

BİYOTEKNOLOJİ 2009

BİLDİRİ KİTABI

XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi
www.biyoteknoloji.org.tr

13 - 16 Aralık 2009
ANTALYA

Nanobiyoteknoloji
Tıbbi Biyoteknoloji
Gıda Biyoteknolojisi
Çevre Biyoteknolojisi
Endüstriyel Biyoteknoloji
Biyomühendislik / Biyosensör
Bitki ve Hayvan Biyoteknolojisi

Biyoteknoloji Derneği



Yılan Zehirlerinin Biyoteknolojik Kullanım Potansiyeli ve Koca Engerek [*Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758)]'in Güneydoğu Anadolu ve Kıbrıs'ta Yaşayan İki Alt Türünün Zehirlerinin Karşılaştırılması
N. İçci¹, B. Göçmen², M. Z. Yıldız^{2,3}, F. D. Özel-Demiralp¹

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji, Enstitüsü, Proteobilim Birimi, 06110 Tandoğan/ANKARA

²Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Ana Bilim Dalı, 35100 Bornova/İZMİR

³Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Ana Bilim Dalı, Osmanbey Kampüsü, ŞANLIURFA

1. Giriş ve Yılan Zehirlerinin Biyoteknolojik Kullanım Potansiyeli

Yılanlarda zehir, tükrük bezlerinin farklılaşmasıyla oluştuğu kabul edilen özelleşmiş zehir bezlerinde üretilir [1]. Yılan zehirleri temel olarak peptid/protein yapısında olmak üzere çok zengin bir içeriğe sahiptirler. Zehir yapısında kabaca, zehirli etki gösteren toksinler (ör: nörotoksinler, kardiyotoksinler), direkt olarak toksik etki göstermeyen proteinler (ör: kobra zehir faktörü, sinir büyüme faktörü) ve enzim inhibitörleri (ör: fosfolipaz A₂ inhibitörü), enzimler, çeşitli organik moleküller, biyojenik aminler ve iyonlar bulunur [2, 4, 8]. Yılan zehirleri özellikle enzimler açısından oldukça zengindir.

Son yıllarda peptid tabanlı ilaç geliştirme konusunun gelişmesiyle hayvansal zehirlere olan ilgi oldukça artmıştır. Zehirlerin içeriğindeki toksinler ve diğer bileşenler evrimsel süreç içinde en uygun ve işlevsel yapıya doğru gittiklerinden, laboratuvar koşullarında uzun yıllarda üretilebilecek bir molekül zehirde hazır bir şekilde karşımıza çıkabilir. Bu konuya olan yoğun ilgi, "Venomics" terimiyle adlandırılan yeni bir alanın doğmasıyla sonuçlanmıştır [3]. Bu terim, zehrin bütün moleküler çeşitliliğinin ileri analiz yöntemleriyle (proteomik, metabolomik ve diğer yöntemler) açığa çıkarılması ve proteinleri (özellikle de toksinleri) kodlayan genlerin belirlenmesi (genomik) şeklinde tanımlanabilir [3, 9]. Journal of Proteomics dergisinin 72. cildinin (2009) 2. sayısı "Venomics" ana başlığıyla çıkmıştır ve konunun önemi vurgulanmıştır [7]. Bu amaçla yapılan çeşitli projeler sonucunda özel veritabanları oluşturulmuştur (ör: ConoServer). Proteomiks alanında en sık kullanılan veritabanlarından biri olan UniProtKB/Swiss-Prot veritabanı bünyesinde hayvansal zehir kaynaklı toksinler için ayrı bir kısım oluşturulmuştur [13]. Bu özel veritabanında 430 türden 2656 toksin girdisi bulunmaktadır (24 Mart 2009 verileri).

