

THE COMPARATIVE PROTEIN PROFILES OF VENOM AND VENOM GLAND EXTRACTS OF *AGELENA LABYRINTHICA* (ARANEAE: AGELENIDAE)

Nazife YİĞİT

Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 71450 Yahşıhan,
Kırıkkale, TÜRKİYE, e-mail: yigit@kku.edu.tr

ABSTRACT

Spider venoms are biologically active substances which affect a variety of vital physiological functions in both insects and mammals. The major constituents of spider venoms are protein, polypeptide and polyamine neurotoxins, enzymes, nucleic acids, free amino acids, monoamines and inorganic salts. The identification of the proteins in spider venoms is an essential step for identification of venom. In this study, we compared with protein profiles of *Agelena labyrinthica* venom obtained by electrostimulation of the prosoma and extracted directly from gland. There were seven components identified in whole venom, when whole venom and venom gland extracts composition of *A. labyrinthica* were compared by SDS-PAGE.

Key Words: Spider, *Agelena labyrinthica*, venom, protein, SDS-PAGE

AGELENA LABYRINTHICA (ARANEAE:AGELENIDAE)'NİN ZEHİR SALGISI VE ZEHİR BEZİ EKSTRAKTLARININ KARŞILAŞTIRMALI PROTEİN PROFİLLERİ

ÖZET

Örümcek zehirleri; hem avları olan böceklerde hem de memelilerde hayatsal fizyolojik fonksiyonları etkileyen biyo-aktif maddeler olup esas bileşenleri; protein, polipeptid, poliamin nörotoksinler, enzimler, nükleik asitler, serbest amino asitler, monoaminler ve inorganik tuzlardır. Örümcek zehrinde bulunan proteinlerin tanımlanması, zehirin tanımlanmasında önemli bir adım teşkil etmektedir. Bu çalışmada; ülkemizde oldukça yaygın bir örümcek türü olan *Agelena labyrinthica*'nın uyarılmamış ve uyarılmış durumdaki zehir bezlerinden elde edilen protein profilleri saf zehir salgısı ile karşılaştırılmıştır. Uyarılmamış zehir bezi ekstraktı ve elektriksel uyarımla elde edilmiş saf zehirin protein profilleri, SDS-PAGE analitik yöntemi kullanılarak karşılaştırıldığında, zehir proteininin yapısal proteinlerden kesin olarak ayrıldığı ve saf zehirde molekül ağırlıkları bakımından yedi farklı polipeptidin bulunduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Örümcek, *Agelena labyrinthica*, zehir, protein, SDS-PAGE.

1. GİRİŞ

Örümcekler; böceklerden sonra karasal yaşama uyum bakımından en başarılı omurgasızlardandır. Bugüne kadar dünyada yaklaşık 40 bin örümcek türü tanımlanmıştır; tanımlanmamış türlerle birlikte 100 binden fazla örümcek türü olduğu tahmin edilmektedir (1,2). Dünyanın bazı bölgeleri hariç tutulursa, örümcekler, genellikle “zehirli hayvanlar” içerisinde daha az önemsenmiştir. Tabiatta zehir bezleri olmayan bazı örümcek grupları (Uloboridae ve Holarchae) bulunsu da, genelde bütün örümcekler “zehirli hayvanlar” içerisinde değerlendirilmektedirler. Her ne kadar bazı türlerin zehirliliği insanlar için bir tehdit oluşturmasa da, bunlar böcekler ve bazı küçük omurgalı hayvanlarda (kurbağa, küçük kuşlar vs.) etkili olmaktadır (3).

1. INTRODUCTION

Excluding insects, spiders which adapted terrestrial life are the most successful invertebrate animals on land. Up till now about 40 000 different species of spiders have been described throughout the world, but it has estimated that species of spider with not yet described are more than 100 000 (1,2). Expect for some regions of the world, spiders in venomous animals have attracted less attention. Although there are some groups of spiders which have no venom glands (Uloboridae and Holoarchae) in nature, in principle all spiders with any kind of venom glands are considered to be in venomous animals. Although venom's some species is not dangerous to human beings, their venom is toxic to insects and small vertebrates (frog, small bird etc.) (3).

