

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEREVİT GANGLİA TRANSKRİPTOMUNDAKİ OTOPETRİN
BENZERİ BİR PROTON KANALININ MODELLENMESİ**

Mustafa Erdem SAĞSÖZ

**Biyofizik Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2023**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEREVİT GANGLİA TRANSKRİPTOMUNDAKİ OTOPETRİN
BENZERİ BİR PROTON KANALININ MODELLENMESİ**

Mustafa Erdem SAĞSÖZ

**Biyofizik Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nuhan PURALI**

**ANKARA
2023**

**KEREVİT GANGLİA TRANSKRİPTOMUNDAKİ OTOPETRİN BENZERİ
BİR PROTON KANALININ MODELLENMESİ**
Mustafa Erdem SAĞSÖZ

Danışman: Prof. Dr. Nuhan PURALI

Bu tez çalışması 28/02/2023 tarihinde jürimiz tarafından “Biyofizik Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Belma TURAN (imza)
(Lokman Hekim Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ (imza)
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Mehmet UĞUR (imza)
(Ankara Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. A. Ruhi SOYLU (imza)
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. H. Burak KANDİLCİ (imza)
(Ankara Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. (2)
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

28 /02/2023

(İmza)

Mustafa Erdem SAĞSÖZ

1“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Nuhan PURALI danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Mustafa Erdem SAĞSÖZ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca etkin bilgileriyle bana yol gösteren, sebatımı destekleyerek çalışmalarımı sonuçlandırmamı sağlayan saygıdeğer doktora danışmanım Prof. Dr. Nuhan PURALI'ya, Biyofizik eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan değerli hocalarıma, bilimsel konulardaki yardımları ve destekleri sebebiyle başta Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ olmak üzere Biyofizik Anabilim Dalı'ndan MSc Berk SAĞLAM'a, MD Kaan ARSLAN'a ve Bozok Üniversitesinden Dr.Öğr.Üyesi Murat ÇAVUŞ'a, beni her konuda destekleyen ve yalnız bırakmayan annem, babam, sevgili eşim ve çocuklarıma sonsuz şükranlarımı sunarım.

Mustafa Erdem SAĞSÖZ

ÖZET

Sağsöz, M.E., Kerevit Ganglia Transkriptomundaki Otopetirin Benzeri Bir Proton Kanalının Modellenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Programı Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, 2023.

Nörobilimde iyon kanalları ve çeşitli nörotransmitter ve nöromodülatörlerin işlevlerinin anlaşılması açısından kerevit sıklıkla kullanılan bir model organizmadır. Çeşitli proteinlerin moleküler yapısı ve diğer protein ve ligandlarla dinamik etkileşiminin bilgisayar ortamında (*in silico*) modellenmesi günümüzde giderek artan oranda deneysel çalışmalarla uyumlu sonuçlar vermektedir. Simülasyon, söz konusu proteinlerin etkileşim dinamiklerinin belirlenmesi, çeşitli agonist ya da antagonistlerinin önerilmesi noktasında zaman ve bütçeden tasarruf sağlayan önemli bir araç haline gelmiştir.

Bu tez çalışmasında kerevit gangliasında ilk kez tarafımızca izole edilmiş otopetirin ailesinden bir proton kanalının tam dizileri kullanılarak bunların üç boyutlu yapısı Alphafold ile belirlenmiştir. Yapı ve fonksiyon arasındaki ilişki CHARMM kuvvet alanı kullanılarak NAMD moleküler dinamik yazılımı aracılığı ile modellenmiş, iyonların protein rezidüleri ve sulu çözeltide bulunma olasılığının yüksek olduğu konumlar belirlenerek proton iletim yolları tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: kerevit, ganglia, *in silico*, simülasyon, proton kanalı

Bu araştırmada yer alan tüm/kısmi nümerik hesaplamalar TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir.

ABSTRACT

Sağsöz, M.E., Modeling of an Otopetrin-Like Proton Channel in the Crayfish Ganglia Transcriptome, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Department of Biophysics PhD Thesis, Ankara, 2023. Crayfish is a frequently used model organism in neuroscience to understand the functions of ion channels and various neurotransmitters and neuromodulators. In silico modeling of the molecular structure of various proteins and their dynamic interactions with other proteins and ligands is increasingly yielding results that are compatible with experimental studies. Simulation has become an important tool that saves time and money in determining the interaction dynamics of the proteins in question and recommending various agonists or antagonists.

In this thesis, the three-dimensional structure of the proton channel was determined by Alphafold using the complete sequences of a proton channel from the otopetrin family, which was determined for the first time by our research team. The relationship between structure and function was modeled by the NAMD molecular dynamics software using the CHARMM force field, and the proton transmission paths were determined by distribution of the positions where the ions are likely to be found in protein residues and aqueous solution.

Keywords: crayfish, ganglia, in silico, simulation, proton channel

The numerical calculations reported in this paper were fully/partially performed at TUBITAK ULAKBIM, High Performance and Grid Computing Center (TRUBA resources).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Proteinler	3
2.2. Protein Katlanması	5
2.3. Moleküler Dinamik Simülasyon	5
2.4. Potansiyel Enerji Fonksiyonu	9
2.5. Su Molekülü	13
2.6. Sıvı Suyun Modellenmesi İçin Kullanılan Kuvvet Alanları	13
2.7. Hidrojen Bağı	14
2.8. Tuz Köprüsü	14
2.9. Klasik Kuvvet Alanı İle Moleküler Dinamik	15
2.9.1. Sonlu Farklar Yöntemi	16
2.9.2. Moleküler Modellemede Radyal Dağılım Fonksiyonu	16
2.9.3. Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF)	17
2.10. Serbest Enerji Hesapları	17
2.10.1. Şemsiye Örnekleme	18
2.10.2. Kısıtlı moleküler dinamik yöntemi	18
2.11. Kare Ortalamaları Karekök Sapması (Root Mean Square Deviation-RMSD)	18
2.12. Alphafold: Proteinler İçin Tahmini Şablon Modellemesi	19
2.13. Model Organizma Olarak Kerevit	20

2.14. Hidrojen İyonu (Proton)	20
2.15. Proton Kanalları	22
2.15.1. Voltaj Kapılı Proton Kanalı	23
2.15.2. Protonların Çözeltide İletimi	24
2.16. Membran Modelleri	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Truba Üzerinde Yapılan Moleküler Dinamik Çalışmalar	34
3.1.1. Hidronyum iyonun oluşturulması	34
4. BULGULAR	37
4.1. Yapısal Analiz	38
4.2. Moleküler Dinamik Çalışmaları	45
4.2.1. Sistem Hazırlama ve Simülasyonlar	45
4.2.2. TRUBA MD Simülasyonları	47
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	54
7. KAYNAKLAR	55
8. EKLER	61
Ek-1 Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu	61
Ek-2 Turnitin Dijital Makbuz	62
9. ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

3D	Üç boyutlu (3B)
Å	Angstrom
A_{ij}	van der Waals itme parametresi
AL	<i>Astacus Leptodactylus</i>
AA	Amino Asit
α	Alfa heliks
β	Beta iplik
ε	Dielektrik sabiti
θ_i	i atomunun anlık bağ açısı
θ_{eq}	Denge bağ açısı
φ_i	Dihedral (burulma) bağ açısı
AMBER	Enerji iyileştirmesiyle destekli model geliştirilmesi (<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>)
b	bağ uzunluğu
B_i	β-faktörü
B_{ij}	van der Waals çekim parametresi
BLAST	Temel yerel hizlama arama aracı (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
C_α	Alfa karbon atomu
CASP	Critical Assessment of Protein Structure Prediction
CHARMM	Harvard Makromoleküler Mekaniğinde Kimya (<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>)
cryo-EM	Kriyo-elektron mikroskopisi
d_i	i atomunun iki yapıdaki koordinatları arasındaki mesafe
D(Asp)	Aspartik asit
E (Glu)	Glutamik asit
F_i	i parçacığına etki eden kuvvet
GABA	Gama-aminobütirik asit
ΔG	Serbest Bağlanma Enerjisi
GDT	Global Distance Test
GROMOS	<i>GROningen MOlecular Simulation</i>

H	<i>Hessian matrix</i>
k	Mode
k_B	Boltzman sabiti
k_l	bağ için kuvvet sabiti
k_n	Kuvvet sabiti
k_θ	bağ açısı için kuvvet sabiti
l_{eq}	Denge bağ uzunluğu
l_i	i-1 ve i atomları arası bağ uzunluğu
LDDT	Yerel mesafe farkı testi (<i>Local Distance Difference Test</i>)
LJ	Lennard-Jones potansiyeli
MSA	Çoklu dizi hizalama (<i>Multiple Sequence Alignment</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
m_i	i parçacığının kütlesi
MD	Moleküler Dinamik
N	Atom sayısı
NR	Gereksiz olmayan (<i>Non-Redundant</i>)
PAE	Tahmini sıralanmış hata (<i>Predicted Aligned Error</i>)
POPC	<i>Palmitoyl Oleoyl Phosphatidyl Choline</i>
POPE	<i>Palmitoyl Oleoyl Phospho Ethalomine</i>
pLDDT	Rezidü başına güvenilirlik Skoru (<i>Per-residue confidence score</i>)
PBC	Periodik sınır koşulları (<i>Periodical Boundry Conditions</i>)
PDB	Protein Veri Bankası (<i>Protein Data Bank</i>)
pH	Sistemin asit-baz değeri
pKa	Belli bir molekülün asitik gücü
PMF	Ortalama Kuvvet Potansiyeli (<i>Potential Mean Force</i>)
pTM	Tahmini şablon modellemesi (<i>predicted Template Modeling</i>)
ORF	Açık okuma çerçevesi (<i>Open Reading Frame</i>)
SRA	Dizi okuma arşivi (<i>Squence Read Archive</i>)
TMH	Transmembran heliks
TSA	Komputasyonel toplanmış tRNA (<i>Transcriptome Shotgun Assembly</i>)
q_i	i atomunun kısmi atomik yükü

r_c	Etkileşim menzili veya kesim yarıçapı
r_i	i rezidüsünün konum vektörü
r_{ij}	parçacıklar arası mesafe
r_s	Komşu listelerinde cilt (<i>skin</i>) kalınlığı
R_i	Anlık konum
R_{ij}	i ve j rezidüleri arası mesafe vektörü
R, Arg	Arjinin
RMSD	Root mean square deviation
t	Zaman
T	Sıcaklık
U, V	Kuvvet alanı, Potansiyel enerji fonksiyonu
v_i	i atomunun hızı
VMD	Visual Molecular Dynamics
XRD	X-ışını kitalografisi (<i>X-ray crystallography</i>)