Zehir çalışmalarının sonucu olarak üretilmiş ve günümüzde onaylı olarak kullanılan farklı etkilerdeki ilaç örnekleri mevcuttur. Yılan zehirlerinden elde edilen Aggrastat® (Tirofiban, *Sisturus miliaris barbouri* zehrinden) ve Integrilin® (Eptifibatid, *Echis carinatus* zehrinden), plateletlerin yüzeyinde bulunan ve glikoprotein yapısında olan IIb/IIIa reseptörlerinin antagonisti olarak çalışarak kümeleşmeyi önler [14, 15]. Integrilin®, glikoprotein IIb/IIIa antagonistleri arasında 2003 yılı için kullanım ve satış olarak Amerika'da birinci sıradadır ve kullanımı %62'den %73'e çıkmıştır [16]. Aggrastat®'in 2005 yılında Avrupa'da toplam satışı yaklaşık olarak 88 milyon dolardır. 2012 yılında Amerika, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya, İngiltere ve Japonya'da Aggrastat® satışının yaklaşık olarak 28 milyon dolar olacağı, Integrilin®'in ise 129 milyon doların üzerine çıkacağı öngörülmektedir [17]. *Bothrops atrox* zehrinden geliştirilen Reptilase® (proteolitik bir enzim), kan pıhtılaşmasıyla ilgili bozuklukların tanılarında kullanılmaktadır (Reptilase® zamanı) [5]. *Calloselasma rhodostoma* zehrinden geliştirilen sentetik bir peptid türevi olan Viprinex® (Ancrod)'in pıhtının yapısındaki fibrinojeni uzaklaştırıp yapının kararlılığını bozması özelliği inme olgularında önem kazanmakta ancak henüz deneme aşamasındadır [6]. *Pseudonaja textilis* zehrinden elde edilen Textilin'in, bir antifibrinolitik serin proteaz inhibitörüdür ve açık kalp cerrahisinde kanama komplikasyonlarına karşı denmektedir [10]. Bunların haricinde, nörodejeneratif ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Yılan zehri dışında, özellikle akrep, örümcek ve deniz salyangozu zehirleri de yoğun olarak çalışılmaktadır.

Koca Engerek [*Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758)], Güneydoğu Anadolu Bölgesinde *M. l. obtusa* (Dwigubsky, 1832) ve Kıbrıs'ta *M. l. lebetina* (Linnaeus, 1758) alt türleri ile dağılışı göstermektedir [11]. Türkiye ve K. K. T. C.'nin en büyük engerek türü olan Koca Engerek, vaka üretmesi nedeniyle sağlık açısından da önemlidir [1, 11, 12]. Bu çalışmada Koca Engereğin Güneydoğu Anadolu ve Kıbrıs'ta yaşayan iki alt türünün zehir içerikleri arasındaki farklılıkların saptanması amaçlanmıştır. Bu farklılıkların saptanması, gerek sistematik açıdan ve gerekse de zehirlenmelerin olası patogeneze farklılıklarıyla ilgili önemli bilgiler sunabilmesi açısından önemlidir. Ayrıca, *M. lebetina* türünün zehri 2 boyutlu jel

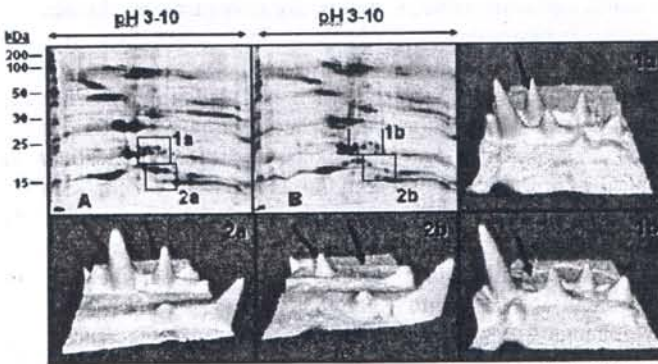
elektroforezi ve Fourier Dönüşümsel Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) teknikleriyle ilk kez incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Ana Bilim Dalı'nda terraryumda beslenmekte olan ergin 2 *M. l. obtusa* (ZDEU 34/2009 ve ZDEU 207/2006) ve 2 *M. l. lebetina* (ZDEU 39/2004 ve ZDEU 20/2007) örneğinden zehir sağılmış ve aynı alt türe ait bireylerden sağılan zehirler birleştirilerek liyofilize edilmiştir. Daha sonra toz örnekler çözülüp Bradford yöntemi ile miktar tayini yapılmış ve 2 boyutlu jel elektroforezi ile zehir protein profilleri elde edilmiştir. Bu amaçla, 17 cm uzunluğunda ve pH 3-10 aralığında IPG şeritlere (Bio-Rad) rehidrasyon tamponuyla [7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 amfolit (pH 3-10), 10 mM DTT] beraber 175 µg protein yüklenmiştir ve 50 V'de 16 saat aktif rehidrasyon yapılmıştır. Daha sonra izoelektrik odaklama işlemi [Protean IEF Cell (Bio-Rad)] gerçekleştirilerek birinci boyut ayırımı sağlanmıştır (15 dk. 250 V, 3 sa. 10 kV, toplamda 60 kV/sa değerine ulaşıncaya kadar 10 kV). Bu işlemin ardından şeritler, ikinci boyut ayırma hazır hale gelmeleri için, çalkalayıcı üzerinde 15 dk. dengeleme tamponu I [6 M üre, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), %2 SDS, %20 gliserol, %2 DTT] ve 15 dk. dengeleme tamponu II (%2 DTT yerine %2.5 iyodoasetamid) ile muamele edilmiştir. Ardından şeritler %4'lük toplama ve %12'lik ayırma jellerinden oluşan 1 mm kalınlığındaki poliakrilamid jele yüklenmiştir. SDS tamponu eşliğinde 30 dk. 100 V ve izleme boyası jelin altına ulaşıncaya kadar 150 V sabit voltajda ikinci boyut ayırımı gerçekleştirilmiştir [Protean xi II Cell (Bio-Rad)]. Her bir alt tür için iki tekrar yapılmıştır. Jeller Sypro Ruby (Bio-Rad) ile üreticinin talimatlarına göre boyanmış ve VersaDoc (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Jel fotoğraflarının analizi PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad) programı kullanılarak yapılmıştır. FT-IR çekimleri liyofilize toz halindeki zehir örneklerinden orta kızılötesi bölgede, 22°C'de ATR (Pike Miracle ATR Cell) aparatı ile yapılmıştır (Tensor 27 FT-IR, Bruker Optics). Her örnek 3 kere çekilmiş ve ortalamaları alınmıştır. Spektrumların analizi OPUS 5.5 (Bruker Optics) programı ile yapılmıştır.