Hayvanlar aleminde farmakolojik olarak etkin örümcek zehirleri, diğer zehirli hayvanların zehirleri gibi heterojen maddeler içerir. Kimyasal olarak heterojen olan örümcek zehirlerinin içeriği, üç esas kimyasal sınıfta toplanmıştır: Yüksek molekül ağırlıklı proteinler ($M_r > 10.000$ Da), polipeptidler ($M_r 3.000-10.000$ Da), amin ve poliaminler gibi düşük molekül ağırlıklı organik moleküller ($M_r < 1.000$ Da). Örümcek zehirlerinde inorganik iyonlar ve tuzlar, serbest asitler, glukoz, serbest amino asitler, biyojenik aminler ve nörotransmitterler bulunmaktadır. Bu inorganik ve organik bileşiklerin rolleri henüz bilinmemektedir (2,4). Tanımlanmış örümcek toksinlerinin büyük çoğunluğu molekül ağırlığı 3.000 ile 8.000 Da arasında çeşitli disülfid köprüleriyle bağlanmış polipeptidlerdir. Örümcek zehirlerinin toksik özelliği, poliaminlerle birlikte polipeptidlerin varlığına bağlıdır (5). Bu toksinlerin esas hedefi hücre zarındaki iyon kanallarıdır. Zehir proteinleri içinde yüksek molekül ağırlıklı nörotoksin ve enzimler bulunmaktadır. Örümcek zehirlerinde proteazlar, hiyaluronidazlar, sfingomyelinazlar, fosfolipazlar ve izomerazlar gibi enzimlerin varlığı tespit edilmiştir (2,6,7).

Örümcek zehirleri etkileme şekline göre nörotoksinler ve nekrotoksinler olarak başlıca iki gruba ayrılır. Nörotoksinler; hem böcek hem de memeli sinir sistemini etkileyen örümcek zehirlerinin bileşenidir. Birçok örümcek, avları olan böcekleri yakalayıp felç ettikten sonra, zehirlerinde nöroaktif maddelerin iş görmesi beklenen bir durumdur. Grishin (5), poliamin ve polipeptid nörotoksinlerin sinir sistemi üzerindeki etkilerini incelemiş; küçük polipeptidlerin uyarılabilir nöron zarındaki iyon kanalları ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Daha yüksek molekül ağırlığa sahip nörotoksinlerin ise presinaptik zarın reseptörleri ile bağlanarak yoğun bir nöromedyatör salınımına sebep olduğunu tespit etmiştir.

Nekrotoksinler, zehirlenmenin olduğu bölgede doku nekrozunu uyaran toksinler olarak tanımlanmaktadır. Nekrotik araneizm, bir örümceğin sebep olduğu lokal doku hasarları olarak tanımlanmaktadır. Bu hasarlar ülser veya daha yoğun doku tahribatı ile deri ölümüdür. Nekrotik araneizm son yıllarda Avustralya'nın önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir (8,9). Hemorajik ve nekrotik etkilere yılan zehirlenmelerinde olduğu gibi *Loxosceles* cinsine ait örümcek zehirlerinde de bulunan hidrolitik enzim aktivitesinin (proteazların) sebep olduğu düşünülmektedir. Bu olaydan sorumlu olan toksinler 37.000 Da ağırlığına sahip bir protein olarak izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Pedrosa ve arkadaşları (10) tarafından yapılan çalışmada, *Loxosceles* örümceklerinin esas patolojik etkilerinden sorumlu olan faktörün zehirde bulunan sfingomyelinaz enzim aktivitesinin olduğu ileri sürülmüştür. Toksin, sfingomyelinlerde ve lizofosfatidil kolinlerde D-bağının hidrolizini katalize eder. Bu nedenle bu nekrotik faktöre Sfmomyelinaz-D denilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bazı hastalıkların tedavisinde örümcek zehirlerinin kullanılabileceği ifade edilmektedir. Tarantula zehirinin diğer kalp fonksiyonlarını etkilemeksizin atrial fibrillasyon gibi rahatsızlıkları durdurabileceği ileri sürülmüştür (11). Aynı zamanda, Neotropikal bir örümcek olan *Cupiennius*

Like other venoms, spiders' venom is pharmacologically very active in animal kingdom, and their venoms contain heterogeneous substances. Spider venom components can be grouped into three major chemical classes: low molecular mass organic molecules ($M_r < 1 000$ Da), polypeptides ($M_r 3 000-10 000$ Da) and high molecular mass proteins ($M_r > 10 000$ Da). Spider venoms contain inorganic ions and salts, free acids, glucose, free amino acids, biogenic amines and neurotransmitters. The role of those constituents is unknown (2,4). The identified toxins of spider venom contains polypeptide of molecular mass ranging from 3 000 to 8 000 Da, which form intramolecular disulfide bridges. The toxic properties of spider venoms depend on polypeptides with polyamines (5). The major targets of these toxins are ion channels on the cell membranes. Venom proteins include both high molecular mass neurotoxins and enzymes. Proteases, hyaluronidases, sphingomyelinases, phospholipases and isomerases have been reported in spider venoms (2,6,7).

Spider venoms can be grouped into two major groups according to effect way as neurotoxins and necrotoxins. Neurotoxins affected both insects and mammals nerves systems are constituent of spiders' venom. Since many spiders catch and paralyse insects their usual prey, they are expected to possess neuroactive substances in their venoms. Grishin (5) reported that small polypeptide toxins could interact with ion channels in the excitability of the neuron membrane, a group of high molecular mass toxic proteins cause a massive transmitter release from diversity of nerve endings.

