARAŞTIRMA DESTEK
GRUBU
Grup Koordinatörü

Ek: PTİ Ödemeler Listesi (1 sayfa)

Bilgi Notu:

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmış ve proje yürütücüsünün (Doç. Dr. AYŞE NALBANTSOY) TÜBİTAK ARDEB PROJE TAKİP SİSTEMİ hesabına yüklenmiştir.

Evrak doğrulaması talepleri, ebys@tubitak.gov.tr adresine e-posta yoluyla yapılabilir.



- 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 Proje Teşvik İkramiyeleri (PTİ) ödenmeyecektir.
- Proje ekibi tarafından, TÜBİTAK desteği ile yürütülmekte/sonuçlandırılmış olan projeler kapsamında yapılan yayınlarda [makale, kitap, bildiri (sözlü sunum/poster sunum), tez, yayılım vb.] proje sözleşmesi ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği (AYEK) gereğince ilgili proje numarası ile birlikte TÜBİTAK desteği belirtilmelidir.
- Proje sözleşmeniz gereği, proje kapsamında yapacağınız hiçbir yayın, iş ve işlemde TÜBİTAK logosu kullanılamaz.
- 03/11/2012 tarihinden sonra sonuçlanan projelerde, projelerin yürütücü ve araştırmacılarını ödüllendirmek amacıyla Proje Performans Ödülü (PPÖ; ppo.tubitak.gov.tr) uygulamasına başlanmıştır. Bu uygulamaya paralel olarak proje çıktılarının değerlendirilmesi de ARDEB Proje Takip Sistemi (ardeb-pts.tubitak.gov.tr) üzerinden yapılmaktadır. Bu kapsamda projenize ait çıktıların PTS'ye yüklenmesi önem taşımaktadır.

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmış ve proje yürütücüsünün (Doç. Dr. AYŞE NALBANTSOY) TÜBİTAK ARDEB PROJE TAKİP SİSTEMİ hesabına yüklenmiştir.

Evrak doğrulaması talepleri, ebys@tubitak.gov.tr adresine e-posta yollanılarak yapılabilir.

Kafkas Engereği (*Vipera kaznakovi*) Zehirinin Biyolojik Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Rehberli İzolasyon Yöntemi Kullanılarak Çeşitli Kanser Hücreleri ve Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkilerinin *in vitro* Olarak Araştırılması

Program Kodu: 1001

Proje No: 114Z946

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Araştırmacılar

Prof. Dr. Bayram GÖÇMEN
Doç.Dr. Hüsniye Tansel YALÇIN

Danışman

Prof. Dr. Murat YALÇIN

Bursiyer

Uzm. Mert KARIŞ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖNSÖZ	i
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Toksinoloji ve Yılan Zehiri.....	4
2.2. Kütle Spektrometresiyle Protein Tanımlama	4
2.3. Ham Zehirin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisiyle Fraksiyonlanması.....	4
2.4. Yılan Zehirlerinin Biyoteknolojik Kullanımı	4
2.5. <i>In vitro</i> Sitotoksiste Testleri	5
2.6. CAM (Koriyoallontoik Membran) Anti-Anjiyogenez/Tümör Anti-Anjiyogenez Modeli	5
2.7. Peptit Bazlı Antimikrobiyal Keşfinin Önemi.....	6
2.8. Yılan Zehirlerinin Genel Özellikleri	6
2.9. Türkiye’de Yılan Zehiri ile Yapılan Çalışmalar	7
2.10. Kafkas Engereği, <i>V. kaznakovi</i> Nikolsky, 1909 Hakkında Taksonomi ve Dağılışı Bilgisi	9
2.11. Proje Kapsamında İncelenen <i>Vipera kaznakovi</i> (Kafkas Engereği) Zehiriyle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar	10
2.12. CAM (Koriyoallontoik Membran) Anti-Angiogenesis Modeli	10
2.13. Yılan Zehirlerinin Sitotoksik (Kanser ve normal hücrelerde), Anti-Anjiyogenik ve Antimikrobiyal Etkileri.....	11
2.14. Yılan Zehirinin Kaspaz Aktivasyonuna Etkileri.....	17
2.15. Yılan Zehirlerinin Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri	18
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Projenin planlanması, malzeme ve teçhizat alımları	20
3.2. Arazi Çalışmaları.....	20
3.3. Zehir Sağımı	20
3.4. Liyofilizasyon	21
3.5. Zehirin Fraksiyonlanması ve Saflaştırılması: Protein Analizi, HPLC İle Fraksiyonlama, LC/MS-MS/MS Uygulamaları.....	22
3.5.1. Protein Miktar Tayini	22
3.5.2. Proteomik analizler için zehir örneklerinin hazırlanması	23
3.5.3. Top-down venomiks.....	23
3.5.4. Bottom-up venomiks	24

