

ANDROCTONUS CRASSICAUDA TOKSİN SCX8 İLE ASETİLKOLİN NİKOTİNİK RESEPTÖR ETKİLEŞMESİNDE GXXXG MOTİFİNİN ROLÜ

The role of GXXXG motif on the interaction of SCX8 toxin of *Androctonus crassicauda* and acetylcholine nicotinic receptor.

Ayça ÇAKMAK (0000-0003-1767-782X)

ÖZET

Amaç: Dünyanın en zehirli akrepleri arasında bulunan *Androctonus crassicauda*, Türkiye’de önemli envenomasyon nedenleri arasında yer alır; ancak üzerinde yeterince farmakolojik çalışma bulunmamaktadır. Bu türün venomunda bulunan SCX8 isimli toksinin sodyum kanalı özelliğindeki nikotinik reseptörler ile etkileşmesinde GXXXG (GG4) motifinin rolü araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan uniprot.org veri bankasından protein bilgileri indirilmiş, Linux işletim sistemi GNU/Bash komutları kullanılarak insan nikotinik reseptör ve akrep SCX8 toksin bilgileri ekstrakte edilmiştir. Clustal omega programı ile nikotinik reseptörler ve SCX8 toksin dizileri sıralanmış ve GG4 motif ilişkileri saptanmıştır. R programlama dili kullanılarak SCX8 toksinine ait amino asit dağılımları işlenmiş ve gösterilmiştir.

Bulgular: SCX8 toksini ile insan nikotinik reseptörleri arasından sadece ACM3 alt biriminde GG4 motif benzerliği bulunduğu görülmüştür.

Sonuç: Türkiye’de önemli bir zehirlenme nedeni olan *Androctonus crassicauda* türünde bulunan SCX8 toksininin etki yöresi arasında ACM3 nikotinik reseptör alt biriminin rolü olabileceği, *Androctonus crassicauda* ile envenomasyon sonucunda gözlenen enflamatuvar reaksiyonların, SCX8 toksini ile ACHA3 nikotinik reseptör alt birimi arasındaki bu etkileşmeye bağlı olabileceği ve bu spesifik etkisine bağlı olarak SCX8’in yeni ilaç geliştirilmesinde önemli rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: GXXXG motif; Toksin; Nikotinik reseptör; Biyoinformatik

ABSTRACT

Objectives: *Androctonus crassicauda* is one of the deadly scorpions of the world and one of the important cause of envenomation lacking sufficient pharmacological investigations. Objective of this study is to investigate the role of GXXXG (GG4) motif on the interaction of one of the toxins of this scorpion named SCX8 and nicotinic receptors.

Materials and Methods: Data on toxins were downloaded from the uniprot.org database, extracted and processed using GNU/Bash commands of Linux operating system. Nicotinic receptor subunits and SCX8 toxin sequences were aligned using Clustal omega software. The amino acid distribution of the SCX8 toxin was depicted using the R programming language.

Results: Presence of GG4 motif similarity was only found on ACM3 subunit of sodium channels and the toxin SCX8.

Conclusion: ACM3 subunit of nicotinic acetylcholine receptor may be a site of action of the toxin SCX8 of *Androctonus crassicauda*, which is an important envenomation factor, and this specific interaction indicating the role of SCX8 on the inflammatory reactions due to envenomations of this scorpion venom and suggesting this toxin may have a role in the new drug development studies.