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. AA Yapısı ve Polipeptid Oluşumu.	3
2.2. A)PDB 6OBI Myosin-VI α -Heliks ve B) PDB 6J48 β -Tabaka Yapıları.	4
2.3. Moleküler Mekanik Kuvvet Alanlarının Temel Modelleri	8
2.4. Kısa ve Uzun Menzilli Potansiyellerin Karşılaştırılması.	12
2.5. Su Molekülü ve Aralarındaki Hidrojen Bağları	13
2.6. Tuz Köprüsünün Oluşumu.	15
2.7. Radyal Dağılım Fonksiyonu.	17
2.8. Kısmen Düzleştirilmiş Bir Piramit Şeklindeki Hidrojen İyonu	21
2.9. Protonun Hidrojen Bağlı Su Molekülleri Üzerinden Atlayarak İletilmesi.	24
2.10. POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine, POPC:1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine CHOL Kolesterol Yapıları.	25
3.1. BLAST İle Yakınlığı Görülen Türlerin Filogenetik Ağacı.	29
3.2. Alphafold2 Colab Notebook İle Elde Edilen Muhtemelen Farklı Konformasyonlara Sahip Protein Yapılar.	31
3.3. OtopLc Proton Kanalı Proteinin Karton Görüntüsü.	32
3.4. Membrana Yerleştirilmiş OtopLc Proton Kanalı Proteinin A) Üstten B) y Eksenine Negatif Tarafından Görünüşü.	33
3.5. Membrana yerleştirilmiş, lipid molekülleri kaldırılmış ve bütünleştirilmiş membran-protein yapısı.	33
3.6. Hidronyum iyonu topoloji modeli ve elektrostatik yüzey ile gösterimi.	34
3.7. Membran Üzerine Yerleştirilmiş İndirgenmiş OtopLc Simülasyon Başlangıç Sistemi,	34
4.1. A) OtopLc Proton Kanalı'nın Bir Monomerinin Transmembran Heliks Segmentleri. Mavi ile gösterilenler ard arda olan TMH segmentleridir. B) OtopLc Şematik Gösterimi	38
4.2. Her Rezidü İçin TMH Eğilimleri.	39
4.3. Membran ve Transmembran Segmentler	39
4.4. N Domain AphaFold Sonucu ve VMD de Farklı Açılardan Görünüşü.	41
4.5. A) N-Domain farklı açılardan B) N-Domain Gri, C-Domain kırmızı renkle birlikte gösterilmiştir.	41

4.6. OtopLc Proton Kanalının Dimerik Yapısı İçersinde TM Segmentler ve Domainler.	42
4.7. OtopLc Proton Kanalının Otopettrin Ailesiden Diğer Yapılara Göre AA Dizileri İçerisindeki Farklılıklar	43
4.8. Membrana yerleştirilmiş dimerik otoplc proton kanalının farklı açılardan görünümü.	44
4.9. Dönme Yarıçapının Zamanla Değişimi.	45
4.10. Rezidülerin RMSD Değişimi.	45
4.11. Rezidülerin Atomik Harmonik Osilatör Dalgalanma (B) Faktörü.	45
4.12. Na ⁺ İyonlarının Sırasıyla x-z ve y-z Düzlemlerindeki PMF Profili.	48
4.13. Hidronyum İyonlarının Sırasıyla x-z ve y-z Düzlemlerindeki PMF Profili.	48
4.14. Katyonların Bağlandığı AA'ler ve Protein Yapı İçerisindeki Yerleri.	49
5.1. Simülasyon Boyunca Protein Omurga C _α RMSD Değerleri.	51
5.2. Zn ⁺ Bağlanma Bölgeleri.	52
5.3. Alt Birim Arayüzünde TM6 ve TM12 Üzerindeki Tuz Köprüleri.	53
5.4. TMH6 ve TMH12 Alt Birim Arayüzünde E267 Rezidüsüne Bağlanan Hidronyumun Rezidü Oksijenlerine Olan Mesafesinin Simülasyon Boyunca Değişimi.	53

TABLULAR

Tablo	Sayfa
3.1. Membran Proteini Kodladığı Düşünülen AA Dizisi	27
3.2. Diğer Organizmaların Dizisinden Düzeltilmiş Aa Dizisi.	28
3.3. Harmonik Kuvvet Sabitlerinin Simülasyon Süresince Azaltılması.	36
4.1. TM finder Web Uygulmasından El Edilen Transmembran Segmentler ve Yükleri	37
4.2. N ve C <i>Domain</i> lere Ayrılmış AA dizisi	40

1. GİRİŞ

Biyofizik, fiziksel kuvvetlerin (mekanik, elektrik, manyetik) ve enerjinin (ışık, ısı, ses vb.) canlı hücreler, dokular veya tüm organizma üzerine aktarımı ve etkileri üzerine araştırma yapan bir disiplindir. Ayrıca biyolojik sistemlerin yapı ve fonksiyon ilişkisi moleküler düzeyde fiziksel etkileşimlerin modellenmesi biyofizik çalışma alanları içerisinde yer almaktadır. Biyolojik organizmaların canlılık olarak nitelendirdiğimiz işlevleri, kendilerini teşkil eden hücre çeşitlerine, hücrelerin çeşidini belirleyen zarları üzerindeki, sitoplazmalarındaki veya organellerindeki protein yapılarına bağlıdır. Biyolojik yapıların genellikle amino asit (AA) dizilerinin üç boyutta teşkil ettiği proteinlerden oluşması, canlılığın işleyiş mekanizmalarını anlama ve insan sağlığı yararına kullanma açısından bunları yapısal ve fonksiyonel olarak açıklığa kavuşturmanın önemini ortaya koymaktadır. Moleküler düzeyde yaşamı yapısal olarak oluşturan ve bu yapıların etkileşimlerini düzenleyen olayların modellenmesi moleküler etkileşim alanı kuramı ve bunun bilgisayar kodlarına uyarlanmasına dayanmaktadır.

Kabuklular (*crustaceans*) model organizma olarak, tek nöron özelliklerinden davranış bilime kadar sinir sistemi işlevini anlama amacıyla kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Ancak bu amaca son derece elverişli bu fizyolojik sistemlerin moleküler dizi bilgisi eksikliği, moleküler model olarak araştırılmalarını zorlaştırmaktadır. Nörobiyoloji araştırmalarında yaygın kullanılan model organizma olmalarına rağmen, kabuklularda, modern moleküler biyolojiyi ve yüksek verimli dizileme yaklaşımları büyük ölçüde ihmal edilmiştir (1).

Sinirbilimdeki birçok temel bilgi, kabuklu preparatlarından elde edilmiştir. Bunlardan bazıları; komut lifleri, elektriksel çiftlenim ve presinaptik inhibisyon olarak sıralanabilir. Kerevitler üzerinde yapılan çalışmalarda GABA inhibitör bir nörotransmitter olarak belirlenmiştir. Aksiyon potansiyeli üretimi ve yayılmasına ilişkin ilk çalışmalara zemin hazırlamıştır. İlk hücre içi floresan boya enjeksiyonu (2) kabuklularda gerçekleştirilmiştir. Böylelikle nörobilimde iyon

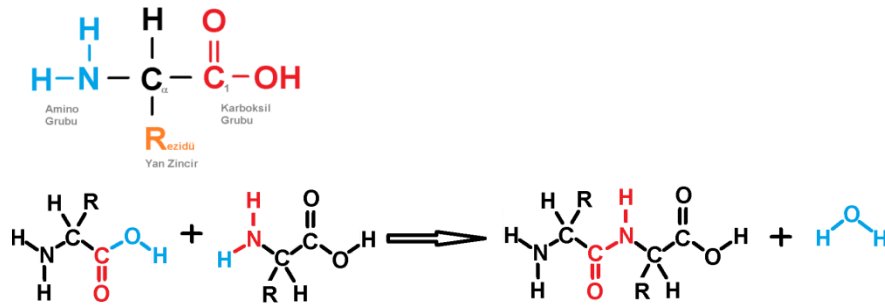
kanalları, çeşitli nörotransmitter ve nöromodülatörlerin işlevlerinin anlaşılması açısından kerevit sıklıkla kullanılan bir model organizma olmuştur.