Necrotoxins are defined for as toxins which induce tissue necrosis at the site of envenomation. Necrotic araneidism caused by a spider describe as a local necrotic lesion. These lesions are necrotic ulceration and extensive tissue damage with cell death. In recent years, necrotic araneidism has been an important health problem in Australian (8, 9). The activity of hydrolytic enzymes (proteases) of sphingomyelinase D found in venom of *Loxosceles* spiders is the responsible agent for heamorrhagic and necrotic lesions like snakes' venom. The responsible toxin has been isolated and characterized as a 37 000 Da protein. The study was made by Pedrosa *et al.* (10) demonstrated that the sphingomyelinase activity in the whole venom is responsible for the major pathological effects of *Loxosceles* spider envenomation. This toxin catalyzes the hydrolysis of the D-linkage in sphingomyelin and lysophosphatidyl. This necrotic toxin was called as sphingomyelinase D.

The studies have been done in recent years reported that medical treatment of some diseases can be cured by spiders' venom. A study performed on rabbits suggests that tarantula venom stops atrial fibrillation without disrupting other cardiac functions (11). Also, the venom of the neotropical wandering spiders *Cupiennius salei* revealed antimicrobial activity against some gram positive and negative bacteria. Due to the development of antibiotic resistant bacteria, antibacterial peptides in order to find new and effective therapeutic agents (12,13). Like the venoms of other animals, venoms from spiders which are complex mixtures of proteins, polypeptides,

salei'nin zehirinde bulunan bazı peptitlerin, gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Antimikrobiyal aktiviteye sahip olan bu peptidlerin günümüzde tedavi için kullanılan, antibiyotiklere direnç geliştirmiş bakterilerle mücadelede yeni ve etkili ilaçların üretilmesinde bir model oluşturacağı düşünülmektedir (12,13). Proteinler, peptidler, poliaminler ve biyojenik aminlerin kompleks bir karışımı olan örümcek zehirleri de diğer hayvan zehirleri gibi türe özgüdür. Bazı araştırmacılar saf zehir salgısının elektroforezinden elde edilen sonuçların aynı zamanda taksonomik amaçlar için moleküler evrimde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (2).

Yukarıda bahsedildiği gibi örümcek zehirlerinin içeriğinin belirlenmesi, zehirin tanımlanması için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, dünyada ve yurdumuzda oldukça yaygın bir huni ağ örümcek türü olan *A. labyrinthica*'nın dişi bireylerinden elektriksel uyarı tekniği ile elde edilen saf zehir salgısının ve elektrik şoku ile uyarılmış ve de uyarılmamış zehir bezi ekstraktlarının SDS-PAGE tekniği ile protein profilleri çıkarılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Örümcek Zehirinin Çıkarılması

Çalışmada kullanılan örümcekler Kırıkkale'nin Yahşihan ilçesi, Kızılırmak Yeşil Vadi'den toplanmıştır. Zehir elde etmede Veiga ve arkadaşlarının (14) tavsiye ettiği elektriksel uyarı yöntemi (15 V'luk elektrik akımı) kullanılmıştır. Örümceğin prosoma kısmı, zehir dişi açılana kadar elektriksel olarak uyarılmış ve zehir dışından dışarı verilen zehir bir mikroenjektör yardımıyla çekilmiştir. Elde edilen zehir daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2. Zehir Bezi Ve Beyin Dokusundan Protein Ekstraksiyonu ve Ekstraktlardaki Protein Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada elektriksel olarak uyarılmamış ve uyarılmış örümceklerin zehir bezi protein profillerini karşılaştırmak için örümcekler iki gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki örümceklere elektriksel uyarı verilmiştir. Zehir bezlerinin toplanması için yetişkin dişi bireyler eter ile bayıltılmış, düşük akım aygıtı kullanılarak 15 V'dan daha düşük elektrik şoku verilmiştir. Diğer gruptaki örümceklere ise elektriksel uyarı verilmeden zehir bezleri doğrudan stereo mikroskop (Nikon SMZ 10A) altında ayrı ayrı çıkarılmış ve buz ile soğutulmuş sodyum fosfat tamponu içine alınmıştır. Zehir bezleri ve örümceğin beyininden alınan parça numuneler buz üzerinde soğutulmuş lisiz tamponla 30 dakika muamele edilmiştir. Sonra 14.000 g'de 20 dakika +4 °C'de santrifüjlenerek süpernatantı alınmış ve -80 °C'de saklanmıştır.

Standardizasyonu sağlamak için her bir kuyucuğa eşit miktarda protein içermek üzere örnekler yükleneceğinden ekstraksiyonlardaki protein miktarı, Bradford (15) Coomassie Blue yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Spektrofotometrik verilerle protein miktarı hesaplanmıştır.