Keywords: GXXXG motif; Toxin; Nicotinic receptor; Bioinformatics

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp
Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı,
Yozgat

Ayça ÇAKMAK, Dr. Öğr. Üyesi

İletişim:

Dr. Öğr. Ayça ÇAKMAK,
Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp
Fakültesi Zemin Kat Hemodiyaliz
Nefroloji Kliniği Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı YOZGAT
Tel: +90 532 4885791
e-mail:
ayca.cakmak@bozok.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 10.02.2019

Kabul tarihi/Accepted: 20.02.2019

DOI: 10.16919/bozoktip.525167

Bozok Tıp Derg 2019;9(1):134-38
Bozok Med J 2019;9(1):134-38

GİRİŞ

İlaçların etki gösterebilmek için bağlandıkları yörelerin başında genellikle hücre zarında bulunan reseptör, enzim ve iyon kanalları bulunmaktadır. Reseptörlerin önemli bir kısmını oluşturan G proteini ile ilişkili reseptörler, G proteinleri ve iyon kanalları ile etkileşerek etki göstermektedir. İlaçların bağlanma bölgelerinde bulunan bu özelliğin ilaç etkisinde ve ilaç geliştirme çalışmalarında önemli olduğu bildirilmiştir (1). İlaç etki bölgeleri arasında G protein ile çalışan reseptörlerin yanısıra, ilaç etkisinde çok önemli bir diğer grup olan iyon kanalları da protein-protein etkileşmesi ile çeşitli alt birimleri arasında dimerizasyona ve heteromerizasyona uğramaktadırlar (2,3). Protein-protein etkileşmesinde son yıllarda motiflerin önemli olduğu (4) ve motifler arasında GXXXG (GG4) motifi gibi özel protein bölgelerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (5).

Zehirli ve ölümcül etkisi olan ve Türkiye’de bulunan akrep venomlarında bulunan protein yapısındaki toksinlerin sodyum ve potasyum iyon kanalları ile etkileştiği gösterilmiştir (6, 7). Ülkemizde bulunan akrepler ve bu akrep venomlarında bulunan toksinler üzerinde yapılan çalışmaların genellikle akreplerin neden olduğu envenomasyona bağlı klinik çalışmalar (8, 9) ve anti-venom çalışmaları şeklinde olduğu görülmektedir (10, 11). Akrep venomları ve bu venomları oluşturan toksinlerin gerek yapısal gerek farmakolojik özellikleri hakkında çok az çalışma bulunmaktadır (6, 7, 12-14). *Androctonus crassicauda* akrep türü, Türkiye’de önemli bir envenomasyon nedenidir. Bu akrep türünün venomunda bulunan toksinlerin özellikle sodyum kanalları üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (6). Bu nedenle, bu türe ait venomda bulunan toksinlerden biri olan SCX8 ile sodyum kanallarında bulunan GG4 motifi arasında motif benzerliklerinin olabileceği hipotezi kurulmuştur. Bu çalışmada, *Androctonus crassicauda* toksinlerinden birisi olan SCX8 toksini ile insan nikotinik reseptör ve sodyum kanalları arasında GG4 motifi açısından benzerliğin biyoinformatik yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Linux işletim sisteminin parçası olan GNU/Bash komutları, wget (ver. 1.19.5), tar (ver. 1.29), grep

(ver. 2.25), sed (ver. 4.2.2), less (481) ve vim (ver. 7.4) kullanılmıştır. İnsan nikotinik reseptör ve sodyum kanal yapılarına ait bilgiler uniprot veri bankasından (www.uniprot.org) indirilmiş, gzip ve tar kullanılarak paketlenmiş olan fasta formatındaki belge açılarak bilgilere erişim sağlanmış, grep komutu kullanılarak gerekli bilgiler ekstrakte edilmiş ve yeni bir dosya içine yazdırılmıştır. Elde edilen bilgilerin edit işlemi için sed ve vim kullanılmıştır. Protein dizilerinin sıralanması ve karşılaştırmalı olarak gösterimi için bu amaçla özel olarak yazılmış olan Clustal omega (ver. 1.2.4) kullanılmıştır (15). Veri bankasından elde edilmiş olan ve 4 milyon satırdan daha fazla protein bilgisinden oluşan belge içinden istenilen bilgilerin, örnek olarak alfa1-adrenerjik reseptör bilgisinin alınabilmesine ve yeni bir dosya içine yazdırılabilmesine olanak veren tek satırlık grep komut örneği aşağıdaki gibidir:

```
~$ grep \\\|ADA1A_HUMAN -A 1 uniprot_sprot.fasta > yenibelge.txt
```

