



Comparative analysis of peptides and proteins in two congeneric (*Leiurus abduallahbayrami*; Buthidae) scorpion venoms by MALDI-TOF MS

Yasemin NUMANOĞLU ÇEVİK **¹, Mehmet Ali KANAT¹
ORCHID: 000-0001-5818-7881; 0000-0003-3494-4563

¹ Microbiology and Reference Laboratory and Biological Products Department, General Directorate of Public Health, Minister of Health, 06430, Ankara, Türkiye

Abstract

In this study, two *Leiurus abduallahbayrami* scorpion venoms were analyzed with MALDI-TOF MS and their peptide and protein distributions were compared. The total protein amount of the venoms was prepared to be equal to 2mg/mL concentration. For the analysis of two scorpion venoms alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid was used as a matrice. The system was operated in linear positive ion mode at a mass range of 1-50 kDa, and a 60 Hz nitrogen laser at 337 nm was used as the ion source. Mass spectra were generated using the flex-Analysis software (version 3.4). For the analysis of peptide and protein distributions in two scorpion venoms, the highest relative abundance in each spectrum was accepted as 100, and the percentage relative abundance of other molecules was calculated. Afterward, both determining the peptide and protein profiles in the venoms of two scorpions and the proportional differences or similarities of the peptide and proteins in the venoms were investigated. In addition, the projections of peptides and proteins in the spectra of the two scorpion venoms were evaluated on virtual gel images to map the distribution of high abundance peptides and proteins.

As a result, it has been experimentally determined that the relative ratios of peptide and protein molecules and venoms may vary in scorpions belonging to the same species. On the other hand, the existence of some basic peptide structures (3555; 3772, 3996, 6780, 6820 Da; m/z) with the same mass value and found in these creatures that preserve their species characteristics against evolution have been observed.

Key words: Buthidae, *Leiurus abduallahbayrami*, MALDI-TOF MS, mass spectrometry, scorpion, venom

----- * -----

MALDI-TOF MS ile iki türdeş (*Leiurus abduallahbayrami*; Buthidae) akrep zehirindeki peptit ve proteinlerin karşılaştırmalı analizi

Özet

Bu çalışmada iki *Leiurus abduallahbayrami* akrep zehiri MALDI-TOF MS ile analiz edilerek peptit ve protein dağılımları karşılaştırılmıştır. Zehirlerin toplam protein miktarı 2mg/mL konsantrasyona eşit olacak şekilde hazırlandı. İki akrep zehirinin analizi için matris olarak alfa-siyano-4-hidroksi sinamik asit kullanıldı. Sistem 1-50 kDa kütle aralığında lineer pozitif iyon modunda çalıştırıldı ve iyon kaynağı olarak 337 nm'de 60 Hz nitrojen lazer kullanıldı. Kütle spektrumları, flex-Analysis yazılımı (sürüm 3.4) kullanılarak oluşturuldu. İki akrep venomundaki peptit ve proteinlerin dağılımının analizi için, her bir spektrumdaki en yüksek nispi bolluk 100 olarak kabul edildi ve diğer moleküllerin yüzde nispi bolluğu hesaplandı. Daha sonra hem iki akrebin venomlarındaki peptit ve protein profillerinin belirlenmesi hem de peptit ve proteinlerin orantısız farklılıkları veya benzerlikleri araştırıldı. Ek olarak, iki akrep venomunun spektrumlarındaki yüksek bolluktaki peptitlerin ve proteinlerin dağılımını haritalamak için peptit ve proteinlerin projeksiyonları sanal jel görüntüleri üzerinde değerlendirildi.

Sonuç olarak, aynı türe ait akreplerde peptit ve protein moleküllerinin ve nispi oranlarının değişebileceği deneysel olarak belirlenmiştir. Öte yandan evrime karşı tür özelliklerini koruyan bu canlılarda bulunan ve aynı kütle değerine sahip bazı temel peptit yapılarının (3555; 3772, 3996, 6780, 6820 Da; m/z) varlığı gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Akrep venomu, Buthidae, kütle spektrometre, *Leiurus abduallahbayrami*, MALDI-TOF MS

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +90312565524; Fax.: +90 31256555 69; E-mail: cevikiyasemin@yahoo.com

1. Giriş

Akrepler kutup bölgeleri ve bazı adalar dışında dünyanın her yerinde yaygın olarak yaşayan canlılardır. Dünyada yaklaşık 1500 akrep türü vardır [1]. Antartika ve Yeni Zelanda hariç, dünyadaki tüm tropikal, subtropikal ve kısmen ılıman sıcak kara kütlelerinde yaşarlar. Son 400 milyon yılda fenotipi büyük ölçüde değişmeden kalan bir eklem bacaklı grubudur. Eşsiz bir savunma aracı olarak kullanıldığında bazen felç edici ve ölümcül etkilere sahip olan akrep venomları, su, çeşitli tuzlar ve düşük molekül ağırlıklı peptit ve proteinler bulunan biyolojik bir salgıdır [2]. Akrepler, bu değerli venomu avlarını bastırmak ve yırtıcıları caydırmak için kullanırlar [3]. Akrep venomlarında bulunan toksik etki gösteren peptit ve proteinler avlarına aktarıldıktan sonra spesifik farmakolojik hedef dokulardaki iyon kanallarını etkileyerek nörotoksik etkiler gösterirler [4].