2.3. Protein Elektroforezi (SDS-PAGE)'nin Yapılışı

Protein ekstraktlarının ayırımında; %5-20 linear gradientli Hoefer SE 250 (vertikal mini jel) SDS

polyamines and biogenic amines are special to species. As in other venomous animal, there is substantial variation among taxa in toxic mixtures making up venoms. Some workers pointed out that results obtained from electrophoresis of whole venom also were used taxonomic study in molecular evolution (2).

As above mentioned, the identification of the proteins in spider venoms is an essential step for identification of venom. In this study, we revealed protein profiles of *Agelena labyrinthica*, which is widely distributed throughout Turkey. Protein profile of venom obtained from adult female spiders by electrostimulation compared with extracts of unexcited and excited venom glands by SDS-PAGE.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Spider Venom Extraction

All spiders used in the study were collected from Kızılırmak Green Valley in Kırıkkale. To submit venom, the method of electrostimulation was recommended by Veiga and colleagues (14) were used (electric shock of 15 V). Until spiders opened their fangs, an electric shock applied to prosoma and venom from the tips of the fangs was drawn into microsyringe. Harvested venom stored -20 °C until use.

2.2. Protein Extraction of Venom Glands and Brain and Protein Quantification

In this study to compare unexcited and excited spider's protein profiles, spiders divided into two groups. First group of spiders were applied an electric shock. For venom glands collection, adult female spiders were anesthetized in an ether chamber and applied an electric shock lower than 15 V. Another group of spiders were not applied an electric shock and venom directly collected venom glands. Their opisthosoma compartments were cut out and discarded using a stereo dissecting microscope (Nikon SMZ 10 A); a pair of gland was collected into ice-cold sodium phosphate buffer. Venom glands and brain of spiders were treated by ice-cold lyses buffer for 30 minutes. Then the solution was centrifugation at 14 000 rpm and + 4 °C for 20 minutes. Supernatant was taken and was stored at -80 °C.

To standardize quantity of loaded protein, equal quantity of protein contained samples were per lane. That's way protein contents of samples were determined by the Coomassie blue method as described by Bradford (15). Protein quantity was calculated by spectrophotometric data.

2.3. Protein Electrophoresis (SDS-PAGE)

Sample of proteins was separated by Hoefer SE 250 (vertical mini gel) sodium dodecyl sulphate

poliakrilamid jel (SDS-PAGE) kullanılmıştır. Standardizasyonu sağlamak için her bir kuyucuğa eşit miktarda protein (2 µg) içermek üzere örnekler yüklenmiş, 20 mA'de 1 saat süreyle yürütülmüş, jel 4 saat Coomassie Brilliant Blue'da boyandıktan sonra dekolore edilmiştir (16). Molekül ağırlık standart referansı olarak, β-galaktosidaz (110 kDa), bovine serum albümin (85 kDa), ovalbümin (50 kDa), karbonik anhidraz (33 kDa), β-laktoglobulin (26 kDa), lizozim (20 kDa) (Fermentas Chem. Co.) kullanılmıştır. Molekül ağırlığı hesaplanacak olan protein bantlarının Rf (orsansal hız) değerleri, standart referans proteinlerin Rf değerleri ile mukayese edilerek hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

Ekstraktlardaki protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlenmiş ve beyin dokusunda 2.3 µg/µl; elektrikle uyarılmış zehir bezlerinde 1.15 µg/µl; elektriksel uyarı verilmemiş zehir bezlerinde 0.6 µg/µl; elektriksel uyarı yöntemi ile çıkarılmış saf zehir salgısında 0.4 µg/µl protein bulunmuştur.

Zehir yapısının protein bileşiminin çıkarılması için zehir bezlerinin uyarılmamış ve uyarılmış durumdaki protein profillerinin zehir örneği ile mukayeseli analizi yapılmıştır. Bunun sonucu, elektro şok uyarımı üzerine yapılan özgün gen ekspresyonunun özgün protein sentezi yoluyla incelenmesi, uyarılmamış ve uyarılmış bezlerin protein profilleri karşılaştırılarak zehirdeki özgün proteinlerin zehir bezlerindeki ekspresyonlarının ve ekspresyon seviyelerinin belirli bir ölçüde de olsa tabibinin yapılabilmesi amaçlanmıştır.

Uyarılmamış zehir bezi, uyarılmış zehir bezi, zehir ve zehir beziyle ilişkisi olmaması sebebiyle de beyin dokusu örnekleri SDS-PAGE yöntemiyle mukayeseli analitik incelemeye tabi tutulmuş ve zehire özgü proteinlerin tespiti yapılmaya çalışılmıştır. Saf zehir salgısında, yedi değişik polipeptit bulunmuş ve elde edilen sonuçlar Şekil 1'de görülmektedir.