Oluşturulan ‘yenibelge’ daha sonra edit edilmesi gerekli olduğunda vim programı kullanılmıştır. Aynı yeni belge içine, *Androctonus crassicauda* akrep venomu içinde bulunduğu gösterilmiş olan SCX8 toksinine ait bilginin alınması gerekli olduğunda, yukarıdakine benzer şekilde komut kullanılarak Clustal omega ile işlenebilecek bir belge oluşturulmuştur:

```
~$ grep \\\|SCX8_ANDCR -A 1 uniprot_sprot.fasta >> yenibelge.txt
```

Clustal omega ile işlenen bilgi ayrı bir dosya içine yazılı olarak diske alınmış ve motif benzerliklerine ait bilgiler elde edilmiştir. Elde edilen sodyum iyon kanalları ve nikotinik reseptör alt birimleri ile *Androctonus crassicauda* venomunda bulunan SCX8 protein dizimleri karşılaştırılmıştır.

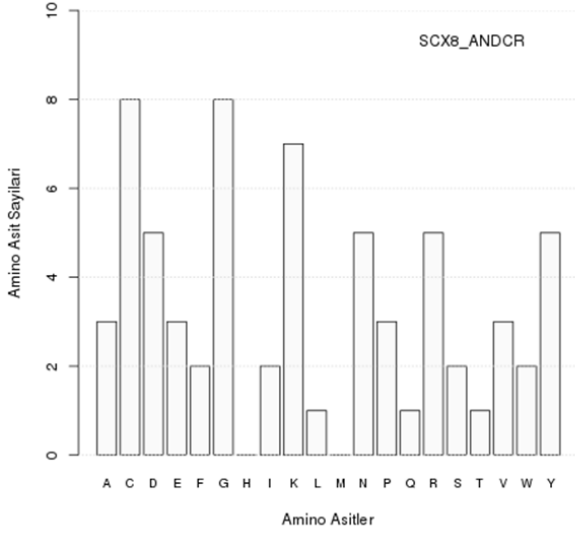
Proteinlerin amino asit dağılımlarına ait bilgiler GNU/Linux komutları yardımıyla elde edilmiş ve R programlama dili kullanılarak grafik şekline getirilmiştir (16).

BULGULAR

SCX8 toksini, tirozinden zengin bir GG4 motifine sahiptir ve tirozin amino aside motifin sonunda bulunan glisin amino asidinden sonra yerleşmiştir. Tirozince zengin

(Şekil 1) ve GXXXGY yapısında bulunan GG4 motifi ile benzerliği araştırılan nikotinik reseptör ve sodyum iyon kanal alt birimleri arasında benzerlik özelliği gösteren

yapının, ACHA3 adındaki sodyum iyon kanal alt birimi olduğu bulunmuştur (Şekil 2).



Şekil 1 Androctonus crassicauda SCX8 toksin yapısındaki amino asitlerin dağılımı. Tirozin amino asit (Y) oranındaki yükseklik dikkat çekicidir.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----
SPIP322971ACHA3_HUMAN  MGSGLSLPLALSPRLLLLLLLSLLPVARASEAERHLFERLFEDYNEIIRPVANVSDPV  60

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----
SPIP322971ACHA3_HUMAN  I IHFEVSMSQLVKVDEVNQIMETNLNLKQIHNDYKLKHNPSDYGGAEFMRYPAQKIWKPD  120

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----
SPIP322971ACHA3_HUMAN  I VLYNNAVGVDFQDDKTKALLKYTGVEVTHIPPAIFKSSCKIDVTYFPFDYQNCIMKFGSW  180