Leiurus abduhbayrami (*L. abduhbayrami*), Buthidae akrep ailesi'nden *Leiurus* cinsinin bir üyesidir [5]. Suriye ve Türkiye'de (Güneydoğu Anadolu bölgesi; Gaziantep, Adıyaman, Kilis, Şanlıurfa, Mardin illeri ve çevresinde) endemik olarak yaşayan sarı akrep olarak bilinmektedir [5, 6]. Buthidae familyasının üyesi olan akreplerin insanları sokmasının tehlikeli olduğu iyi bilinir, çünkü zehirleri memeli reseptörlerini tanıyan nörotoksinler içerir [7]. Bu ölümcül akrep zehirleri nöronal hücrelerde ve kalpte, düz ve iskelet kasında çeşitli voltaj kapılı sodyum, potasyum, kalsiyum veya klorür iyon kanallarını hedefleyen peptit toksinlerinden oluşur. Bu toksinlerin çoğu, iyon kanalı yapısındaki ince filogenetik farklılıkları tanıyan memeli veya böcek iyon kanallarına özgüdür [8]. Venom profillerinin analizi için jel elektroforezi [9,10] ve sıvı kromatografisi [11] gibi analitik yöntemler kullanılmaktadır. Hassas kütle spektrometrisi teknolojisinin gelişmesi ve veri işleme yeteneğine sahip tekniklerin ilerlemesi zehirlerin karakterizasyonunda proteomik yaklaşımların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu taksonomik konularla ilgilenen proteomik yaklaşımları kullanan araştırmaların sayısının artmasının yanı sıra, bu tür korelasyonlar LC/MS tabanlı metodolojiler tarafından bulunan türe özgü moleküler kütleler arasındaki basit karşılaştırmalara dayandırılmıştır [12]. Son on yılda venomlardaki peptit ve proteinlerin analizi için matriks destekli lazer desorpsiyon ve uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yönteminin kullanılması büyük kolaylık sağlamıştır [11, 13–16]. Bunun sebebi, MALDI-TOF MS, daha az reaktif ve daha az işlem gerektiren biyokimyasal, hatta moleküler tabanlı tanımlama yaklaşımları için hassas bir yöntemdir ve hızlı, uygulanması kolay ve uygun maliyetli bir tekniktir [17,18]. Venom bileşenlerinin proteomik analizi, taksonomide yararlı bir referans aracı olarak ve türlerin tanımlanması ve ilgili örneklerin sınıflandırılması için bir yöntem olarak kullanılabilir değerli bir parmak izi üretebilir.

L. abduhbayrami akrebi 2009 yılında Yağmur ve arkadaşları tarafından *Leiurus quinquestriatus* türünden farklılaştırılmıştır [5]. Bu zamana kadar *L. abduhbayrami* akrep venomunun tanımlanmasına yönelik farklı yöntemler kullanılarak birkaç çalışma yapılmıştır. Örneğin, Ozkan ve arkadaşları, *L. abduhbayrami* akrep venomunun SDS-PAGE jel elektroforez yöntemi ile analizini yaparak 4 ve 6 kDa 'da olan iki peptit bandı olduğunu tespit etmiştir [19]. Ulutaş tarafından ham *L. abduhbayrami* venomunun Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile kromatografik olarak ayrımı gerçekleştirildikten sonra kütle spektrometresi ile 6809.55 Da kütle değerindeki bir peptit saflaştırmıştır. LAB1 olarak adlandırılan peptitin karakterizasyonu yapılarak dizilimi aydınlatılmıştır [6]. Erdeş ve arkadaşları ise, mikro akışkan kılcal elektroforez ile *L. abduhbayrami* venomunun kütle spektroskopik yöntemle 1-2 kDa ve 3-4 kDa kütle aralığında sırasıyla %29 ve %31 kütle dağılımına sahip olduğu ve 1-7 kDa arasındaki 45 peptit kütlelerinin mevcut olduğunu tespit etmiştir [20].

Bu çalışmada, iki *L. abduhbayrami* akrebine ait venomların MALDI-TOF MS ile analizleri yapılarak, spektrumlarındaki peptit ve protein (P&P) moleküllerinin yüzde bağıllık bolluk değerleri hesaplanmıştır. Buna göre iki akrep venomunda bulunan (P&P) moleküllerinin oransal dağılımları değerlendirilmiştir. Ayrıca, kütle spektrumlarındaki peptit ve protein moleküllerinin izdüşümlerini içeren sanal jel profilleri oluşturulmuş, böylece yüksek bolluktaki moleküller ve her iki akrep venomunda da mevcut olan aynı kütle değerine sahip moleküllerin haritası çıkarılmıştır.

2. Materyal ve yöntem

L. abduhbayrami (LAB) akrepleri, Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Antivenom-Anti Serum Üretim Laboratuvarı (THSGM-ASÜL; Ankara, Türkiye) tarafından Türkiye'nin Doğu Anadolu bölgesindeki Şanlıurfa ilinden toplanmıştır. THSGM-ASÜL, uygun koşullarda canlı tutulan akreplerden düzenli olarak sağım yaparak çoklu venom karışımları oluşturmakta ve antivenom üretim çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada yazarlar tarafından canlı akreplere yönelik herhangi bir işlem yapılmamıştır. THSGM-ASÜL tarafından iki akrep venomunun kalite kontrol testlerini takiben antivenom çalışmalarına yönelik uygulamalar tamamlandıktan sonra artan iki venom laboratuvarımıza hibe edilmiştir.

MALDI matrisi olan alfa-siyano-4-hidroksi sinnamik asit (α -HCCA) ve RNAaz ve miyoglobin protein profilleri içeren *Escherichia coli* bakteri test solüsyonu Bruker'den (Almanya) satın alınmıştır. Matris çözeltisinin hazırlanması

için, asetonitril (ACN, HPLC derecesi; Sigma-Aldrich), trifloroasetik asit (TFA; Sigma-Aldrich), DNAaz ve RNAaz içermeyen 0.1 µm filtreli Ultra saf su (USS) kullanılmıştır.