Bu tez çalışmasında kerevit ganglion dokusundan tarafımızca izole edilmiş Otopetrin benzeri muhtemel bir proton kanalının tam dizileri kullanılarak üç boyutlu yapısı belirlenmiştir. Ayrıca membran üzerinde moleküler dinamik simülasyon ile proton iletim yolları tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Proteinler

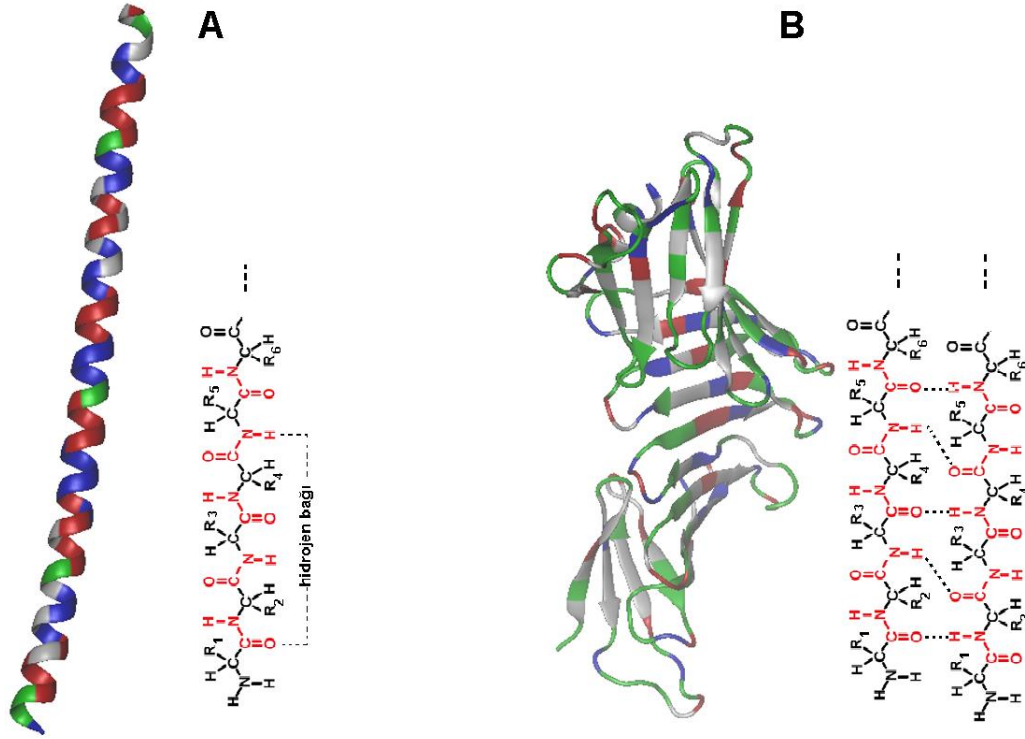
Genetik koddan üretilen (proteinojenik) ve sahip oldukları R (yan zincir) grubuna göre 20 farklı isim alan amino asitler, birinin amino azotu (N) ve diğerinin karboksil karbonu (C₁) arasındaki dehidrasyon tepkimesiyle oluşan peptid bağlarıyla uzun zincirler şeklinde bağlanarak proteinlerin birincil yapısını meydana getirirler (Şekil 2.1). Bu amino asit (AA) zincirleri üzerindeki bir AA'nin karbonil oksijeni ve başka bir AA'nin amino hidrojeni arasındaki hidrojen bağlarıyla α-heliks ve β-tabaka şeklinde ikincil yapıları oluştururlar. α-helikste her 100 derecelik dönüşte (360/3.6) bir rezidü bulunur (Şekil 2.2A). β-tabakaları, bitişik iplikler arasında hidrojen bağları ağı tarafından bir arada tutulan polipeptid zincirinin gerilmiş bölümleri olan birkaç β-şeritinden oluşur (Şekil 2.2B). AA'lerin R grupları arasındaki kovalent olmayan hidrojen bağı, iyonik bağ, dipol-dipol etkileşimleri ve London dağılım kuvvetleri gibi etkileşimlerle ve kovalent bağ türü olan disülfid bağları ile proteinler üç boyutta katlanarak bunların üçüncül yapıları meydana gelir. Birden fazla polipeptid zincirinin (alt birimlerin) bir araya gelmesiyle bazı proteinlerin dördüncül yapısı oluşur. Proteinlerin birincil zincir yapısını kaybetmeden fonksiyonlarını oluşturan bu üç boyutlu yapısını kaybetmesine denatürasyon denir. Biyolojik organizmaların hayati biyokimyasal reaksiyonlarını katalizleyen birçok enzim protein yapıdadır.



Şekil 2.1. AA Yapısı ve Polipeptid Oluşumu.

PDB (Protein Veri Bankası-*Protein Data Bank*), biyolojik makromoleküllerin (proteinler ve nükleik asitler gibi) üç boyutlu yapısal ve dizi verilerinin toplandığı bir veri tabanıdır. Genel olarak X-ışını kristalografisi (XRD), Nükleer Manyetik

Rezonans (NMR) spektroskopisi veya giderek artan bir şekilde kriyo-elektron mikroskobu (*cryo-EM*) ile elde edilen ve dünyanın dört bir yanından bilimciler tarafından sağlanan verilere, üye kuruluşların web siteleri aracılığıyla internet üzerinden ücretsiz olarak erişilebilmektedir. PDB, yapısal genomik gibi yapısal biyoloji alanlarında bir başvuru kaynağı haline almıştır (3).



Şekil 2.2. A) PDB 6OBI Myosin-VI α-Heliks ve B) PDB 6J48 β-Tabaka Yapıları.

Sanger tarafından 1940'larda ilk defa insulin proteininin yapısının belirlenmesinden bu yana proteinlerin üç boyutlu yapı bilgisinin, proteinlerin özellikleri ve işlevlerini anlama açısından çok değerli olduğu ispatlanmıştır. Deneysel yapısal biyolojinin gelişimine paralel olarak, bir proteinin yapısını genetik koddan elde edilen amino asit dizisinden tahmin etmek üzere birçok hesaplama yöntemi geliştirilmiştir. 1962 Nobel Kimya Ödülü globüler proteinlerin yapısı konusundaki öncü çalışmaları sebebiyle Max Perutz ve John Kendrew'a verilmiştir. Bu çalışmaları, protein yapılarının fiziksel ilkelerle nasıl açıklandığı sorusunu da gündeme getirmiştir. 1998'de Kohn ve Pople sırasıyla moleküler modellemenin geliştirilmesi (DFT; density functional theory) konusuna ve kuantum kimyada

komputasyonel yöntemler geliştirilmesine katkılarından dolayı Nobel Ödülü kazanmıştır. 2013 yılında ise Karplus, Levitt ve Warshel'e kimya deneylerini bilgisayar ortamında modelleme çalışmalarından dolayı Nobel Kimya Ödülü verilmiştir.

2.2. Protein Katlanması

Protein katlanması, bir polipeptit zincirinin biyolojik olarak bir işlevi yerine getirebildiği üç boyutlu yapısına geldiği fiziksel süreçtir. Protein katlanma sorunu bir amino asit dizisinin bir proteinin doğal yapısına dönüşmesini sağlayan fiziksel kodun ne olduğu, proteinlerin nasıl hızlı bir şekilde katlanabildiği soruları üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Kimyasal olarak ayrıntılı modellerde fiziksel kuvvetlerin bilgisayar simülasyonları ancak küçük proteinlerin doğru katlanmasını tahmin edebilmektedir. Moleküllerin rastgele termal hareketlerinin düşük enerjiyi tercih ederek konformasyonel değişikliklere yol açması sebebiyle proteinler hızlı bir şekilde katlanmaktadır. PDB'de yer alan yapısı deneysel olarak belirlenmiş diziler sayesinde, protein yapılarını tahmin etmek daha kolay hale gelmiş durumdadır (4).

Çözelti içerisindeki proteinin katlanmasını yönlendirmede hidrofobik etkinin, ana itici güç olduğu düşünülmektedir (5). Birçok proteinin heliks yapıları merkezi bir hidrofobik eksen etrafında oluşur. Proteinlerin üçüncül yapı oluşumunu ağırlıklı olarak hidrofobik etki sebep olur. Bu sebeplerden proteinlerin katlanmasının meydana geldiği ortamların ana çözücüsü olan suyun yapısı, fiziksel özellikleri ve su moleküllerinin yaptığı etkileşimler önem kazanır (6).

2.3. Moleküler Dinamik Simülasyon

Tüm klasik simülasyon yöntemleri, moleküler etkileşimleri hesaplamak ve sistemin potansiyel enerjisinin nokta benzeri atomik koordinatların bir fonksiyonu olarak değerlendirildiği kuvvet alanları (7, 8, 9, 10, 11) olarak adlandırılan kısmi deneysel yaklaşımlara dayanmaktadır. Kuvvet alanı, potansiyel enerjiyi hesaplamak için kullanılan molekül koordinatlarından gelen kuvvetler ve denklemlerle birlikte bir parametre kümesinden oluşur. Kuvvet alanları bağ kopması ya da oluşumu gibi olayları modelleyemezler (12).

Moleküler dinamik (MD) simülasyon, moleküler sistemin kuvvet alanı ile hesaplanmış atomik koordinatlarının fonksiyonu olan potansiyel enerjisinin hesaplanması ve enerji denkleminde başlayarak atomların zamana bağlı yer değiştirmesinin belirlenmesidir. Böylelikle moleküler sistemi oluşturan atomların bağlı ve bağlı olmayan fiziksel etkileşim alanları altında zaman içerisindeki termal hareketleri hesaplanarak görsel hale getirilebilmiştir. Sistemin atomlarına etkiyen kuvvetler, potansiyel enerjisinin konuma göre birinci türevi ile elde edilir. Kuvvetin Newton'un hareket denklemlerine göre çözümü sistemin dinamik davranışını belirlemek için kullanılır. Klasik Newton hareket denklemleri, kuantum düzeltmelerinin dikkate alınması gereken bazı durumlar hariç, genel olarak biyomoleküller için yeterli olmaktadır (13, 14).