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----
SPIP322971ACHA3_HUMAN  S YDKAKIDLVLIGSSMNLKDYWESGEWAIKAPGYKHDIKYNCCCEIYPDITYSLYIRRL  240

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----
SPIP322971ACHA3_HUMAN  P LFYITINLIIPCLLISFLTVLVFVLPSCGKQVTLCTISVLLSLTVFLLVITETIPSTSLV  300

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----
SPIP322971ACHA3_HUMAN  I PLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFLNVHYRTPHTHTMPSWVKTVFLNLLPRVMFTRPT  360

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----VVDGKNTFFCGRNAYCNDECKKGGESGYCQNASPYGNACWCYK  50
SPIP322971ACHA3_HUMAN  S NEGNAQKPRPLYGAELSNLNCF-SRAESKGCKEGYPCDGMCGYCHIRRIKIS-NFSAN  418
      * *  :: **  ... *::  :.*.***:  .  :: :

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR  LPD-----RYP-IKEK-----GRCNG-R-----  66
SPIP322971ACHA3_HUMAN  L TRSSSSEVDVLSLSALSPEIKEAIQSVKVIENMKQAQNEAKEIQDDMKYVAMVIDRI  478
      *          * * *          :.: . :

SPIM1JMR81SCX8_ANDCR -----
SPIP322971ACHA3_HUMAN  F LWVFTLVCILGTAGLFQPLMAREDA  505
    
```

Şekil 2 Androctonus crassicauda toksini SCX8 ile insan sodyum iyon kanal alt birimi ACHA3 arasındaki GG4 motif benzerliğinin gösterilmesi. Siyah taralı alan GG4 motifinin bulunduğu alanı göstermektedir. Yıldız işareti iki protein arasındaki eşdeğer amino asitler için, nokta ve üst üste çift nokta ise amino asitlerin benzer gruplarda olması nedeniyle Clustal omega tarafından otomatik olarak konulmuş işaretleri göstermektedir. Satır sonlarındaki sayılar, proteindeki amino asit sıra numarasını göstermektedir.

TARTIŞMA

Farmakolojik araştırmaların genel amacı uzun yıllardan beri, insan sağlığı yararına olmak üzere etken maddelerin araştırılması, keşfedilmesi ve klinik kullanımı olmuş ve bu hedefe giden yolda kullanılan yöntemlerde sürekli bir gelişme kaydedilmiştir. Günümüzde ilaç araştırmaları için kullanılan yöntemler, in vivo, in vitro ve in siliko olmak üzere sınıflandırılabilir (17). İn siliko yöntemler, yakın zamanda gelişmiş, gelişmeye devam etmekte olan ve birden fazla yöntemin kullanıldığı yöntemler grubu olarak karşımıza çıkmaktadır. Moleküler biyoloji de dahil olmak üzere birçok alandaki bulguların ilaç geliştirme amacıyla kullanılması ile in siliko farmakoloji olarak da adlandırılan alt bilim dalı başlamıştır (17). Bu yöntemler ile daha önce elde edilmiş olan çok sayıda veri (data) yığını içinde kaybolmadan, veriler arasında yeni ilişkiler kurabilmek ve yeni bilgilere ulaşabilmek olanağı bulunmaktadır. Bu amaçla bilgisayar sistemleri, yazılımları ve internet üzerinden erişilebilen bilgi bankaları kullanılmaktadır. Son yıllarda yazılım, donanım ve internet teknolojisinin gelişmesi ile birlikte reseptörler, iyon kanalları ve enzimlerle ilişkin bilgiler bilgi bankalarında toplanmaya başlamıştır. Toplanan bu bilgi yığınının işlenmesi gereklidir ve bu amaçla Clustal omega gibi çok sayıda yazılım ortaya çıkmıştır (15, 18). Bunlara ek olarak, ilaç geliştirme maliyetlerinin uzun zaman alması ve çok yüksek olması daha verimli yöntemlere olan gereksinimin artmasına neden olmuştur (19). İn siliko yöntemler sayesinde, birden fazla farklı alanda çalışan ekipler ile ve çok fazla maliyet, çok fazla kimyasal madde kullanımı ve çok uzun zaman sonucunda elde edilebilecek sonuçlara daha kısa zamanda, daha az maliyetle ve moleküler düzeyde erişebilme olanağı mümkün hale gelmektedir (20).