2.1 Akrep Venom-Matriks Çözeltilerinin Hazırlanması ve MALDI-TOF MS Analizleri

LAB-123 ve LAB-460 kodlu iki akrep venomunun toplam protein miktarları Nano Ready Touch (Life Real) cihazı ile 280 dalga boyunda ölçülerek USS ile 2mg/mL konsantrasyona eşit olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra +4 °C'de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar ayrı ayrı polipropilen Eppendorf tüplere aktarılmış, ardından her birine 250 µL matriks çözeltisi (18 mg/mL α-HCCA %50 ACN ve % 2.5 TFA karışımı, 1:1; v/v) ilave edilmiştir. Paralel olarak hazırlanan 4 adet [(n=2) x2] akrep venom-matriks (AVMx) örnekleri 3000 rpm'de 2 dakika vortekslenmiştir.

MALDI-TOF MS ile peptit ve protein analizleri için özel çelik 96 mikro scout plakası (MSP; Bruker Daltonics) üzerine 1µL AVMx numunesi yüklenmiştir. Bu işlem her dört AVMx örneği için uygulanarak oda sıcaklığında tamamen kurumasına izin verilmiştir. AVMx örnekleri ile yüklü MALDI 96 MSP çelik plaka MALDI-TOF MS (Microflex-LT Bruker, Almanya) cihazına yerleştirilmiştir. Sistem 1-50 kilo Dalton (kDa) kütle aralığında lineer pozitif iyon modunda çalıştırılmış, iyon kaynağı olarak 337 nm'de 60 Hz nitrojen lazer kullanılmıştır. Spektrumları elde etmek için her bir peptit ve protein molekülünün ölçümünde 40 paketten oluşan 400'lük lazer darbeleri uygulanmıştır. Her spot örneği üç kopya halinde incelenerek en yüksek bağıl bolluktaki okumalar analize dâhil edilmiştir. MALDI-TOF MS için dâhili kalite kontrol işlemi, yedi tepe noktası (m/z, 5096.48312 Da; 5381.79550 Da; 6255.86327 Da; 7274.47901Da; 10298.4527 Da; 13682.9001 Da ve 16953.71117 Da) ölçülerek 59.65 standart sapma ve 75.50 ppm maksimum tepe hatası ile tamamlanmıştır.

2. Spektral Analizler

İki LAB (123 ve 460) akrep venom örneğinin analizleri MALDI-TOF MS cihazı ile peptit ve protein profillerinden oluşan kütle spektrumları aracılığıyla flex-Analysis yazılımı (versiyon 3.4) kullanılarak yapılmıştır. Kütle spektrumlarında her kütle sinyalinin tek bir moleküler boyutu temsil etmesinden dolayı çok değişkenli veriler olarak kabul edilmektedir ve örnekler arasında ayırım yapabilmek için çok değişkenli istatistiksel yöntemler kullanılmaktadır [21].