Moleküler modelleme yöntemlerinden moleküler mekanikte (MM) klasik mekanik formülleri kullanılarak kimyasal bağ yapmış atomlardan oluşan bir sistemde atomlar arasındaki etkileşimler tanımlanır. Bu modelleme yöntemi ile büyük moleküller (steroidler vb) düşük hesaplama maliyetleriyle hızla modellenebilir. Ligand-reseptör, enzim-substrat etkileşimi gibi anahtar-kilit mekanizması benzeri moleküllerin birbirine geometrik olarak uyumunun araştırıldığı *docking* çalışmaları bu yöntem ile yürütülür. Proteinlerin üç boyutlu yapısındaki şekil değişiklikleri konformasyon olarak adlandırılır. Büyük yapı sistemler için (enzimler gibi) tepkime ısı ve konformasyon kararlılık değişkenleri kısa sürede hesaplanabilir. Ancak MM ile molekülün dış yörünge elektronik yapısına dayalı bağ yapma özelliklerini modellemek mümkün değildir. AMBER (Enerji iyileştirmesiyle destekli model geliştirilmesi -Assisted Model Building with Energy Refinement) ve CHARMM (Harvard Makromoleküler Mekaniğinde Kimya- Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) moleküler mekanik programlarından bazılarıdır. Kuantum mekaniksel (QM) modellemeye örnek olarak, *Hartree-Fock Self Consistent Field* (HF-SCF) modelinde, elektron-elektron etkileşimleri için ortalama bir elektriksel potansiyel temel alınır. Böylelikle molekül titreşim frekansları hesaplanabilir. Molekül geometrisi belirlenebilir. QM modelleme kullanılan *Density Functional Theory* (DFT)'de ise molekül için kuantum mekanik modellemedeki dalga fonksiyonları yerine, elektron olasılık yoğunluğu (ρ) hesaplanır. QM

modellleme, molekülün elektriksel özelliklerinin belirlenmesinde MM'ye nazaran daha doğru sonuçlar vermektedir. Bu modelleme Schrödinger dalga denkleminde dayanır. Nispeten yavaş bir hesaplama yöntemidir. Küçük moleküllere uygulanabilmektedir. Steroid gibi büyük moleküllerin modellenmesi hesaplama maliyeti ile zamanı artırmaktadır. GAUSSIAN, CACHE, HYPERCHEM, GAMESS, vb *ab initio* moleküler orbital yöntemlerinin kullanıldığı paket programlarından bazılarıdır. Bu programlar geçiş yapılarını, reaksiyon koordinatlarını, titreşim frekanslarını ve yoğunlukları hesaplayabilmektedir. Daha kapsamlı bir yazılım olan Gaussian, tek başına veya QM/MM hesaplamalarının bir parçası olarak kullanılabilen birkaç yarı deneysel ve moleküler mekanik yöntemini içermektedir. Geometrik optimizasyon yönteminde potansiyel enerji moleküler bağların birer yay gibi değerlendirildiği Hooke kanununa göre hesaplanır (15).

$$E_{\text{top}} = E_{\text{gerilme}} + E_{\text{bükülme}} + E_{\text{burulma}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elektrostatik}} + \dots \quad (2.1)$$

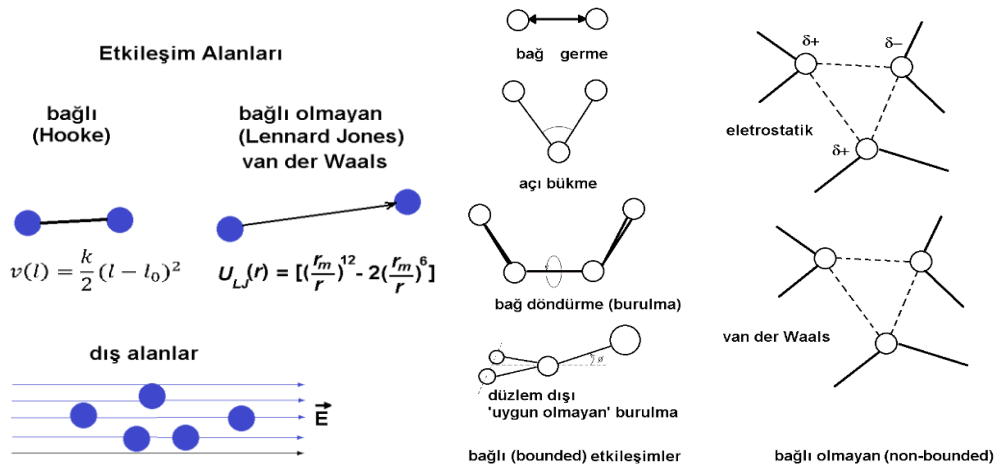
Burada; E_{top} : molekülün toplam enerjisi, E_{gerilme} : bağ gerilim enerjisi, $E_{\text{bükülme}}$: bağ (*bend*) eğilime enerjisi, E_{burulma} : burulma (*torsion*) enerjisi, E_{vdw} : van der Waals enerjisi, $E_{\text{elektrostatik}}$: elektrostatik enerjiyi ifade etmektedir.

Biyomoleküler dinamik, zaman ve uzayda çok değişken ölçeklerde meydana gelir. Moleküler simülasyon birçok teorik yöntem içerir; proteinlerin yapısını ve/veya işlevini tahmin etmek konusunda en iyi araç normalde amino asit dizi benzerliğinden ilgili protein yapılarını tahmin eden biyoinformatiktir. Hesaplamalı ilaç tasarımında, binlerce olası bileşiğin reseptör ya da bazlara bağlanmasını tek tek simüle etmektense nicel yapı-aktivite ilişkisi (*Quantitative Structure Activity Relation-QSAR*) gibi istatistiksel yöntemlerin kullanılması daha verimlidir. MD'in zaman ölçeği fs (femtosaniye= 10^{-15} s) mertebesinde (16).

Bir simülasyon deneyinde ölçülen makroskopik özellikler istatistiksel mekanik bir topluluğu temsil eden milyarlarca molekülün ortalama değerleridir. Bu yaklaşım deneysel koşullarda, mesela sıcaklık ve basınçta temsili bir yapı topluluğu oluşturularak bunların tekrarlanmasıyla sistemlerin genişletilmesi sonuca ulaşmayı

kolaylaştırır. Simülasyonla bağlanma sabiti gibi serbest enerjiye ilişkin termodinamik denge değişkenleri hesaplanamaz. İstatistiksel olarak güvenilir, dengede topluluklar oluşturmanın en çok kullanılan iki yöntemi Monte Carlo rastgele örnekleme ve MD simülasyonlarıdır (12). Dengeden uzak bir başlangıç konfigürasyonunda, uygulanabilecek çok büyük kuvvetler simülasyonun çökmesine veya sistemin bozulmasına sebep olabilir. Bu durumda moleküler dinamik simülasyona sistemi hazırlarken önce sistemin enerjisinin minimize edilmesi gerekir. Enerji minimizasyonları ayrıca düşük çözünürlüklü deneysel detaya sahip yapıları iyileştirmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır (16).

Kuvvet alanlarının tümünün potansiyel fonksiyonları iki sınıfa ayrılır; Bağlı etkileşimler ve bağlı olmayan etkileşimler. Bağlı etkileşimler simülasyon sürecinde sabit kovalent bağ gerilme, açılma bükülme, bağlar etrafında dönerken burulma potansiyelleri ve düzlem dışı “uygun olmayan burulma” potansiyellerinden oluşur. Diğer bağlı olmayan etkileşimler, Lennard-Jones itme ile elektrostatik dağılım (London dispersiyon) etkileşimlerinden oluşur (Şekil 2.3). Bunlar MD simülasyonda tipik olarak her 5 ila 10 adımda bir güncellenen komşu listelerinden hesaplanır (12). Komşu listeleri bir atoma etkileşim enerjisi bakımında makul r ila $r+r_s$ mesafesinde bulunan ve hesaplamaların bu atomlar üzerinde yapıldığı atom grubunu temsil eder. Atomların dinamik yapıları sebebiyle bu listeler belli aralıklarla güncellenir.



Şekil 2.3. Moleküler Mekanik Kuvvet Alanlarının Temel Modelleri (24) değiştirilerek alınmıştır.

Konformasyon, yapı içerisindeki moleküllerin arasındaki bağlarda bir değişiklik olmadan tekli bağlar etrafında dönüş ile olası üç boyutlu uzaysal geometrilerin alternatifidir. Aktif konformasyon toplam enerjinin en düşük olduğu değerde gerçekleşir. Protein yapıların diğer konformasyonları hesaplamalı olarak belirlenebilir. Yine diğer bazı konformasyonlar, NMR spektroskopisi, elektron mikroskopisi (cryoEM) , XRD, makro moleküller için küçük açı saçılma (SAXS) araçlarıyla deneysel olarak belirlenebilir. Konformasyon değiştikçe molekülün enerjisi ve dolayısıyla kararlılığı değişir. Konformasyon analizi yapılarak moleküllerin (reseptör-ligand, ilaç-protein vb.) bağlanma yüzey enerjileri hesaplanabilir. Bu amaçla kullanılan MM ve MD, ligand konformasyonunun öngörülmesinde ve ligandın biyolojik hedefe (proteine) bağlandığında proteinin konformasyonel değişiminin modellenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdir (17).

2.4. Potansiyel Enerji Fonksiyonu

Potansiyel enerji fonksiyonu moleküler sistemin enerjisini atomik koordinatlarla ifade eder:

$$U_{top} = \sum_{bağ} \frac{1}{2} k^b (l - l_{dng})^2 + \sum_{açı} \frac{1}{2} k^\theta (\theta - \theta_{dng})^2 + \sum_{bur} k^\phi [1 + \cos(n\phi - \phi^0)] + \sum_{UObur} \frac{1}{2} V [1 + \cos(2\phi - 180^\circ)] + \sum_{i < j} \text{Len-Jon} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{i < j} \text{Coulomb} \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}^2} \right) \quad (2.2)$$

İlk üç terim, kovalent olarak bağlı atomlarla ilişkilidir, son iki terim ise atomlar arasındaki bağlı olmayan etkileşimler içerisinde kovalent olmayanlar içindir. İlk terim, kovalent olarak bağlı iki atom arasındaki bağ gerilmesi ile ilişkili enerjilerin toplamıdır, ikinci terim bağ açılarının bükülmesini temsil ederken üçüncü terim burulmaları temsil eder. Sondan ikinci terimde tipik 12-6 formülasyonu ile Lennard-Jones potansiyeli ile van der Waals etkileşimleri ifade edilir. Lennard Jones terimi 10^{-12} mertebesinde itici ve 10^{-6} mertebesinde çekici bir bileşene sahiptir. Son terim, nokta elektrik yükleri olarak tanımlanan Coulomb kısmi elektrostatik etkileşimlerini ifade etmektedir. Atom yarıçapları deneysel olarak belirlenir. Atomik bağlar ise gerilme, eğilme ve burulma yapabilen harmonik yaylar olarak modellenirken atomik çekirdekler ve elektronlar, nokta yükü olan küresel parçacıklar olarak ele alınır (16)(Şekil 2.3).