Tıbbi ve biyolojik alandaki bilgilerin gelişmesinin başlangıcında venoma sahip canlıların olması, bugün tıp ile ilgili tüm dallarda yılanın simgesel öneminden de anlaşılabilir. Günümüzde çok yeni bir yöntem olan in siliko farmakolojik yöntemlerin uygulandığı alanlardan birisinin gene venomlar ve toksinler olması çok da şarttır olmamıştır (21).

SCX8 toksini ile ACHA3 sodyum iyon kanalının, protein etkileşmesinde önemi gösterilmiş olan (5) benzer GG4

motifi taşıdığı bu çalışmada ilk kez gösterilmiş ve literatüre kazandırılmış olması, venomlarda bulunan toksinlerin ne denli spesifik ve önemli olabileceğini göstermiştir.

Enflamatuvar reaksiyonlar, *Androctonus crassicauda* ile envenomasyon sonucunda gözlenen semptomlar arasında bulunmaktadır (6,8,12). Enflamasyon ile ilgili reaksiyonlarda histamin ve arajidonik asit mekanizmaları ilk akla gelen mekanizmalardır (22). Ancak kolinerjik reseptörlerin de enflamasyonda önemli rol oynadıkları son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (23). *Conus* gibi bazı deniz salyangozlarında bulunan nörotoksinlerin nikotinik reseptörler ile etkileştiğinin gösterilmiş olması (24), *Androctonus crassicauda* toksinlerinden birisi olan SCX8 (25) ile nikotinik reseptör alt birimlerinden birisi olan ACHA3 (26) arasında GG4 motif benzerliği nedeniyle bir etkileşmenin varlığını düşündürmüştür. *Androctonus crassicauda* ile envenomasyon sonucunda gözlenen enflamatuvar reaksiyonların, SCX8 toksini ile ACHA3 nikotinik reseptör alt birimi arasındaki bu etkileşmeye bağlı olabileceği bu çalışmada ileri sürülmektedir.

Akreplere, çok zehirli bile olsa, adeta keşfedilmeyi bekleyen bir ilaç deposu olarak bakılması da mümkündür (27). Eldeki veriler çerçevesinde, günümüzde ne SCX8 toksinine ilişkin ne de bu toksin ile benzer GG4 motifine sahip olan insan sodyum iyon ACHA3 kanal alt birimi için yeterince bilgi yoktur. Sıradışı bir benzerliğin hangi şekilde ve derece önemli olduğunu bugün için söylemek olanağı yoktur, bu eksikliğin giderilmesi için in vitro ve in siliko yöntemler ile yeni çalışma ve bulgulara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heteromization and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31:124-130.
2. Li K, Jiang Q, Bai X, Yang YF, Ruan MY, Cai SQ. Tetrameric assembly of K⁺ channels requires ER-located chaperone proteins. *Molecular Cell* 2017;65:52-65.
3. Aslanoglou D, Alvarez-Curto E, Marsango S, Milligan G. Distinct agonist regulation of muscarinic acetylcholine M2-M3 heteromers and their corresponding homomers. *J Biol Chem.* 2015;290:14785-96.
4. Gendron L, Cahill CM, von Zastrow M, Schiller PW, Pineyro G. Molecular pharmacology of delta-opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 2016;68:631-700.

5. Teese MG, Langosch D. Role of GXXXG motifs in transmembrane domain interactions. *Biochemistry* 2015;54:5125-35.
6. Caliskan F, García BI, Coronas FI, Batista CV, Zamudio FZ, Possani LD. Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. *Toxicon*. 2006;48:12-22.
7. Diego-García E, Peigneur S, Debaveye S, Gheldof E, Tytgat J, Caliskan F. Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae). *Toxicon*. 2013;61:72-82.