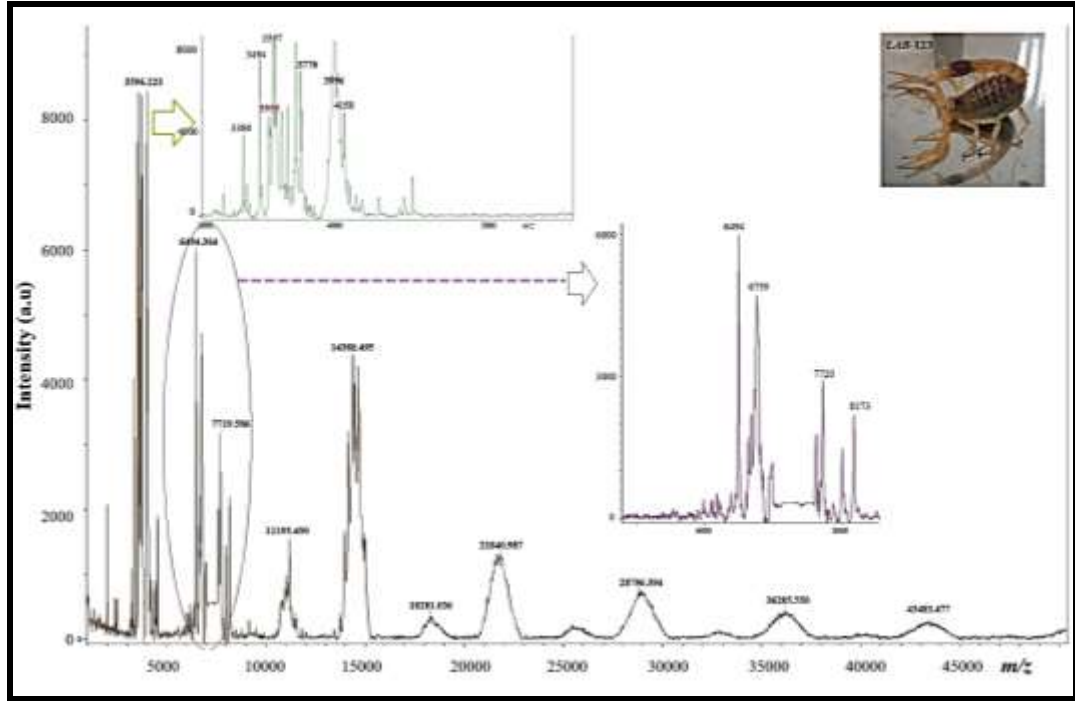
2.2. Temel Bileşen Analizleri

Tüm veriler, MALDI Biotyper yazılımına (3.1 sürüm) entegre edilmiş yerleşik MATLAB yazılımı tarafından desteklenen filo-proteomik temel bileşen analizi (TBA) yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. TBA, her bir spektrumdaki benzersiz peptit ve protein zirvelerine dayanarak benzer varyasyon özelliklerine sahip kümelenmiş spektrum gruplarının oluşturulmasına ve aralarındaki farkların görselleştirilmesine izin vermektedir. Filoproteomik-TBA ile veriler üç boyutlu koordinat sisteminde temsil edilip veri setinin boyutsallığı azaltılarak mevcut orijinal bilgi korunmaktadır. Analizi hızlandırmak ve veri kütesinin boyutunu azaltmak için her bir spektrum için optimize edilmiş ön prosedürler (düzeltme yöntemi: Savitski-Golay; çıkarma yöntemi: çoklu poligon; normalleştirme yöntemi) uygulanmıştır [22]. Venom spektrumlarındaki piklerin izdüşümünü bulunduran sanal jel görüntüleri (SJG) oluşturulmuştur. SJG'deki pembeden açık yeşile kadar değişen dikey izler spektrumdaki her bir pike karşılık gelmektedir ve düşük bağıl bolluktan (açık yeşil) yüksek bağıl bolluğa (pembe) kadar değişen bir renk skalası ile ifade edilmektedir. Bu dikey izlerin geniş alan kaplaması ve yoğun olması o ize ait piklerin % bağıl bolluk değerlerinin diğer piklere göre baskın olduğunu ifade etmektedir.

3. Bulgular

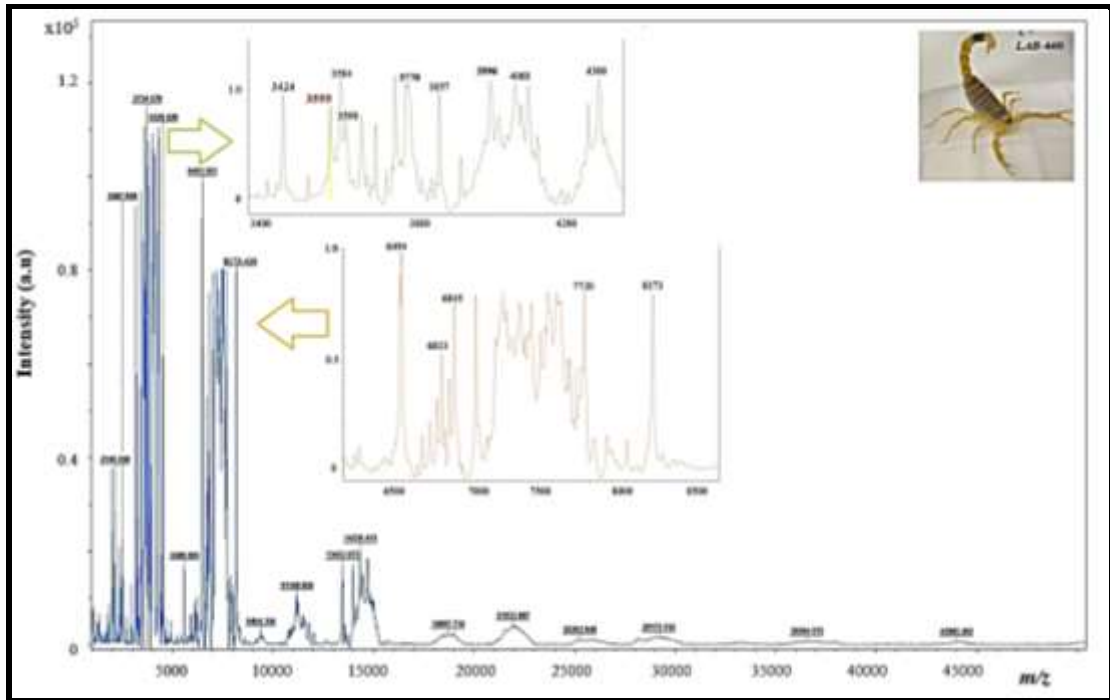
3.1. Spektral Analizler

Bu çalışmada, iki LAB (123 ve 460) akrep venomunu 1-50 kDa kütle aralığında MALDI-TOF MS ile analiz edilmiştir. Her bir örnek için özgün olan kütle spektrumu, lazer ile iyonlaştırılmış (M+H)⁺ formunda peptit ve protein moleküllerinden oluşmaktadır (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. LAB-123 Akrep venomunun MALDI-TOF MS Kütle Spektrumu (Microflex LT, Bruker)

LAB-123 ve LAB-460 Akrep venomlarının MALDI-TOF kütle spektrumları incelendiğinde peptit moleküllerinin (2-10 kDa) proteinlere (10-44 kDa) göre daha baskın bollukta olduğu gözlenmiştir. Her iki akrep venomunda, ortak olan yüksek bolluktaki peptit molekülleri (6494; 3770; 3996; 7720; 8173 Da; m/z) mevcut iken, protein moleküllerinin kütle değerlerinin her iki akrepte de farklılık gösterdiği gözlenmiştir. LAB-460 akrep venomundaki yüksek bolluktaki peptit sayısının LAB-123'e göre daha fazla olduğu da görülmektedir (Şekil 1 ve 2).