Bu denklemin çeşitleri, düzlem dışı bozulmaları önlemek için uygun olmayan torsiyon dihedral (iki düzlemlilik, V şeklinde) içeren bir terim, bitişik bağlarda gerilme ve bükülmeyi doğrudan birleştiren karışık terimler, elektronik polarize edilebilirliği hesaba katan özel hidrojen bağı terimleri vb ek terimlere sahip olabilir. Denklemi doğruluğunu artırmak veya denklemini özel amaçlara uyarlamak üzere eklemeler yapılabilir. Daha doğru sonuç elde etmek istendiğinde hesaplama maliyeti de artmaktadır (16). Teoriye deneysel uyduymada kullanılan parametreler içersinde; yoğunluk, buharlaşma entalpileri ve çözünmenin serbest enerjileri bulunur. Potansiyel enerji fonksiyonu, ilişkili parametre seti ile birlikte bir 'kuvvet alanı'ını oluşturur. Biyomolekülleri simüle etmek için yaygın olarak kullanılan kuvvet alanları arasında AMBER (18), CHARMM (19), GROMOS (20) ve GRID (11) yer almaktadır. Sonuç olarak kuvvet alanı seçilirken moleküler sistemin özelliklerine dikkat edilmelidir. Uygun bir kuvvet alanı seçiminin ardından, makroskopik özelliklerin istatistiksel mekanik değerlendirmesinde kullanılmak üzere moleküler sistemin bir dizi düşük enerji konfigürasyonu oluşturulmalıdır (16).

GRID, Moleküler Etkileşim Alanları (*Molecular Interaction Fields –MIFs*), bilinen bir yapıya sahip moleküller üzerindeki enerji bakımından uygun bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için bir geliştirilmiş bir yazılımdır. GRID kuvvet alanının tasarlanmasının genel amacı ligandların biyolojik makro moleküllere nerede bağlandığını tahmin etmek ve böylece bağlanma ile ilgili faktörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktır (21).

Klasik kuvvet alanı simülasyonlarında, gerçek moleküller arasındaki kuvvetin aksine, sert bir itici kısma sahip olan Lennard-Jones potansiyelleri kullanılır. QM uygulamalarında etkileşim, Lennard-Jones potansiyellerinden daha yumuşaktır ve diğer moleküllerle etkileşime girerek daha makul sonuçlar üretir (6).

Denklem (2.3)'deki E_{LJ} Lennard-Jones enerjisidir.

$$E_{LJ} = (Ad^i - Bd^j) \quad (2.3)$$

ki burada $i = -12$, $j = -6$ ve $F = 1$ 'dir. A ve B, pozitif sabitler olmak üzere d ızgara noktasına yerleştirilen prob ile hedef atomu arasındaki mesafeyi göstermektedir. İlk terim olan Ad^i her zaman pozitifdir ve atomların birbirlerine van der Waals yarıçaplarından daha yakın olmaları durumunda birbirlerini itişlerini temsil eder. İkinci terim $-Bd^j$ negatiftir ve atomların birbirlerine olan dipol indüklemeye ve London dipersiyon çekimlerini gösterir (11).

Elektrostatik Terim $E_Q = q_1q_2/d$ D formülüyle hesaplanan bir elektrostatik terimdir; burada q_1 probun yükü, q_2 genişletilmiş hedef atomun yüküdür ve D dielektrik sabittir. Hidrojen Bağ Terimi E_{HB} , yalnızca etkileşen atomlardan biri bir hidrojen bağı verdiğinde ve diğeri aldığıda kullanılan bir hidrojen bağı terimidir (22,23). F fonksiyonu, bu bağların hibridizasyonuna ve etkileşen atomların ve bağı komşularının görel konumlarına bağlıdır. E_{HB} ve E_{LJ} etkileşim enerjileri görel olarak kısa menzilli etkiler gösterir. Etkileşen atomlar birkaç Å'dan daha yakınsa sıfır kabul edilir. GRID de esas olarak protein bağlanma bölgelerinde enerjetik olarak uygun bölgeleri bulmak için kullanılır, hidrojen bağlarını tanımlamak için açığa bağlı bir 6-4 formülasyonu kullanır(11):

$$U_{HB} = \left(\frac{C}{a^6} - \frac{D}{a^4} \right) \cos^m \theta \quad (2.4)$$

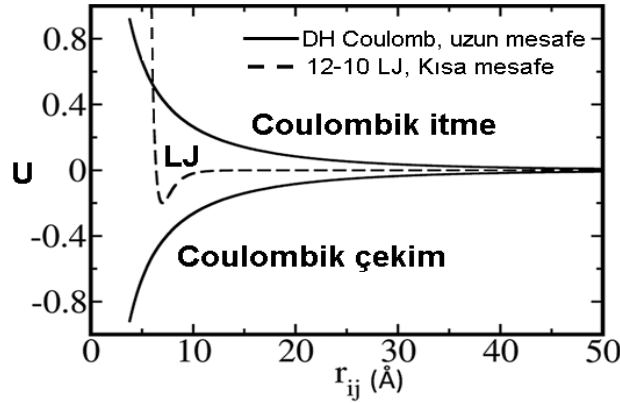
Burada θ hidrojen bağı açısı olmak üzere m genellikle 4 alınır.

Bir hedefin yakınındaki bazı su molekülleri neredeyse hedefin bir parçası gibi olacak şekilde güçlü bağlanır. Mesela, halihazırda iki karboksil grubuna bağlı bir su molekülü, normalde her bir karboksil oksijene bir hidrojen bağı verir ve probdan bir hidrojen bağı alması, vermesinden çok daha olasıdır. Öte yandan, birkaç arginin guanidinyum NH_2 grubundan zaten hidrojen bağı alan bir su molekülü, büyük olasılıkla proba hidrojen bağı verecektir (11).

Her atom için potansiyel ve potansiyelin negatif gradyenti ile kuvvet hesaplanır. Sonraki adım için koordinatlar ve hız yeniden belirlenir. Enerji minimizasyonu için, en dik iniş algoritması ile her bir atomun potansiyel enerjisi (U) azalan yönde en kısa mesafeye yer değişme sağlar. Moleküler dinamik Newton'un

hareket denklemleri uygulanarak elde edilir (Denklem 2.3) (24). Burada F atom üzerine etki eden kuvveti, m kütle, r atom koordinatlarına bağlı etkileşim mesafesini, t ise zamanı göstermektedir.

$$F_i = \frac{\delta U(r_1, \dots, r_N)}{\delta r_i} = m_i \frac{\delta^2 r_i}{\delta t^2} \quad (2.5)$$



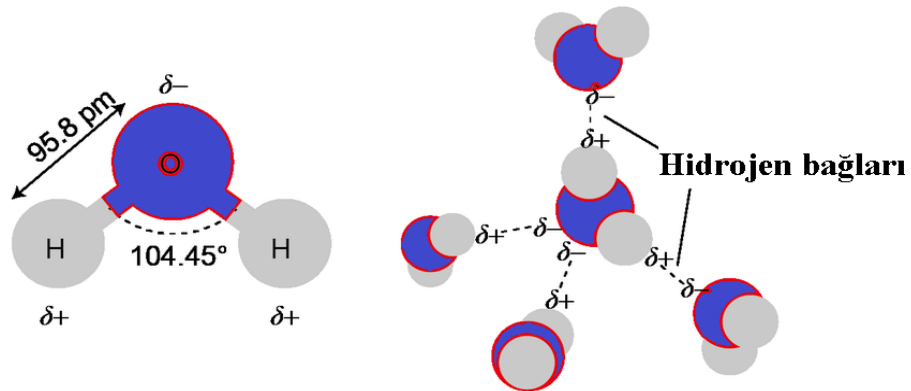
Şekil 2.4. Kısa ve Uzun Menzilli Potansiyellerin Karşılaştırılması. (CC BY 4.0 ile değiştirilerek alınmıştır) .

Biyomoleküler simülasyonlarda, arayüz kusurlarını önlemek için periyodik sınır koşullarını kullanılır (PBC- periodical boundary conditions). Basit kesmeler (*cut-off*), kısa mesafede (10\AA) sönümlenen Lennard-Jones (LJ) etkileşimleri için işe yarayabilir. Fakat Coulomb etkileşimleri için ani bir kesme büyük hatalara yol açabilir (Şekil 2.4). Bu noktada yapılan kesmeler ve yuvarlamadan kaynaklanan hatalar, simülasyon sırasında sistemin ısınmasıyla sonuçlanacak şekilde enerjide kaymalara sebep olabilir. Burada kısa mesafeli etkileşimleri temsil eden 10–12 LJ potansiyeli ve uzun menzilli etkileşimleri temsil eden Debye–Huckel (DH) Coulomb potansiyeli, ikili mesafenin (r_{ij}) bir fonksiyonu olarak çizilmiştir. LJ, 7\AA 'lik optimal bir mesafe için çizilir. D-H, 0.02 M 'lik bir tuz konsantrasyonunda hem itici hem de çekici kuvvetler için çizilmiştir (25). Atomlar arası toplam etkileşim kısa ve uzun menzilli birim hücrelere bölünerek sonsuza ıraksayan elektrostatik etkileşimleri hesaplamak üzere parçacık ağı Ewald toplamını (PME-Particle Mesh Ewald) kullanılır (26). Sistemin normal oda sıcaklığını korumak için model, molekül hızlarını kontrol eden bir termostata bağlanır. Benzer şekilde, sistemdeki toplam

basınç, birim hücre boyutu, izotropik olarak veya x, y ve z boyutlarında ayrı ayrı ölçeklendirilerek ayarlanabilir. Her bir zaman adımı için milyonlarca atom çifti etkileşiminin değerlendirilmesi gerekir. Bu sebeple, zamanı uzatmak, simülasyon verimliliğini iyileştirmenin önemli bir yoludur. Ancak 1 fs'de de bağ titreşimlerinde hatalar ortaya çıkmaya başlar. Çoğu simülasyonda, bağ titreşimleri bazı bağ kısıtlama algoritmaları tanıtarak tamamen ortadan kaldırılabilir. Kısıtlamalar, zaman adımlarını 2 fs'ye kadar uzatmayı mümkün kılar. Bu durumda sabit uzunluklu bağlar, kuantum mekaniksel temel durumunun harmonik osilatörlerinden daha iyi tahminler sağlamaktadır (16).