3.6. Zehirin Fraksiyonlanması; HPLC ile Fraksiyonlama, SDS-PAGE, LC-MS/MS Uygulamaları ve Biyoinformatik Analiz.....	25
3.6.1. SDS-PAGE.....	25
3.6.2. Biyoinformatik Analizle Protein Tanımlama.....	26
3.7. Hücre kültürü, sitotoksisite çalışmaları.....	26
3.7.1. Hücre Hatları ve Kültürlerinin Devamlılığı.....	26
3.7.2. Sitotoksisite ve Hücre Canlılık Testleri.....	26
3.7.3. Morfolojik İnceleme.....	28
3.7.4. IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi ve Veri Analizi.....	28
3.8. <i>V. kaznakovi</i> Yılan Zehrinin Apoptozis Etkisinin Belirlenmesi.....	28
3.9. Aktif Kaspaz-3 Boyama Prosedürü.....	29
3.10. <i>V. kaznakovi</i> Zehrinin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi.....	29
3.11. Antimikrobiyal aktivite testleri.....	30
3.11.1. Broth Mikrodilüsyon Yöntemi (MİK Yöntemi).....	31
3.12. <i>Ex Vivo</i> Anti Anjiyogenesis ve Tümör Anjiyogenez Denemeleri.....	32
3.12.1. CAM Anti-Anjiyogenesis Testi.....	32
3.12.2. CAM kanser implante modelinde tümör gelişimine zehirin etkisi.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Arazi Çalışmaları.....	34
4.2. Liyofilizasyon.....	39
4.3. Zehirin Fraksiyonlanması ve Saflaştırılması: Protein Analizi, HPLC İle Fraksiyonlama, LC/MS ve MS/MS Uygulamaları.....	39
4.3.1. Protein Miktar Tayini.....	39
4.3.2. HPLC İle Fraksiyonlama, LC/MS ve MS/MS Uygulamaları.....	39
4.4. Hücre kültürü, sitotoksisite çalışmaları.....	46
4.4.1. Morfolojik inceleme.....	48
4.5. Hücre kültürü, sitotoksisite çalışmaları ve aktif fraksiyon.....	50
4.5.1. Morfolojik inceleme.....	51
4.6. Aneksin V/AAD Boyama ile Hücre Canlılığı ve Apoptotoik Oranın Belirlenmesi.....	52
4.7. Kaspaz Aktivasyonu ve Hücre Döngüsüne Etkisinin Belirlenmesi.....	52
4.8. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	53
4.9. <i>Ex Vivo</i> Anti Anjiyogenesis ve Tümör Anjiyogenez Denemeleri.....	55
4.9.1. CAM Anti-Anjiyogenesis Testi.....	55
4.9.2. CAM kanser implante modelinde tümör gelişimine zehrin etkisi.....	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	59
TEŞEKKÜR.....	63
6. KAYNAKLAR.....	65

ÖZET

Yılan zehiri yüz yıllardır halk arasında birçok patofizyolojik rahatsızlığın tedavisinde kullanılan, içerdiği çeşitli aktif protein bileşiklerle potansiyel terapötik değere sahip doğal bir biyolojik kaynak niteliğindedir. Yılan zehiri birçok nörotoksin, kardiyotoksin, sinir büyüme faktörü, lektinleri, disintegrinleri ve çeşitli farklı enzimi içermektedir.