Şekil 2. LAB-460 Akrep venomunun MALDI-TOF MS Kütle Spektrumu (Microflex LT, Bruker)

Çalışmamızda LAB-123 ve LAB-460 akrep venomlarında tespit edilen peptit kütle değerleri ile Erdeş ve arkadaşlarının *L. abduallahbayrami* akrep venomlarının LC-ESI-TOF-MS ile yapılan analizlerden elde ettikleri sonuçlar [20] ile karşılaştırılmıştır (Tablo1).

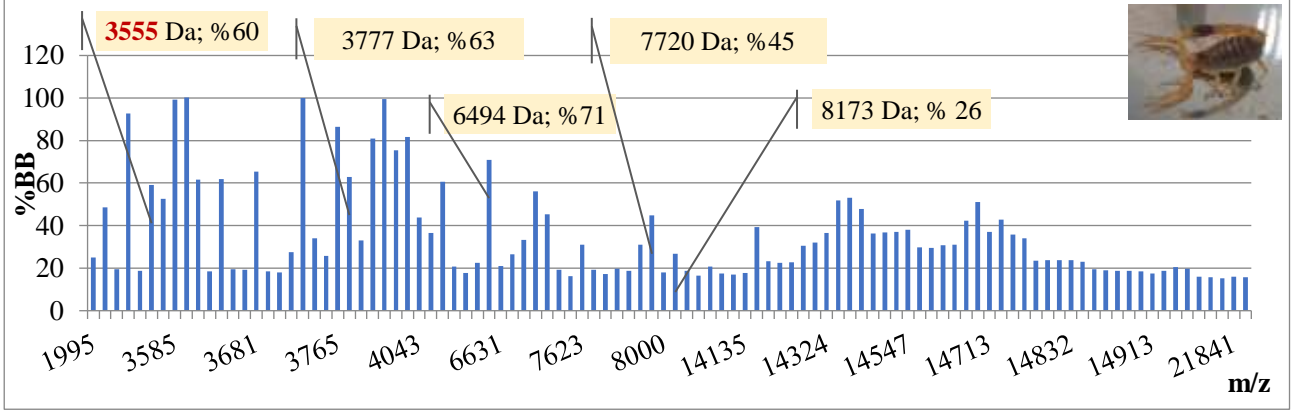
Tablo 1. MALDI-TOF MS ve LC-ESI-TOF-MS [20] ile tespit edilen *L. abduallahbayrami* akrep venom peptitleri

LC-ESI-TOF-MS[20]	MALDI-TOF MS			
<i>L. abduallahbayrami</i>	<i>L. abduallahbayrami</i> -123		<i>L. abduallahbayrami</i> -460	
(M+H) ⁺ Kütle değeri (Da)	(M+H) ⁺ Kütle değeri (Da)	%BB	(M+H) ⁺ Kütle değeri (Da)	%BB
2948	-	-	2949	11
2961	-	-	-	-
2988	-	-	-	-
3000	-	-	-	-
3024	-	-	-	-
3188	-	-	3184	82
3198	-	-	-	-
3234	-	-	3241	17
3555	3555	59	3555	76
3576	3585	99	3584	97
3591	3597	100	3598	65
3615	3607	62	3618	15
3630	3627	18	3642	69
3768	3765	87	3734	95
3772	3773	63	3770	90
3996	3996	99	3996	96
4000	4015	75	-	-
4056	4058	37	4068	93
4092	4085	21	4085	78
4168	-	-	4130	52
4540	4528	23	4528	55
5376	-	-	-	-
6780	6782	45	6783	17
6805	-	-	-	-
6810	6808	19	6813	36
6820	6819	16	-	-
6840	-	-	6845	67
6855	-	-	-	-
6895	-	-	-	-

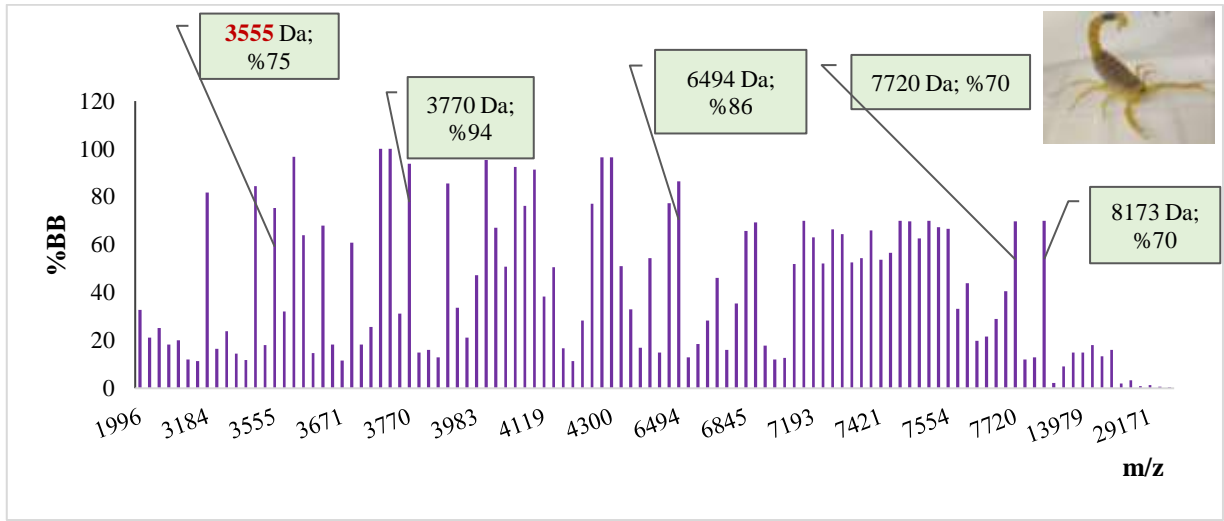
Erdeş ve arkadaşlarının *L. abduallahbayrami* akrep venomlarında tespit ettikleri kütle değerleri ile birebir eşleşen (2948, 3555, 3772, 3996, 6780, 6820 Da) peptit molekülleri olduğu gibi, en fazla ± 6 Da farkla (3188, 3591, 3615, 3630, 3768, 4056, 4092, 6810 ve 6840 Da; m/z) eşleşen peptitler de mevcuttur. Sonuç olarak, Erdeş ve arkadaşlarının tespit ettikleri 29 peptit molekülünün [20] kütle değerlerine yakın olan (± 10 farkla) LAB-123'te 10 adet ve LAB-460'ta ise 14 adet peptidin eşleştiği tespit edilmiştir.