2.5. Su Molekülü

Su molekülü, 1.4 Å yarıçaplı, H-O-H bağları arasındaki açı; 104.45° ve O-H bağ uzunluğu 95.8 pm olan bir küre şeklinde ele alınabilir (Şekil 2.5). Su, hidrojenleri elektronlarını oksijene vermelerinden kaynaklanan kalıcı bir elektriksel dipol momentine sahiptir. Bir su molekülü diğer su molekülleri ile dört hidrojen bağı yapabilir. Polar molekülleri olması ve yüksek dielektrik sabiti sebebiyle su diğer sıvılarla karşılaştırıldığında iyonlar için uygun bir çözücüdür (6).



Şekil 2.5. Su Molekülü ve Aralarındaki Hidrojen Bağları.

2.6. Sıvı Suyun Modellenmesi İçin Kullanılan Kuvvet Alanları

Sıvı suyun modellenmesi için temel olarak üç tipte (SPC-*Simple point charge*, TIP3P- *transferable intermolecular potential with 3 points* ve 4 noktalı TIP4P) kuvvet alanı kullanılmaktadır (6). Üç Basit etkileşim-yer modellerinde su molekülleri değişmeyen (rijit) bir geometride ele alınır ve su molekülleri arasındaki

etkileşimler çift şeklinde Lennard-Jones ve Coulomb etkileşimine göre değerlendirilir. Esnek modeller molekülün iç konformasyonunda değişikliklere imkan sağlarken, son olarak açık olarak geliştirilen modeller polarizasyon ve çoklu-cisim etkilerini içerir (24).

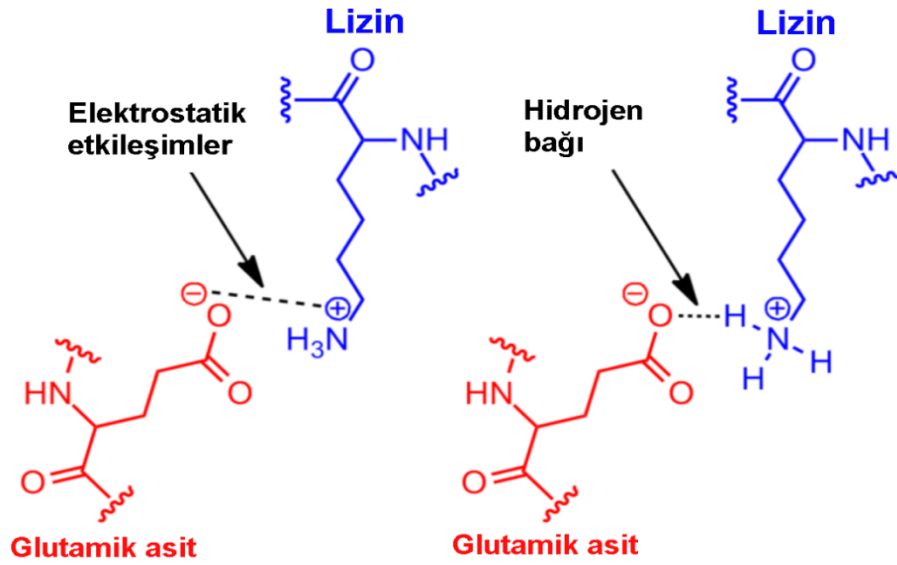
2.7. Hidrojen Bağı

Bir su molekülü, hidrojen bağlarını oluşturabilecek elektron vericilere ve elektron alıcılara sahiptir. OH⁻ grubu bir vericidir. Su oksijeni içinde bulunan her bir yalnız elektron çifti bir alıcı olabilir ve bir vericinin hidrojenine bağlanabilir. Sudaki hidrojen bağlarının sayısı dörde kadar çıkabilir. Moleküler simülasyonlarda hidrojen bağlarını tanımlamak için klasik kuvvet alanı MD'de aşağıdaki gibi açık bir 12-10 potansiyel formu kullanılabilir (Denklem 2.4)(27, 6):

$$U_{hb}(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{C}{r^{10}} \quad (2.7)$$

2.8. Tuz Köprüsü

Tuz köprüsü, hidrojen bağı ve iyonik bağ gibi iki kovalent olmayan etkileşimin bir birleşimidir. Tuz köprüleri, proteinlerin ikincil ve üçüncül yapısının temel motifleridir. Bu şekilde yapısal stabiliteyi oluştururlar. Genellikle çözücünün arayüzünde bulunurlar, öncelikle su ile ve aynı zamanda diğer yardımcı çözücülerle (özellikle iyonlar) çözücü-çözünen etkileşimlerine oldukça duyarlıdır (28). Tuz köprüleri, proteinlerde entropi açısından elverişsiz olan katlanmış konformasyona ve stabiliteye en yaygın katkıdır. Kovalent olmayan nispeten zayıf etkileşimlerdir. Ancak zayıf ve dengeleyici etkileşimler, bir konformerin genel kararlılığına önemli bir katkı sağlamak üzere bir araya gelebilir. Tuz köprüleri, simülasyon sırasında varlıklarının belirli zamanlarını gözlemlemek için oksijen-azot atomu mesafeleri belirlenerek araştırılır. Hidrojen bağları, iyon çiftlerinin stabilitesine katkıda bulunur. Protonlanmış amonyum iyonları ve anyonlarla, karboksilat vb durumunda olduğu gibi deprotonasyonla oluşturulur (Şekil 2.6). Sonraki etkileşim sabitleri pH'a bağlıdır.



Şekil 2.6. Tuz Köprüsünün Oluşumu (29).

Bizim dimerik membran proteini yapımızın içerisindeki tuz köprülerinin proton iyonlarının selektiviteside etkin oldukları düşünülmektedir (29).

2.9. Klasik Kuvvet Alanı İle Moleküler Dinamik

Klasik kuvvet alanı ile MD simülasyon yapan çoğu program, açık şekilde bir hidrojen bağı terimi içermez. Hidrojen bağı etkisi elektrostatik ve van der Waals etkileşim terimlerinin içinde modellenir. Suyun sıcaklık artışı hidrojen bağlarını zayıfltır. Hidrojen bağlarının sayısı, açıları ve kuvveti Raman spektroskopisi gibi deneysel yöntemlerle belirlenebilir. Birçok model, kaynama sıcaklığında tüm hidrojen bağlarının kırılmayacağını kabul eder. Suyun kısmen polarize olabilen hidrojen bağlarından dolayı dielektrik sabiti yüksektir (6).

Moleküler etkileşim alanlarının tasarımı ve geliştirilmesi, kuvvet alanı yaklaşımlarının sürekli olarak geliştirilmesi meselesi haline almıştır. Bu sebeple, özel bir simülasyon için doğru MIF'i seçmek kritik derecede önemlidir. Birçok MD simülasyonunda, her parçacık üzerindeki kuvvet, konumuna göre değişir. Potansiyellerin etkisi altında, tüm parçacıkların hareketi çoklu-cisim problemini ortaya çıkarır. Bu sebeple Newton hareket denklemleri sonlu farklar yöntemi kullanılarak bütünleştirilir.

2.9.1. Sonlu Farklar Yöntemi

Sonlu farklar yöntemi ile sürekli potansiyele sahip modellerle MD yolları (*trajectory*) üretilebilir. Yolların her bir parçası sabit bir zaman aralığı δt ile ayrılmış birçok küçük adıma bölünür. Kuvvetin t ve $t+\delta t$ zaman adımı boyunca sabit olduğu varsayılır. Parçacıkların yeni konumlardaki kuvvetleri ve ivmeleri belirlenir. MD simülasyonlarında yaygın olarak kullanılan sonlu fark yöntemlerini kullanarak hareket denklemlerini toplamak üzere birçok algoritma bulunmaktadır. Tüm algoritmalar, konumların ve dinamik özelliklerin (hız, ivme vb.) Taylor serisi açılımlarıyla yaklaşık olarak elde edilir (6).

$$f(x_0 + \Delta x) = f(x_0) + \Delta x f'(x_0) + \frac{1}{2!}(\Delta x)^2 f''(x_0) + \dots \quad (2.8)$$

Verlet açılımı, MD simülasyonlarında Newton'un hareket denklemlerini uygulamak için kullanılan nümerik yöntemlerden biridir. MD simülasyonlarında parçacıkların bir sonraki zaman dilimindeki konumlarını belirlemek için kullanılır(30). Taylor serisi açılımı şu şekildedir;

$$x_{n-1} = x_n - v_n \Delta t + \frac{1}{2} a_n (\Delta t)^2 \quad (2.9)$$

Benzer şekilde, x_{n-1} ve x_{n+1} terimleri için Taylor serisinin çıkarılması

$$v_n = \frac{x_{n+1} - x_{n-1}}{2\Delta t} \quad (2.10)$$

$$V_{n+1} = V_n + 1/2(a_{n+1} + a_n)\Delta t \quad \text{hız Verleti} \quad (2.11)$$

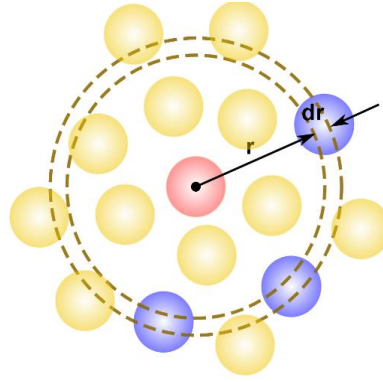
Hız Verlet yöntemi konumları, hızları ve ivmeleri aynı anda verir ve bu durum hassasiyeti etkilemez (6):

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) \quad (2.12)$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + \frac{1}{2} \delta t [a(t) + a(t + \delta t)] \quad (2.13)$$

2.9.2. Moleküler Modellemede Radyal Dağılım Fonksiyonu

Radyal dağılım fonksiyonu $g(r)$ moleküler dinamikte bir sistem içindeki herhangi bir atom etrafındaki atomların ortalama dağılımını temsil eder. Sıvıların birçok makroskopik termodinamik özelliği $g(r)$ cinsinden ifade edilebilir. Merkezi bir parçacık verildiğinde, buna r mesafesindeki bir parçacığın birim hacim başına bulunma olasılığını tanımlar (6) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Radyal Dağılım Fonksiyonu.