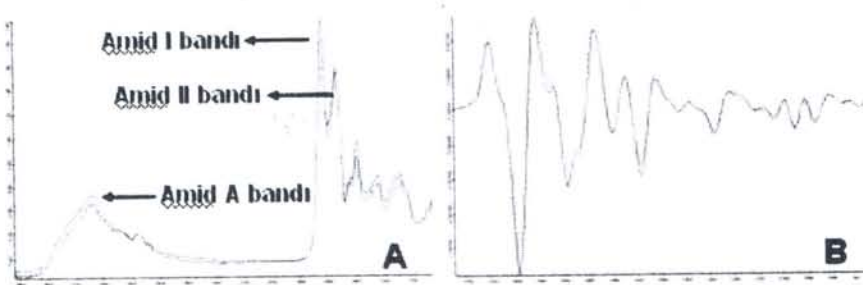
3. Sonuç ve Tartışma

2 boyutlu jel elektroforeziyle elde edilen protein profillerinde, her iki alt türün zehir proteinleri en fazla olarak pH 4-8 arasında dağılım göstermiştir (Şekil 1). Bunun yanında, pH 3 ve pH 10 civarında da proteinler görülmüştür. Proteinler moleküler ağırlık bakımından 200-15 kDa arasında hemen hemen eşit bir dağılım göstermiştir. İki alt türün zehir protein profilleri arasında hem bir alt türde bulunup diğesinde bulunmayan "spot"lar (protein kümeleri), hem de ifade artış azalışları şeklinde farklılıklar görülmüştür. İki alt türün jelleri (iki tekrarlı) arasında t testine (PDQuest 8.0.1) göre istatistiksel olarak %95 güven aralığında ($p < 0.05$) 11 protein kümesi farklı bulunmuştur. Bunlar arasında, *M. l. obtusa* zehrinde bulunup *M. l. lebetina*'da bulunmayan pH 6.2, 23 kDa (Şekil 1, 1a) ve pH 7, 17 kDa (Şekil 1, 2a) civarındaki iki protein kümesi dikkati çekmektedir.



Şekil 1. *M. l. obtusa* (A) ve *M. l. lebetina* (B) zehirlerinin 2 boyutlu jel elektroforezi ile elde edilmiş protein profilleri ve bazı önemli farklılıkların 3 boyutlu gösterimleri.

FT-IR çekimleri sonucunda; *M. l. obtusa* zehrinde 3287, 3081, 2963, 2936, 2876, 1644, 1544, 1443, 1393, 1246, 1111, 1077, 892 cm^{-1} dalga sayılarında; *M. l. lebetina*'da ise 3289, 3080, 2964, 2938, 2879, 1644, 1543, 1446, 1395, 1246, 1110, 1077, 893 cm^{-1} dalga sayılarında bantlar görülmüştür. İki alt türün spektrumları da genel olarak aynı bulunmuştur. Ancak ikinci türevde amid II bölgesinde görülen bazı farklılıklar, zehirlerdeki genel protein içeriğinin ikincil yapısında bazı farklılıklar bulunduğunu göstermektedir. 2 boyutlu jel elektroforezinde görülen farklılıklar da göz önünde bulundurulduğunda, böyle bir sonuç anlamlı olmaktadır. FT-IR çalışmalarının devamında eğri uyum yöntemiyle iki alt türün zehir proteinlerinin ikincil yapıları hesaplanarak aradaki farklılıklar tespit edilecektir.