- Zehir proteinlerinin bir kısmı sadece zehirde bulunmakta, fakat zehir bezlerinde görülmemektedir. Bu tip proteinler zehirin karakteristik ve özgün bileşenleridirler (Şekilde c ve e ile gösterilen bantlar).
- Zehir proteinlerinin bir kısmı hem uyarılmamış hem de uyarılmış zehir bezi örneklerinde görülmektedir (Şekilde a, b, d, f ve g ile işaretli bantlar).
- Zehir bezi proteinlerinden, uyarılmamış ve uyarılmış zehir bezlerinde bulunan proteinlerin zehir üretimiyle ilişkili olmayanlarının ayırımının yapılması da amaçlanmıştır. Bu nedenle zehir üretimiyle doğrudan ilişkisi olmayan bir örnek (beyin dokusu proteinleri) analizlere özellikle dahil edilmiş ve yapısal proteinlerin ayırımı yapılmıştır.

Molekül ağırlığı bilinen standart referans proteinler, bize zehir salgısında bulunan yedi değişik banttaki polipeptidlerin molekül ağırlıklarını hesaplama imkanı vermiştir. Polipeptidlerin molekül ağırlıkları sırasıyla 37.2, 34.3, 26.9, 21.5, 17.2, 13.2 ve 12.2 kDa olarak hesaplanmıştır. Bunun sonucunda, zehir salgısının içerdiği polipeptidlerin 40-10 kDa arasında olduğu dikkatimizi çekmiştir.

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 5-20 % linear gradient. Equal quantity of protein (2 µg) contained samples were loaded per lane, gel was run at 20 mA for 1 hour and was stained with Coomassie Brilliant blue for 4 hours then was destained (16). The molecular mass markers used were β-galactosidase (110 kDa), bovine serum albumin (85 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (33 kDa), β-lactoglobulin (26 kDa) and lyzosome (20 kDa) (Fermentas Chem. Co.). Molecular weights of protein bands were calculated by Rf values that have standard proteins.

3. RESULTS

The protein contents of cured venom and venom glands extracts were determined by the Bradford method and were found 2.3 µg/µl protein in extract of brain; 1.15 µg/µl protein in excited venom gland by an electric shock; 0.6 µg/µl protein in unexcited venom gland; 0.4 µg/µl protein in electrostimulated venom.

To reveal protein contents of venom, comparative analyze was performed by SDS-PAGE, and protein profiles was compared excited venom gland by an electric shock and unexcited venom gland extract with electrostimulated venom. Original gene expression was done by electro shock stimulation was investigated by original protein syntheses. While protein profile of electrostimulated venom was compared with excited venom gland by an electric shock and unexcited venom gland extract, it could be tried to find original protein in venom and expression levels was partially observed.

The samples of excited and unexcited venom glands, electrostimulated venom and the brain tissue that not related venom glands were investigated by comparative analytic method of SDS-PAGE, and it could be tried to estimate proteins special to venom. Seven different polypeptides were found in whole venom and obtained results were seen in Figure 1.

- A part of venom proteins was found only whole venom, but not found in venom gland. These types of proteins are characteristic and original components of venom (Figure 1 shows as c and e).
- A part of venom proteins was seen in samples of both excited and unexcited venom glands (Figure 1 shows as a,b,d,f and g).
- It was aimed to separate the protein that exist in the excited and unexcited venom glands but not related with venom production. For this reason the proteins of the brain tissue that not directly related with venom production were especially inserted to the analyses in this study and separation of the structural proteins were made.

The standard reference proteins known molecular weight has been served us calculating molecular weight of seven polypeptides in whole venom. The molecular weights of seven polypeptides were calculated respectively as 37.2, 34.3, 26.9, 21.5, 17.2, 13.8, 12.2 kDa. We noticed that in the crude venom seven polypeptides of molecular mass have in the range of 10-40 kDa.