2.9.3. Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF)

Reaksiyon koordinatları atom arası mesafe veya bağ açısı olarak alınırsa serbest enerjinin bunların fonksiyonu olarak belirlemek faydalıdır. PMF, modellenen sistem bir çözücü içindeyken, iki parçacık arasındaki karşılıklı etkileşimle çözücü etkilerini de içerir. Sıvıdaki iki parçacık arasındaki PMF, maksimum ve minimum arasında salınım yapar. PMF iki molekül arasındaki r uzaklığı için, çevredeki çözücü moleküllerinin tüm konformasyonları üzerinden bir ortalamayı tanımlar. PMF’i hesaplamak için çeşitli yöntemler önerilmiştir (6).

$$PMF = -k_B T \ln g(r) + \text{sabit} \quad (2.14)$$

Eşitliğin sonundaki sabit, en olası dağılım serbest enerjisi sıfıra karşılık gelecek şekilde seçilir. (2.14) eşitliği radyal dağılım fonksiyonundaki büyük değişimlerin serbest enerji yansımalarının az olmasını sağlar.

2.10. Serbest Enerji Hesapları

Moleküllerin yapısının ve termodinamiğinin hesaplamalı modellenmesi, biyokimyasal süreçlerin moleküler mekanizmaları ve fizyolojik olarak aktif bileşiklerin reaktivitesi üzerine araştırmalar için değerli bilgiler sağlar. Tüm kimyasal dengeler, çeşitli durumlar arasındaki serbest enerji farkı ile belirlenir. Mesela, bir biyomolekülün farklı konformasyonları arasındaki serbest enerji farklılıkları veya bir ligandın bağlı ve bağlı olmayan durumu ile farmasötik hedefi arasındaki serbest

enerji farkı buna örnektir. Hesaplamalı kimya ve biyokimyadaki ana zorluklardan biri de serbest enerji farklılıklarının hesaplanmasıdır.

Gibbs serbest enerjisi termodinamikte entalpiden, entropi ve mutlak sıcaklığın çarpımının çıkarılmasıyla elde edilen termodinamik bir değişkendir ($G=H-TS$). Serbest enerji değişimi ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) iş yapmada kullanılabilecek enerji değişimin ifade eder. $\Delta G < 0$ ise böyle bir reaksiyon kendiliğinden oluşur. $\Delta G > 0$ ise reaksiyonun oluşması için dışarıdan enerji gerekir. $\Delta G = 0$ ise reaksiyon dengededir. Moleküler modelleme için birçok serbest enerji hesaplama yöntemi bulunmaktadır.

2.10.1. Şemsiye Örnekleme

Şemsiye örnekleme bir reaksiyon koordinatı boyunca serbest enerji hesaplamasını sağlayan taraflı (*biased*) MD yöntemlerden biridir. Şemsiye örneklemede taraflı (*biased*) potansiyeller, bir (veya daha fazla boyutlu) reaksiyon koordinatı boyunca, sistemi bir termodinamik durumdan diğerine (mesela, reaksiyona girenlerden ürünlere) sürdürür. Sistemin reaksiyon koordinatı boyunca örneklenmiş dağılımından, her penceredeki serbest enerji değişimi hesaplanabilir. Pencerelemler daha sonra ağırlıklı histogram analizi yöntemi veya şemsiye örnekleme gibi yöntemlerle birleştirilir (31).

2.10.2. Kısıtlı moleküler dinamik yöntemi

PMF'yi hesaplamak için klasik MD kullanma iki çözünen arasındaki mesafeyi bir Lagrange çarpanı kullanarak sabitleyerek, iki çözünen arasındaki gerekli kısıtlama kuvvetini hesaplamaya dayanır. Bir simülasyon sisteminin her atomunun konumu ve hızı, simülasyon yolu ile her zaman adımı için belirlenir. Bir proteinin yapısal değişiklikleri yörüngenin analiz edilmesi ile belirlenebilir.

2.11. Kare Ortalamaları Karekök Sapması (Root Mean Square Deviation-RMSD)

Atom koordinatları r_i^0 olan bir referans yapıya göre atomik koordinatları r_i olan bir yapının kare ortalama karekök sapması (RMSD), her ikisi arasındaki yapısal fark için nicel mesela, konformasyonel değişiklikler için bir ölçü verir. Yaklaşık

olarak, 2-3 Å'lük bir RMSD, termal dalgalanmalara işaret etmektedir. Bundan daha büyük değerler konformasyonel değişiklikleri gösterir.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_i^0)^2} \quad (2.15)$$

Yapının küresel hareketi hakkında bilgi elde etmek için, Denklem (2.15) aracılığıyla protein yapının amino asit C_α omurga atomlarının RMSD değeri hesaplanır. Ayrıca proteindeki belirli bir bölgesinin toplam RMSD'ye fazla katkıda bulunacağı öngörülüyorsa, ilgili bölgeye özel bir RMSD hesaplamak için bir alt küme olarak seçilebilir. RMSD genel hareketleri veya konformasyonel değişiklikleri gösterebilir. Ancak faz uzayındaki spesifik hareketler tam olarak belirlenemez (16).

2.12. Alphafold: Proteinler İçin Tahmini Şablon Modellemesi

Alphafold (Deepmind Inc-Google Inc, ABD) tarafından geliştirilmiş, protein katlanması problemini çözmek ve AA zincirlerinin 3B yapısını protein veri bankası ve deneysel kristalografik bilgileri kullanarak elde etmeyi amaçlamış başarılı bir yapay zeka programıdır.

Protein Yapısı Tahmininin Kritik Değerlendirmesi (*Critical Assessment of protein Structure Prediction -CASP*), Amerikan Ulusal Sağlık ve Genel Tıbbi Bilimler Enstitüleri (NIH/NIGMS) tarafından desteklenen merkezi University of California, Davis'de bulunan bir topluluğun 1994'ten beri her iki yılda bir gerçekleştirdiği protein yapısı tahmini için dünya çapında yapılan bir yarışmadır. CASP'ın tahminlerin doğruluğunu ölçmek için kullandığı ana ölçü, 0-100 arasında değişen skoru bulunan Küresel Mesafe Testidir (*Global distance test- GDT*). Basit bir ifadeyle, GDT yaklaşık olarak doğru konumdan bir sınır mesafesi (*threshold*) içindeki amino asit rezidülerinin yüzdesi olarak düşünülebilir. Son CASP (15) yarışması ve konferansı 2022 yılı içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Proteinler için tahmini şablon modellemesi (*predicted template modeling-pTM*), Rezidü başına güvenilirlik Skoru (Per-residue confidence score pLDDT), Tahmini sıralanmış hata (*predicted aligned error-PAE*), Lokal Mesafe Farkı Testi

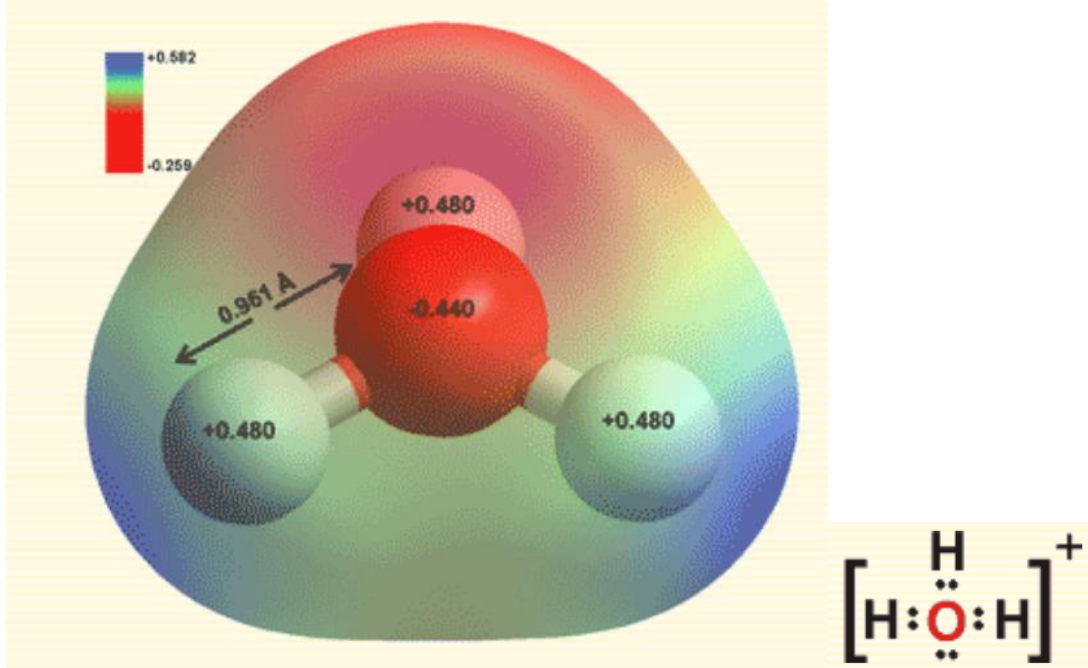
(LDDT) ve stereokimyasal uygunluğun doğrulanması da dahil olmak üzere bir modeldeki tüm atomların yerel mesafe farklılıklarını değerlendiren bir puandır. Referans, benzer amino asit dizisine sahip tek bir yapı veya eşdeğer yapılar topluluğu olabilir. LDDT'nin, kuvvet alanı değişikliklerinde bile model kalitesini değerlendirmek için çok uygun olduğu gösterilmiştir (32).