3.2. Peptit ve protein dağılımlarının analizi

LAB-123 ve LAB-460 akrep venomlarındaki P&P dağılımlarının analizi için her iki venomun spektrumundaki en yüksek bağıl bolluk değeri 100 olarak kabul edilerek diğer moleküllerin yüzde bağıl bollukları (% BB) buna göre hesaplanmış ve kütle/yük (m/z) oranına göre dağılım profilleri oluşturulmuştur (Şekil 3 ve 4). LAB-123 Akrep venomunda 51 adet peptit (2-10 kDa kütle aralığında) ve 49 adet protein (10-44 kDa kütle aralığında) molekülü tespit edilmiştir. Peptitlerin 12 tanesinin %BB değeri 20'nin altında iken, 18 tane peptit %50'nin üzerinde bir bağıl bolluğa sahiptir. Özellikle, 3000-4100 Da kütle aralığındaki peptitlerin %60 ve üzerinde bağıl bolluğa sahip olduğu gözlenmiştir. Peptitler ile karşılaştırıldığında protein moleküllerinin bağıl bolluğu nispeten daha düşük düzeyde iken, sadece 14300-14700 Da aralığındaki protein moleküllerinin %50 civarında bağıl bollukta olduğu gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. LAB-123 Akrep venomunun MALDI-TOF MS peptit ve protein dağılımı (Microflex LT, Bruker)

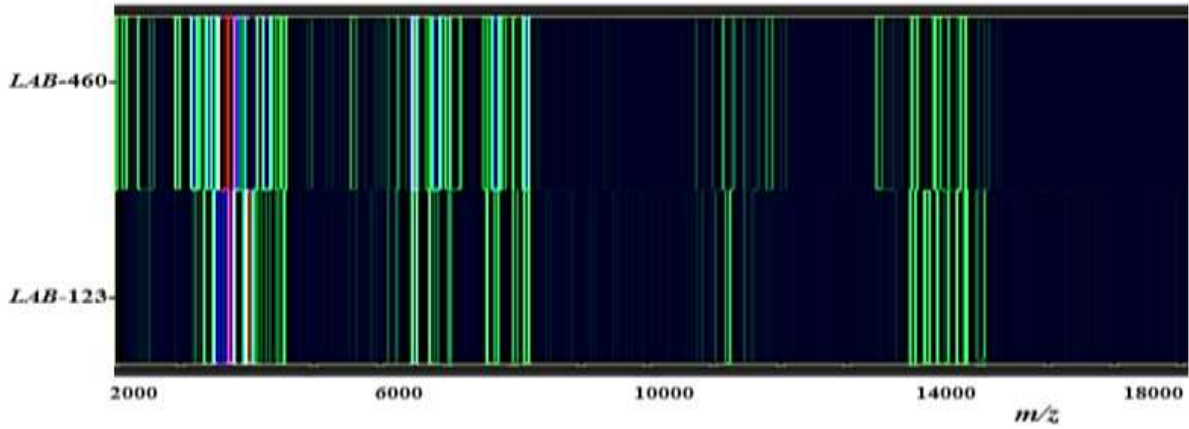


Şekil 4. LAB-460 Akrep venomunun MALDI-TOF MS peptit ve protein dağılımı (Microflex LT, Bruker)

MALDI-TOF MS analizi ile LAB-460 akrep venomunda 96 adet peptit, 12 adet protein molekülü tespit edilmiştir. 15 adet peptitin bağıl bolluğu %20'nin altında iken, 3100- 8100 Da aralığındaki %50'nin üzerinde bağıl bolluğa sahip olan 40 adet peptitin mevcut olduğu gözlenmiştir. Proteinlerin çoğunlukla %20'nin altında bağıl bollukta olduğu görülmektedir (Şekil 4). Her iki akrep venomunda ortak olan peptitlerin (6494; 3770; 3996; 7720; 8173 Da, m/z) % bollukları LAB-460 akrep venomunda daha yüksek (% 70'in üzerinde) oranlarda olduğu tespit edilmiştir.

3.3. Temel Bileşen Analizleri

Sanal jel görüntüsü (SJG) oluşturularak akrep venomlarındaki peptit ve protein piklerinin izdüşümleri değerlendirilmiştir. Peptit ve protein piklerinin spektral haritasının çıkarıldığı bu SJG profili üzerinde makroskopik inceleme yapıldığında akrep venomlarının spektrumlarında ortak olan tepe noktalarının var olmasının yanı sıra farklı peptit ve protein izdüşümlerinin mevcut olduğu net bir şekilde görülmektedir (Şekil 5). Örneğin, 2-8 kDa aralığında LAB-460 akrep venomunda LAB-123'e nazaran daha fazla peptit olduğu gözlenmektedir. Ayrıca 10 kDa üzerindeki protein moleküllerinin izdüşümlerinin her iki akrep venomunda da uyumlu olduğu gözlenmiştir. Yüksek % BB değerlerine sahip olanların düşük olanları SJG'lerdeki görüntülerini baskılaması nedeniyle bazı dikey izdüşümlerin az fark ediliyor olduğu görülmektedir.