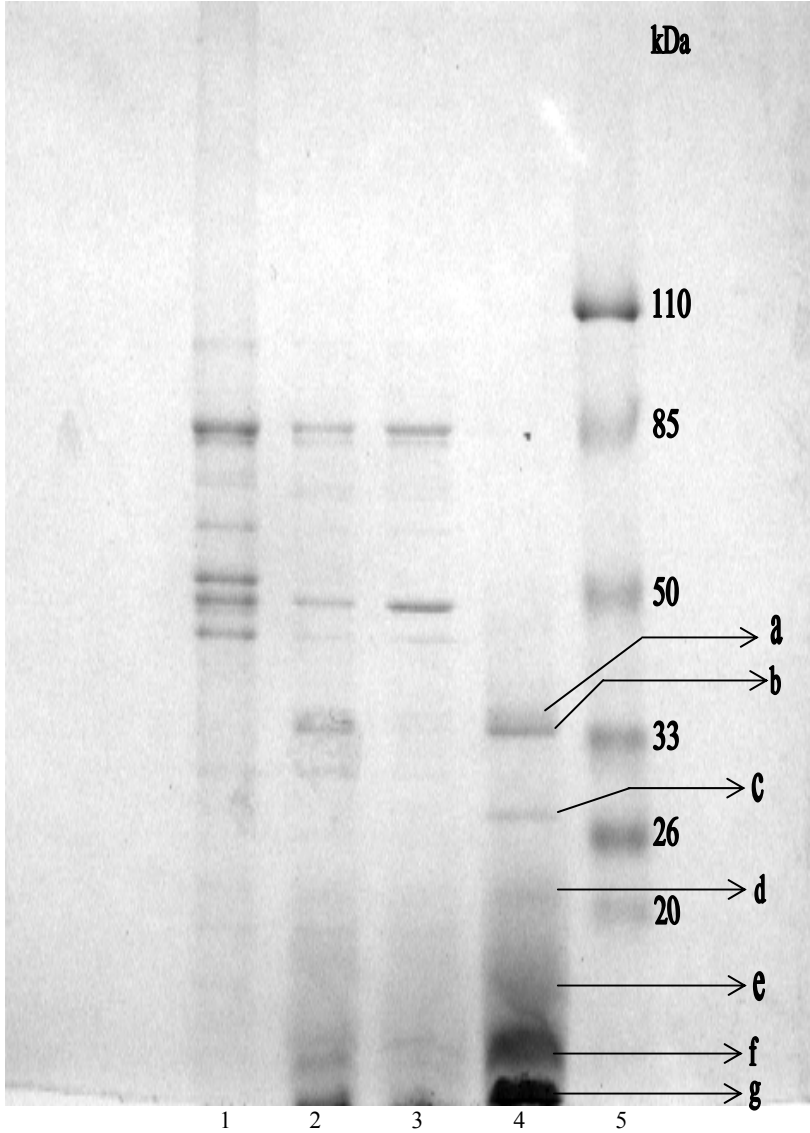


Figure 1. Comparative protein profile of brain extract (1), excited venom gland by an electric shock (2), unexcited venom gland extract (3), electrostimulated venom (4) from *A. labyrinthica*. Molecular mass markers are shown on 5th number lanes. In the crude venom (4), seven bands' molecular weight were calculated, a: 37.2, b: 34.3, c: 26.9, d: 21.5, e: 17.2, f: 13.8, g: 12.2 kDa.

Şekil 1. Örümceğin beyininin (1), elektriksel olarak uyarılmış örümceklerin zehir bezleri ekstraktı (2), elektriksel olarak uyarılmamış örümceklerin zehir bezlerinin ekstraktı (3), elektriksel uyarı tekniği ile çıkarılmış saf zehir salgısının (4) karşılaştırmalı protein profilleri. Molekül ağırlığı bilinen referans proteinler en son hatta (5) gösterilmiştir. Saf zehir salgısında bulunan bantların molekül ağırlıkları a: 37.2, b: 34.3, c: 26.9, d: 21.5, e: 17.2, f: 13.8, g: 12.2 kDa olarak hesaplanmıştır

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Zehir yapısının protein bileşiminin çıkarılması, zehirin tanımlanması bakımından önem taşımaktadır. Uyarılmamış zehir bezleri, uyarılmış zehir bezleri, zehir ve zehir bezleriyle ilişkisi olmaması sebebiyle de beyin dokusu örnekleri SDS-PAGE yöntemiyle mukayeseli analitik incelemeye tabi tutulmuş ve zehire özgü proteinlerin tespiti yapılmaya çalışılmıştır. Bunun sonucunda, zehir proteinlerinin bir kısmı sadece zehirde bulunmaktadır, yani, bu proteinler zehir bezlerinde görülmemektedir. Bu tip proteinler zehirin karakteristik ve özgün bileşenleridirler (Şekil 1'de c ve e ile gösterilen bantlar). Diğer yandan, zehir proteinlerinin bir kısmı hem

4. DISCUSSION

The identification of the proteins in spider venoms is important for identification of venom. The comparative analytic analyze was performed by SDS-PAGE, and protein profiles were compared excited venom gland by an electric shock and unexcited venom gland extract with electrostimulated venom it could be tried to find original protein in venom. A part of venom proteins was found only crude venom that is these proteins were not seen in venom glands. These types of proteins are characteristic and original components of venom (Figure 1 shows as c and e). On the other hand, a part of venom proteins was seen in samples of both excited and unexcited venom

uyarılmamış hem de uyarılmış zehir bezi örneklerinde görülmektedir (Şekil 1'de a, b, d, f ve g ile işaretli bantlar). Zehir bezi proteinlerinden, hem uyarılmamış hem de uyarılmışta bulunanların zehir üretimiyle ilişkili olmayanlarının ayırımının yapılabilmesi amacıyla beyin dokusu proteinleri gibi zehirle ilişkisi olmayan bir örnek analizlere özellikle dahil edilmiştir.