Bu proje kapsamında Türkiye’de Artvin’den bilinen, zehiri güçlü olan ve bu bölgedeki ısırılma vakalarının çoğundan sorumlu, Kafkas Engereği (*Vipera kaznakovi*) zehiri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla arazide toplanan yılanlardan alınan zehir örnekleri sıvı azot içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Bireysel farklılıkları standartlaştırmak için havuz sistemiyle bir araya getirilen zehir örnekleri liyofilize edildikten sonra denemelerde kullanılmıştır. İlk olarak *V. kaznakovi* ham zehirinin protein miktarı, antimikrobiyal ve çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Daha sonra kanser hücrelerine ve mikroorganizmalara karşı yüksek aktiviteye sahip öncü peptit/protein bileşikleri izole edilmiştir. Bu amaçla biyoaktivite rehberli fraksiyonlama metodu kullanılmış ve böylece aktif bileşenler saflaştırılmıştır. Kromatografik yöntemlerle elde edilen seçilmiş fraksiyonlar antimikrobiyal ve kanser hücrelerindeki sitotoksik özellikleri yönünden taranarak en yüksek aktiviteye sahip fraksiyon/lardan aktif bileşenlerin izolasyonu yapılmıştır. Ham zehirin ve fraksiyonlarının kanser hücreleri üzerindeki apoptotik, nekrotik ve hücre döngüsü üzerine etkileri de belirlenmiştir. Ayrıca fraksiyonlar yılan zehirinin içeriğinde genel olarak yaygın bulunan ve anti-anjiyogenik özellik gösteren peptid/proteinler (disintegrinler gibi) yönünden de *ex vivo* model kullanılarak taranmıştır. Yapılan sitotoksikite testlerinde kanser hücre hatları üzerinde en yüksek aktivite gösteren peptid/proteinlerin *ex vivo* tümör anjiyogenesis modeli ile de etkinliği doğrulanmıştır. Zehir örneği, kütle spektrometresi ile protein tanımlanması öncesinde ters faz kromatografi ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Fraksiyonların SDS-PAGE’i yapılarak saflıkları kontrol edilmiş ve moleküler ağırlıklarına göre de ayrılmıştır. Daha sonra elde edilen bantlar kesilerek tripsin enzimi ile jel içinde sindirim protokolü uygulanmıştır. Triptik peptitler Thermo LTQ Orbitrap XL LC-MS/MS kütle spektrometresinde analiz edilmiş ve *de novo* dizileme ile amino asit dizileri belirlenmiştir. Elde edilen diziler BLAST algoritmasıyla veri tabanlarında bulunan yılan zehiri proteinleriyle eşleştirilmiş ve protein tanımlaması yapılmıştır. Yapılan tanımlamaya göre *V. kaznakovi* yılan zehirinin içeriği 1% Sinir Büyüme Faktörü (NGF), 1% Bradikinin arttırıcı peptid (BPP), 3% C-tipi lektin, 5% serin proteaz, 7% Sisteince Zengin Salgı Proteini (CRISP), 12% Yılan Zehri Metalloproteaz İnhibitörü (SVMPi), 23% Fosfolipaz A2 (PLA2), 44% Yılan Zehri Metalloproteaz (SVMP)’dan oluşmaktadır. Yapılan çalışmada 4% peptid ise tanımlanamamıştır.

Sonuç olarak, *V. kaznakovi* zehrinden saflaştırılan fraksiyon 5 ve fraksiyon 7'nin yüksek terapötik potansiyele sahip olduğu belirlenmiş ve farklı biyoaktivite parametreleriyle desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yılan zehiri, *Vipera kaznakovi*, sitotoksisite, antimikrobiyal, *ex vivo*, anti-anjiyogenez, hücre dngs, apoptoz, kaspaz-3 aktivasyonu.

ABSTRACT

Snake venom is a natural biological resource that has commonly been used for centuries in treatment of many pathophysiological disorders. It contains various active proteins that are responsible for its potential therapeutic value. Snake venom contains many neurotoxins, cardiotoxins, nerve growth factor, lectins, disintegrins and various different enzymes.

Within the scope of this project has been conducted on Caucasus viper (*Vipera kaznakovi*) venom distributed in Artvin which contains strong poison and responsible for most cases of bites in this area in Turkey. For this purpose, venom samples were collected in field from snakes and delivered to laboratory in liquid nitrogen. To standardize individual differences, the venom samples were brought together in the pool system, and lyophilized until needed before being used in further experiments. Firstly, the content of protein in crude venom of *V. kaznakovi* was determined and the antimicrobial and anticancer activity on several cell lines was investigated. And then the potential precursor peptide/ protein compounds that exhibited the highest antimicrobial and anticancer activity were isolated. For this purpose the bioactivity guided fractionation method was used and the active components were purified. The active compounds were isolated from selected fractions obtained by chromatographic methods that showed highest antimicrobial and cytotoxic activity against cancer cells. The effect of different fractions and crude venom on cancer cells, apoptotic, necrotic and cell cycle was determined. Moreover, an ex vivo tumor model was used to screen the different fractions for peptides/ proteins (such as disintegrins) which exhibit anti-angiogenic properties and are commonly found in snake venom. In the conducted cytotoxicity tests, the activity of peptide / proteins that demonstrated highest activity on cancer cell lines was confirmed by ex vivo tumor angiogenesis model. The venom sample was fractionated by reverse phase chromatography and then the protein (s)/ were/ was identified by mass spectrometry. The fractions were separated according to their molecular weight and checked for their purity using SDS-PAGE. The bands obtained by SDS-PAGE were cut, and digested by adding trypsin enzyme to the gel. Thermo LTQ Orbitrap XL LC-MS / MS mass spectrometer was used to analyze the tryptic peptides, while amino acid sequences were determined by using/ applying de novo sequencing. To identify the purified proteins, the obtained sequences were blasted with other snake venom proteins found in the data base. Identified peptide concentrations of *V. Kaznakovi* venom are as followed; 1% nerve growth factor, 1% Bradikinin potentiating factors, 3% C-type lectins, 5% serine proteases, 7% Cysteine-rich secretory proteins (CRISP), 12% snake venom metalloproteinases (SVMP)-inhibitors, 23% phospholipases A2 (PLA2s), 44% snake venom

metalloproteinases (SVMP) and 4% unknown peptides.

Keywords: Snake venom, *Vipera kaznakovi*, cytotoxicity, antimicrobial, ex vivo, anti-angiogenesis, cell cycle, apoptosis, caspase-3 activation.