Şekil 5. LAB-123 ve LAB-460 akrep venomlarının MALDI-TOF MS–MATLAB- sanal jel görüntüleri

4- Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışmada, aynı türe (*Leiurus abduhbayrami*) ait iki akrep venomunun MALDI-TOF MS analizleri yapılmış, kütle spektrumlarının ve peptit ve protein dağılımlarında %BB değerlerinde farklılıklar olduğu gözlenmiştir. LAB-123 akrep venomunda peptit ve proteinlerin oranı yarı yarıya iken, LAB-460 akrep venomunda peptitlerin çoğunlukta ve yüksek bağıl bollukta olduğu gözlenmiştir. LAB-123 akrep venomunda 3000-4100 Da kütle aralığındaki peptitler %60 ve üzerinde bağıl bolluğa sahip iken, protein moleküllerinin bağıl bolluğu nispeten daha düşük düzeydedir. Bunun yanı sıra 14300-14700 Da aralığındaki protein moleküllerinin %50 civarında bağıl bollukta olduğu gözlenmiştir. LAB-460 akrep venomunda ise, 3100-8100 Da aralığındaki peptit moleküllerin yaklaşık %50 sinin bağıl bolluklarının %50'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Her iki akrep venomunun sanal jel profilleri incelendiğinde LAB-460 akrep venomundaki peptit moleküllerinin dağılımının LAB-123 akrep venomuna göre daha yaygın ve baskın olduğu gözlenmiştir. Ulutaş'ın *L. Abdullahbayrami* akrep venomlarında tespit ettiği 6809 Da kütle değerine sahip olan peptit molekülüne (LAB1) yakın kütle değerindeki peptit molekülü LAB-460 (6813 Da) ve LAB-123 (6808 Da) akrep venomlarında düşük bağıl bolluk değerlerinde de olsa sırasıyla %36 ve %19 oranında tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki LAB-123 ve LAB-460 akrep venomlarının peptit kütle değerleri, Erdeş ve arkadaşlarının *L. abduhbayrami* akrep venomlarının LC-ESI-TOF-MS yöntemi ile analizlerinden elde ettikleri veriler ile çalışmamızdaki veriler karşılaştırıldığında benzer kütlelere sahip altı peptitin birebir eşleştiği, bunun yanı sıra en fazla ± 10 Da kütle farkındaki peptitlerin bol miktarda (LAB-123'te 10 adet ve LAB-460'ta ise 14 adet) olduğu gözlenmiştir. Erdeş ve arkadaşlarının çalıştığı *L. abduhbayrami* akrep venomunda da mevcut olan 3555 Da kütle değerine sahip olan peptitin LAB-123'te %55 ve LAB-460'ta ise %76 bağıl bollukta mevcut olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, 3772 Da ve 3996 Da değerinde tespit ettikleri peptitlere [20] çok yakın kütle değerindeki peptitlerin de her iki venomda da mevcut olduğu gözlenmiştir.

Akrep venomlarının toksisiteleri içerdikleri peptit ve proteinlerden kaynaklanmaktadır [23]. Akrepler bireysel toksinlerin toplamından (toksin sinerjizmi) daha büyük potansiyele sahip zehirler üretmek üzere evrimleşmiştir [24]. Venom salgısı, akrebin boyutundan, açlığının derecesinden ve bezde kalan venom miktarından mevsimsel ve cinsiyete dayalı değişikliklere kadar sayısız faktörden etkilenebilmektedir [25].

Sonuç olarak, akreplerin doğal yaşamda varoluşlarını destekleyen ve sağlayan özgün silahları olan venomlarında bulunan peptit ve protein moleküllerinin kütle değerleri onları meydana getiren aminoasitler ve bunlara bağlı olan yapıların kütleleri ile orantılı olarak değişmektedir. Çalışmamızda, bu moleküllerin yapısının ve venomdaki bağıl oranları yukarıda belirtildiği gibi birçok sebepten dolayı aynı türe ait olsalar bile değişiklik gösterdiği deneysel olarak ispat edilmiştir. Öte yandan evrimleşmeye karşı tür karakteristiğini koruyan bu canlıların, farklı teknikler olmasına rağmen prensipte aynı olan metodlar ile analiz edildiklerinde temel peptit ve protein yapılarının (3555 Da; 3772 Da, 3996 Da, 6780 Da, 6820 Da) tespit edilmesinin mümkün olduğu da görülmektedir.

Teşekkür

THSGM-ASÜL'e sağlanmış akrep venom numunelerini laboratuvarımıza hibe ettiği için çok müteşekkirimiz.

Çıkar çatışması

Yoktur.