Elektroforezi yapılan örneklerin protein konsantrasyonları standardize edilmiş olmasına rağmen; elektroforez sonucunda bazı polipeptit bantlarının yeterince belirgin olmadığı görülmekte olup, muhtemelen bazı düşük molekül ağırlığına sahip olanların ise jelden erken çıkmış olması sebebiyle kaybedilmiş olabileceği de ihtimal dahilindedir. Bu durumlar ileride yapılacak çalışmalarda özellikle dikkate alınacaktır.

Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara göre, zehir salgısındaki proteinlerin, en az yedi farklı moleküler büyüklükte polipeptitten oluştuğu tespit edilmiştir. Bu polipeptitlerin büyüklüklerini tespit edebilmek amacıyla molekül büyüklükleri bilinen standart markörler kullanılmış ve bu yedi bantın molekül ağırlıklarının 40-10 kDa arasında olduğu hesaplanmıştır.

Bununla beraber bant sayısının yediden fazla olması da muhtemeldir. Bu yedi dominant bantın mukayeseli incelemesi yapıldığında zehir polipeptitlerinde a, f ve g'nin hem uyarılmış hem de uyarılmamış zehir bezlerinde bulunması dikkati çekmektedir. a, f ve g'lerin uyarı olmaksızın üretildiği ve salgılandığı anlaşılmaktadır. b ve d ile gösterilen zehir polipeptitlerinin sadece uyarılmış bezlerde bulunduğu, gen ekspresyonunun uyarı üzerine sentezlendiği ve salgılandığı anlaşılmaktadır. c ve e ile gösterilen zehir bantlarının temsil ettiği polipeptitler uyarılmış zehir bezlerinde dahi görülmemektedirler. Zehirin, zehir bezlerinde üretilerek salgılandığı hatırlanacak olursa çelişki gibi görünen bu durumun, proteinlerin translasyon sonrası işlenmeler sonucu farklı büyüklükteki varyantlarının ortaya çıkması ile açıklanması mümkündür. Nitekim, zehir içinde yer alan proteinlerin önemli bir kısmının zimojenler olduğu öne sürülmektedir (17,18,19). Zimojenler bilindiği gibi enzimler tarafından aktive edilen inaktif enzimlerdir. Bu sebeple proaktif (inaktif) ve aktif olmak üzere en az iki tipte olabileceği için aynı zimojenin elektroforezde farklı bantlar vermesi şaşırtıcı olmayacaktır. Bu açıdan bakıldığında proteolitik kesimlemenin bezde salgılamadan önce mi yapıldığı, yoksa salgılandıktan sonra mı gerçekleştiği önem kazanmaktadır.

Veiga ve arkadaşları (19) *L. intermedia*'nin zehir salgının elektroforetik ayrımı sonucunda, zehirli oluşturan polipeptidlerin 40 kDa'dan daha düşük molekül ağırlığa sahip küçük polipeptidler olduğunu belirtmişlerdir. Aynı şekilde bu çalışmada da elektroforez sonucunda *A. labyrinthica*'nın zehir salgısının 40-10 kDa arasında polipeptidlerden oluştuğu belirlenmiştir. Ancak belirlenen bantların sayısı ve polipeptidlerin molekül büyüklükleri oldukça farklı bulunmuştur. Bu sonuç, bize farklı tür örümceklerin zehirlerinin protein profillerinin birbirlerinden farklı olduğunu göstermektedir.

Araştırma bulguları sonucunda dünyada ve yurdumuzda yaygın bir huni ağ örümcek türü olan *A.*

glands (Figure 1 shows as a,b,d,f and g). In order to separate the proteins which not directly related venom producing in excited and unexcited venom gland, brain tissue that not directly related venom producing especially inserted in this study.

Although protein concentration of samples were standardized, after electrophoresis some polypeptide bands were not seen clearly enough, some polypeptides of low molecular mass probably gone out gel early. These conditions will be pointed in further studies.

The obtained results demonstrate that venom proteins compose of seven different polypeptides. To determine molecular weight of polypeptides, the standard reference proteins that known molecular weight were used and these seven polypeptides present in venom have low molecular weights of approximately 10-40 kDa range.