8. Yılmaz F, Arslan ED, Demir A, Kavalci C, Durdu T, Yılmaz MS, Yel C, Akbulut S. Epidemiologic and clinical characteristics and outcomes of scorpion sting in the southeastern region of Turkey. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2013;19(5):417-22.
9. Dokur M, Dogan M, Yagmur EA. Scorpion-related cardiomyopathy and acute pulmonary edema in a child who is stung by *Leiurus abduhbayrami*. *Turk J Emerg Med.* 2017;17(3):104-108.
10. Tulga T. Türkiye akrepleri ve Türkiye'de hazırlanmış anti *Androctonus crassicauda* akrep serumunun paraspesifik etkisi. *Türk Hij Tecr Biol Derg.* 1964;24:146-155.
11. Ozkan O, Yağmur EA. Neutralization Capacity of Monovalent Antivenom Against Existing Lethal Scorpions in the Turkish Scorpionfauna. *Iran J Pharm Res.* 2017;16:653-660.
12. Altınkurt O, Altan M. Urfa yöresi akrep (*Androctonus crassicauda*) zehirinin deney hayvanlarındaki farmakolojik etkileri ile bu etkilerden bir çoğuna streptomisin'in antagonistik cevapları. *Ankara Üniv Ecz Fak Derg.* 1980;10:41-60.
13. Uçar G, Taş C. Cholinesterase inhibitory activities of the scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Buthidae) venom peptides. *FABAD J Pharm Sci.* 2005;28:61-70.
14. Erdeş E, Doğan TS, Coşar I, Danişman T, Kunt KB, Seker T, Yücel M, Ozen C. Characterization of *Leiurus abduhbayrami* (Scorpiones: Buthidae) venom: peptide profile, cytotoxicity and antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014;20:48.
15. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011;7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75
16. R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Erişim adresi: <http://www.r-project.org/>
17. Noori HR, Spanagel R. In silico pharmacology: drug design and discovery's gate to the future. *In Silico Pharmacology* 2013; 1:1-2.
18. Uniprot Consortium. Uniprot: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucl Acid Res.* 2018; 47:D506-15.
19. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ.* 2003; 22:151-185.
20. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Br J Pharmacol.* 2007;152:21-37.
21. Kaas Q, Craik DJ. Bioinformatics-aided venomomics. *Toxins* 2015;7:2159-87.
22. Kayaalp SO. Akılcı tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 2. Ankara: Pelikan yay, 2012. P.1283-1344.
23. Fornasari D, Chini B, Tarroni P, Clementi F. Molecular cloning of human neuronal nicotinic receptor alpha 3-subunit. *Neurosci Lett.* 1990;111:351-6.
24. Ellison M, Gao F, Wang HL, Sine SM, McIntosh JM, Olivera BM. Alpha-conotoxins Iml and ImlI target distinct regions of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and distinguish human nicotinic receptor subtypes. *Biochemistry* 2004;43:16019-26.
25. Caliskan F, Quintero-Hernandez V, Restano-Cassulini R, Coronas-Valderrema FI, Corzo G, Possani LD. Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na(+)-channel alpha-type toxin peptide (Acra4) from *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Biochemie* 2013;95:1216-22.
26. Han B, Li X, Han J. The cholinergic anti-inflammatory pathway: An innovative treatment strategy for neurological diseases. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;77:358-368.
27. Yang X, Wang Y, Wu C, Ling EA. Animal venom peptides as a trove for new therapeutics against neurodegenerative disorders. *Curr Med Chem.* 2018; doi: 10.2174/0929867325666181031122438.