Kaynaklar

- [1] Rincón-Cortés, C.A., Olamendi-Portugal T., Carcamo-Noriega E.N., Santillán E.G., Zuñiga F.Z., & Reyes-Montaño, E.A. (2019). Structural and Functional Characterization of Toxic Peptides Purified from the Venom of the Colombian Scorpion *Tityus Macrochirus*. *Toxicon*, 169, 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.07.013>.
- [2] Salama, W.M. & Sharshar, K.M. (2013). Surveillance study on scorpion species in Egypt and comparison of their crude venom protein profiles. *J. Basic Appl. Zool.*, 66(2), 76-86. doi: 10.1016/j.jobaz.2013.10.003.
- [3] Schaffrath, S. & Predel, R. (2014). A simple protocol for venom peptide barcoding in scorpions. *EuPA Open Proteomics*, 3, 239-245. doi: 10.1016/j.euprot.2014.02.017.
- [4] Oukache, N., Rossoa, J.P., Alamia, M., Ghalimb, N., Sailec, R., Mohammed, H., et.al. (2008). New analysis of the toxic compounds from the *Androctonus mauretanicus* mauretanicus scorpion venom. *Toxicon*, 51(5), 835-852. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.12.012.
- [5] Yağmur, E.A., Koç, H., & Kunt, K.B. (2009). Description of a new species of *Leiurus ehrenberg*, 1828 (Scorpiones: Buthidae) from Southeastern Turkey. *Euscorpius*, 85, 1-20. doi: 10.18590/euscorpius.2009.vol2009.iss85.1.
- [6] Ulutaş, V. (2017). *Leiurus abduhbayrami Türü Akrep Venomunun Proteomik Analizi* (Y.lisans tezi). Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [7] Çalişkan, F., Sivas, H. & Şahin, Y. (2009). A preliminary study for the detection of gelatinolytic proteases from the scorpion *Androctonus crassicauda* (Turkish black scorpion) venom. *Turkish J. Biochem.*, 34(3), 148-153.
- [8] Newton, K.A., Clench, M R., Deshmukh, R., Jeyaseelan, K., & Strong, P. N. (2007). Mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of the Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*: biotope-specific variation in the expression of venom peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21(21), 3467-3476. doi: 10.1002/rcm.3240.
- [9] Borges, A. & Rojas-Runjaic, F.J.M. (2007). *Tityus perijanensis* González-Sponga (Scorpiones, Buthidae): Molecular assessment of its geographical distribution and venom lethality of Venezuelan populations. *Toxicon*, 50(7), 1005-1010. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.07.019.
- [10] Estrada-Gómez, S., Vargas-Muñoz, L.J.M, Saldarriaga-Córdoba, M. & van der Meijden, A. (2021). MS/MS analysis of four scorpion venoms from Colombia: A descriptive approach. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 27, 1-13. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0173.
- [11] Bringans, S., Eriksen, S., Kendrick, T., Gopalakrishnakone, P., Livk1, A., Lock, R. (2008). Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion). *Proteomics*, 8(5), 1081-1096. doi: 10.1002/pmic.200700948.
- [12] Nascimento, D.G., Rates, B., Santos, D.M., - Braga, T.V., Barbosa-Silva, A., & Dutra A.A.A. et al., (2006). Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon*, 47(6), 628-639. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.01.015.
- [13] Favreau, P., Menin, L., Michalet, S., Perret, F., Cheneval, O., & Stoćklin, M., et al. (2006). Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*, 47(6), 676-687. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.01.020.
- [14] Martin-Eauclaire, M.F., Granjeaud, S., Belghazi, M., & Bougis, P.E. (2013). Achieving automated scorpion venom mass fingerprinting (VMF) in the nanogram range. *Toxicon*, 69, 211-218. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.001.
- [15] Schaffrath, S., & Predel, R. (2014). A simple protocol for venom peptide barcoding in scorpions. *EuPA Open Proteomics*, 3, 239-245. doi: 10.1016/j.euprot.2014.02.017.
- [16] Abbas, N.M., Belghazi, Y., Abdel-Mottaleb, J., Tytgat, P., Bougis, E., & Martin-Eauclaire, M.F.(2008). A new Kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 376(3), 525-530. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.033.

- [17] Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X. & Hocquet, D. (2017). Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?. *Trends Microbiol.*, 25(6), 447-455. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.006.
- [18] Smith, J.J., Jones, A. & Alewood, P.F. (2012). Mass landscapes of seven scorpion species: The first analyses of Australian species with 1,5-DAN matrix. *J. Venom Res.*, 3, 7-14.
- [19] Ozkan, O., Yagmur, E.A. & Ark, M. (2011). A newly described scorpion species, *Leiurus abduallahbayrami* (Scorpion: Buthidae), and the lethal potency and in vivo effects of its venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 17(4), 414-421. doi: 10.1590/S1678-91992011000400008.
- [20] Erdeş, E., Doğan, T.S., Coşar, İ., Danişman, T., Kunt, K.B., & Şeker, T., et al., (2014). Characterization of *Leiurus abduallahbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 20(1), 48. doi: 10.1186/1678-9199-20-48.
- [21] Samad, R.A. & Al Disi, Z. (2020). The use of principle component analysis and MALDI-TOF MS for the differentiation of mineral forming *Virgibacillus* and *Bacillus* species isolated from sabkhas. *R. Soc. Chem.*, 10, 14606-14616. doi: 10.1039/d0ra01229g.
- [22] Jeong, Y., Lee, J. & Kim, S. (2013). Discrimination of *Bacillus anthracis* Spores by Direct in-situ Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. 34(9), 2635-2639.
- [23] Ducancel, F. (2016). Les venins au service de la recherche médicale. *Biol. Aujourd'hui.*, 210(2), 89-99. doi: 10.1051/jbio/2016016.
- [24] Pucca, M.B., Ahmadi, S., Cerni, F.A., Ledsgaard, L., Sørensen, C.V., & McGeoghan, F.T.S. et al. (2020). Unity Makes Strength: Exploring Intraspecies and Interspecies Toxin Synergism between Phospholipases A2 and Cytotoxins. *Front. Pharmacol.*, 11. doi: 10.3389/fphar.2020.00611.
- [25] Morgenstern, D., & King, G.F. (2013). The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon*, 63(1), 120-128. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.11.022.