The number of bands may more than seven. When these seven different bands are compared, the venom proteins of a, f and g are found in both excited and unexcited venom glands. It is understood that a, f and g are produced without stimulation and are secreted. So, it is clear that the polypeptides of b and d on legend were found only in excited venom glands, gene expression was done by stimulation, and proteins were synthesized and secreted. Polypeptides of c and e were not seen not only the excited but also unexcited venom glands. It is remembered that venom is produced in venom glands; this condition may be seen as a contradiction but it can be explained by posttranslational modification. Some workers suggested that an important partial of proteins present in venom are zymogens (17, 18, 19). It is known that zymogens are inactive enzymes by activating enzymes. It is not exciting; because two types of zymogens as proactive (inactive) and active present, it is possible two distinct variants of same zymogens are found on electrophoresis. Also, it is important that the proteolytic cleaving is made either in gland before secretion or after secretion.

On venom of *L. intermedia* and using electrophoresis on it Veiga *et al.* (19) demonstrated that the proteins which construct venom have low molecular weight lesser than 40 kDa. Venom analysis of *A. labyrinthica* by SDS-PAGE showed that the polypeptides consist of venom in range of 10-40 kDa. However, determined the number of bands and molecular mass of polypeptides were rather different. This result shows that protein profile of different spiders' venom are differ from each other.

The results of the study illustrated that venom obtained from adult spiders, *Agelena labyrinthica* which is widely distributed throughout Turkey and the world, by the method of electrostimulation and comparative protein profiles of the venom obtained by electrostimulation method carried out. The protein content of the venom of *A. labyrinthica* and proteins that synthesized only by an electro shock were determined.

labyrinthica'nın elektriksel uyarı tekniği ile zehirin alınması işlemi gerçekleştirilmiş ve bu teknik ile elde edilen saf zehir salgısı ve elektrikle uyarılmamış ve uyarılmış örümceklerden elde edilen zehir bezlerinin protein profilleri karşılaştırmalı olarak ortaya konulmuştur. Bu şekilde *A. labyrinthica* zehirine özgü protein içeriği ve sadece uyarı üzerine sentezlenen proteinlerin varlığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR/ REFERENCES

1. Levi, W. H. and Levi, L.R., *Spider and their kin (A golden guide)*, **Golden Books Publishing Company, Inc.**, New York, 1-160 (1990).
2. Escoubas, P., Diochot, S. and Corzo, G. "Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins", **Biochimie**, 88: 893-907 (2000).
3. Foelix, R.F., *Biology of Spiders*, **Harvard University Press**, London, England, 12-47 (1982).
4. Jackson, H. and Parks, T.N., "Spider toxins: Recent application in neurobiology", **Ann. Rev. Neurosci.**, 12: 405-414 (1989).
5. Grishin, E., "Polypeptide neurotoxins from spider venoms", **Eur. J. Biochem.**, 264: 276-280 (1999).
6. Ori, M. and Ikeda, H., "Spider venoms and spiders toxins", **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, 17: 405-426 (1998).
7. Rash, L.D. and Hodgson, W. C., "Pharmacology and biochemistry of spider venoms", **Toxicon**, 40: 225-254 (2002).
8. Isbister, G., "Necrotic arachidism in Australia", **Toxicon**, 39: 1941-1942 (2001).
9. Lucas, S., "Spiders in Brazil", **Toxicon**, 26: 759-772 (1988).
10. Pedrosa, M.F.F., Azevedo, I.L.M.J., Gonçalves-Andrade, R.M., Berg, C.W., Ramos C.R.R., Ho, P.L. and Tambourgi, D.V., "Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laete* venom", **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 298: 638-645 (2002).
11. Bode, F., Sachs, F., Franz, M.R., "Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation", **Nature**, 409: 35-36 (2001).
12. Haerberli, S., Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., Nentwig, W., "Characterization of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae)", **Toxicon**, 38: 373-380 (2000).
13. Kuhn-Nentwig, L., Müller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., and Nentwig, W., "Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae)", **J. Biol. Chem.**, 277: 11208-11216 (2002).
14. Veiga, S.S., Gremski, W., Santos, V.L., Feitosa, L., Mangili, O.C., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Brentani, R.R., "Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: Dependence on glycosylation for dermonecrotic activity", **Toxicon**, 37: 587-607 (1999).
15. Bradford, M. M., "Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding", **Anal. Biochem.**, 72: 248-254 (1976).
16. Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4", **Nature**, 227, 680-685 (1970).
17. Rezende, L., Cordeiro, M.N., Oliveria, E.B. and Diniz, C.R., "Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*", **Toxicon**, 29: 1225-1233 (1991).
18. Silveira, R. B., Filho J. F. S., Mangili, C. O., Veiga, S. S., Gremski, W., Nader, H. B., Dietrich, C. P., "Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders", **Toxicon**, 40: 815-822 (2002).
19. Veiga S. S., Silveira R. B., Dreyfuss J. L., Haoach J., Pereira M. A., Mangili O. C., Gremski W., "Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom", **Toxicon**, 38: 825-839 (2000).