Şekil 2. *M. l. obtusa* ve *M. l. lebetina* zehirlerinin üst üste çakıştırılmış FT-IR spektrumları. A: 3800–850 cm^{-1} dalga sayıları arasındaki bölgenin spektrumu. B: 1800–850 cm^{-1} dalgasayıları arasındaki bölgenin ikinci türev spektrumu (Her iki spektrum da 1750-1600 cm^{-1} arasındaki Amid I bandına göre normalize edilmiştir).

Kütle spektrometresi tabanlı yöntemler günümüzde zehir bileşenlerinin açığa çıkarılmasında kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir [9]. Bu çalışmanın devamında, hem farklı olarak belirlenen proteinlerin hem de diğer proteinlerin jelden kesilerek [The Proteome Works Spot Cutter (Bio-Rad)] geri kazanılacaktır. Kesilen proteinler ve ayrıca direkt olarak ham zehrin tripsinizasyon işleminin ardından MALDI-TOF kütle spektrometresinde (Waters) ölçümlerinin yapılması ve elde edilen m/z değerlerinin veri tabanlarıyla karşılaştırılması ile proteinlerin belli olasılıklarda tanımlanması planlanmaktadır.

Bu çalışma ile yılan zehirlerinde alt tür seviyesinde de farklılıklar görülebileceği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda sadece *M. l. obtusa* zehrinde görülen 2 protein kümesi, bu alt türe özgü bir belirteç olabilir. Ancak bu durumun daha kesin olarak belirlenebilmesi için birey sayısının artırılması gerekmektedir.

4. Kaynaklar

- [1] A. Budak, B. Göçmen, Herpetoloji, İzmir, Ege Üniversitesi Yayınları, 2008 (2. basım).
- [2] A. Edstrom, Venomous and Poisonous Animals, Florida, Krieger Publishing Company, 1992.
- [3] A. Ménez, R. Stöcklin, D. Mebs, "Editorial: 'Venomics': or the Venomous System Genome Project", Toxicon, Vol. 47, pp. 255-259, 2006.
- [4] A. T. Tu, "Overview of snake venom chemistry", Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 391, pp. 37-62, 1996.
- [5] D. C. I. Koh, A. Armugam, K. Jeyaseelan, "Snake venom components and their applications in biomedicine", Cell. Mol. Life. Sci., Vol. 63, pp. 3030-3041, 2006.
- [6] İ. Kelle, "Terapötik potansiyele sahip venom peptidleri", Dicle Tıp Dergisi, Vol. 33, pp. 113-126, 2006.
- [7] J. J. Calvete, "Editorial: Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology", Journal of Proteomics, Vol. 72, pp. 121-126, 2009.
- [8] O. H. P. Ramos, H. S. Selistre-de-Araujo, "Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains", Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Vol. 142, pp. 328-346, 2006.
- [9] P. Escoubas, L. Quinton, G. M. Nicholson, "Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry", Journal of Mass Spectrometry, Vol. 43, pp. 279-295, 2008.

- [10] R. J. Lewis, M. L. Garcia, "Therapeutic potential of venom peptides", Nature, Vol. 2, pp. 790–802, 2003.
- [11] B. Göçmen, H. Arıkan, K. Çiçek, M. Z. Yıldız, "A serological comparison of the populations of the Levantine Viper, *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758) in Cyprus and Southern Turkey", North-Western Journal of Zoology, Vol. 3, pp. 75–80, 2007.
- [12] B. Göçmen, H. Arıkan, Y. Özbel, A. Memmer, K. Çiçek, "Clinical, physiological and serological observations of a human following a venomous bite by *Macrovipera lebetina lebetina* (Reptilia Serpentes)", Türkiye Parazitoloji Dergisi, Vol. 30, pp. 158–162, 2006.
- [13] www.expasy.org/sprot/tox-prot/index.html
- [14] www.integrilin.com
- [15] www.aggrastat.com
- [16] Millenium Corp. 2003 verileri
- [17] Decision Resources 2008 verileri