2.13. Model Organizma Olarak Kerevit

Kerevit (*Astacus Leptodactylus*) dev nöronlarının oluşturduğu devreler nörobilimde elektrofizyoloji deneylerinin diğer organizmalara göre daha kolay yapılabilmesi sebebiyle sıklıkla çalışılmaktadır (33, 34). Kerevit ganglia örneklerinde çeşitli genlerin ifade düzeyleri daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (35). Kerevit gangliasında tespit edilen tam dizilenmiş proteinler araştırma grubumuz tarafından Amerikan ulusal biyoteknoloji merkezi (National Center for Biotechnology Information-NCBI) veri tabanı taranarak annotate edilmiştir.

2.14. Hidrojen İyonu (Proton)

Hidrate protonlar, bir veya daha fazla su molekülüne bir proton eklenerek oluşturulan, $H_3O^+(H_2O)_n$ formülüne sahip moleküler iyonlardır. Tek başına hidrojen iyonu (proton) son derece yüksek bir yük yoğunluğuna sahiptir bu yüzden kolayca hidratlanır ve çözültide tek başına bulunmaz. İlk hidrasyon, hidroksonyum iyonunu (H_3O^+) oluşturur. Düzleştirilmiş bir trigonal piramidal yapıya sahiptir (OH bağ uzunluğu 0.961 Å, HOH açısı 114.7°'dir). H_3O^+ yaklaşık 1 Å 'lük hidrate iyonik yarıçapa sahiptir. Elektrik alan altında yapıların hacimlerinde değişikliğe sebep olan elektrostriksiyon, sulu ortamda büyük önem taşıyan hidrojen ve hidroksit iyonları molar hacminin saf su hacminden küçük olmasına sebep olmaktadır (36,37).



Şekil 2.8. Kısmen Düzleştirilmiş Bir Piramit Şeklindeki Hidrojen İyonu (hidroksonyum/hidronyum- H_3O^+) (37, CC2.0 lisansı gereği değiştirilmeden kullanılmıştır).

(H_9O_4^+) kationunun çekirdeğini ve 'Zundel' (H_5O_2^+) kationunun kanatlarını oluşturur. Protonların hidrate yapısı, farklı proton hidrasyon konfigürasyonlarını ayıran düşük enerji bariyerleri ile son derece hızlı hidrojen bağlı dalgalanmaları sebebiyle dinamik ve karmaşıktır. H_3O^+ ayrıca HCl , H_2SO_4 ve HClO_4 monohidratlarında da bulunur. Tüm hidrojen iyonları bir 'çekirdek' H_3O^+ dan oluşur. Sulu çözeltide yapıları sabit değildir. Karşılıklı dönüşümleri hızla gerçekleşir. H_3O^+ un üç hidrojen bağı oluşturduğu gösterilmiştir (37). Bu hidrojen bağlarının gücü, sıvı sudaki H_2O molekülleri arasındakinden iki kat daha fazladır. Hidronyum iyonu yalnız elektron çiftine sahip değildir. Bu elektronlar üç proton üzerine dağılmıştır. Elektrostatik potansiyelde minimum bulunmamaktadır. Bu durum, H_3O^+ kationunun çözeltide H_9O_4^+ olarak bulunabileceği anlamına gelir. Polarizasyon, bu ilk kabuklu su moleküllerinin her birinin iki hidrojen bağı daha vermesine sebep olur (37,38).

2.15. Proton Kanalları

Proton iletimi ve seçiciliğin moleküler mekanizmaları hakkında bildiklerimiz, büyük ölçüde influenzanın M2 proton kanalından (39) ve ökaryotik voltaj kapılı Hv1 proton kanalından (40) türetilmiştir. Otopetrinlerin fizyolojik rolleri henüz yeni tanımlandıkları için, yeni yeni keşfedilmeye başlanmıştır. Ökaryotlarda yapılan son çalışmalarda, Otopetrinler yeni bir proton kanalı ailesi olarak tanımlanmıştır. Farelerde Otop1'in protonlar için Na^+ 'a göre 2×10^5 kat daha seçici olduğu gösterilmiştir (41). Vestibüler bozuklukta mutasyona uğramış gen olarak Otop1'i tanımlanmış ve farelerde ve zebra balığı normal otokonya gelişimi için vestibüler sistemde gerekli olduğu gösterilmiştir. Otop1'in, kahverengi ve beyaz yağ dokusunda yüksek oranda eksprese edildiği ve bunların bloke edilmesinin inflamasyonu azaltarak insülin direncinde rol oynadığı düşünülmektedir (29). Otop1 murin hücrelerinde muhtemel bir ekşi tat reseptörü ve yine *Drosophilada* proton akımları için gereklidir. Asitlere karşı hafif çekim ve güçlü isteksizlik, omurgalı dilinin sinek eşdeğeri olan farklı tat nöronlarında OtopLA'nın ekspresyonunu gerektirmektedir (42).

Farelerde Otop2 ve Otop3 sindirim sisteminde ve vücudun başka yerlerinde olduğu tespit edilmiştir. Otopetrinlerin son zamanlarda proton kanalları olarak karakterizasyonu, fizyolojik, biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerini açıklığa kavuşturmak için yeni yollar açmıştır (29).

Proton iletim yolu, esas olarak proteinde bulunan su molekülleri tarafından oluşturulur, ancak işlevi, yoldaki kritik AA rezidüleri üzerindeki titre edilebilir gruplar tarafından düzenlenir (29). Tüm proton kanalları protonların, bir su molekülünden veya titre edilebilir bir gruptan diğerine sıçradığı, hidrojen bağlı zincir mekanizması ile protonları iletir. Voltaj kapılı proton kanalları, diğer voltaj kapılı iyon kanallarındaki gibi voltaja ve zamana bağlı geçitlere sahip olan proton kanallarının belirli bir alt kümesini teşkil eder. Fakat çoğu iyon kanalından yüksek proton seçicilikleri, iletkenlik ve sıcaklık ve döteryum izotop etkilerine duyarlı geçiş kinetikleri bakımından farklılık gösterirler (29). Proton kanalları, pH ve voltaj ile düzenlenir ve yalnızca elektrokimyasal gradyan dışı doğru olduğunda

açılırlar. Böylece hücrelerden asit çıkarmak için işlev görürler. Proton kanalları birçok hücrede ifade edilir. Fagositlerdeki solunum patlaması sırasında, proton akımı, NADPH oksidaz tarafından gerçekleşen elektron ekstrüzyonunu telafi eder (39).

2.15.1. Voltaj Kapılı Proton Kanalı

Voltaj kapılı proton kanalı (Hv1), protonlar için yüksek seçicilikte bir iyon kanalıdır. Voltaj kapılı proton akımları ilk olarak dinoflagellatlarda biyoluminesansta yer aldığı öne sürülmüş ve daha sonra salyangoz nöronlarında, kan hücrelerinde, hava yolu epitelinde, spermde, mikroglia ve oositlerde tanımlanmıştır. Ayrıca HVCN1 insan genomundan alınmış ve kanal Hv1 geni tanımlamıştır (43). Hv1 ayrıca insan spermde ifade ettiği ve alkalizasyonla aktive olan kalsiyum kanallarını aktive ederek motiliteyi düzenlediği öne sürülmüştür. Hv1 aktivitelerinin iskemik beyin hasarının alevlenmesi ve kanserin ilerlemesi gibi patolojik etkileri de vardır. Ayrıca harici Zn^{2+} tarafından baskılandığı bildirilmektedir (44).

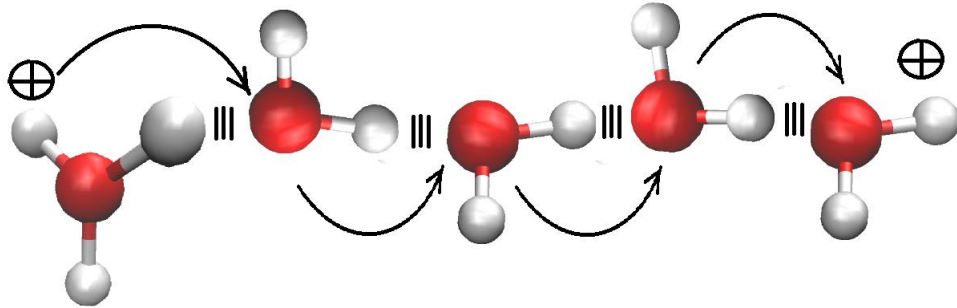
Hv1 kanalı, klasik voltaj kapılı katyon kanallarına benzemeyen yapısal ve işlevsel özelliklere sahiptir. Yapısal olarak, Hv1, vestibül alanı (*domain*) olmayan iki voltaj sensörü alanının bir dimer oluşturmaktadır (40). Hv1 kanalı temel olarak makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, plazmasitoid dendritik hücreler B hücreleri bazı T hücrelerinin alt kümesi gibi bağışıklık hücrelerinde ifade edilir. Hv1'in, fare merkezi sinir sisteminde (MSS) mikroglia da seçici olarak eksprese edildiği, ancak nöronlarda veya astrositlerde eksprese edilmediği bilinmektedir. Hv1'in geçişi, hem membran depolarizasyonuna hem de hücre içi asidoza bağlıdır; bu da, patolojik koşullarda görüldüğü gibi, hücreler aşırı zorluklarla karşı karşıya kaldığında büyük olasılıkla aktive olduğu anlamına gelmektedir (43).

Voltaj kapılı proton kanalı Hv1, hücreden proton akışına aracılık eder. Hv1, pH homeostazı ve fagositlerin solunum patlaması dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlere bütünsel olarak katkıda bulunur. Hv1'in inhibisyonu, inflamatuvar hastalıkların, meme kanserinin ve iskemik beyin hasarının tedavisi için terapötik yollar sağlayabilir. Bir araştırmada deneysel olarak taranan bir guanidin türevleri

sınıfından iki prototipik Hv1 inhibitörü, 2-guanidinobenzimidazol (2GBI) ve 5-kloro-2-guanidinobenzimidazol (GBIC) kanalın hücre içi tarafında bulunan aynı bölgeye bağlanarak proton iletimini bloke ettiği öne sürülmüştür (45).

2.15.2. Protonların Çözeltide İletimi

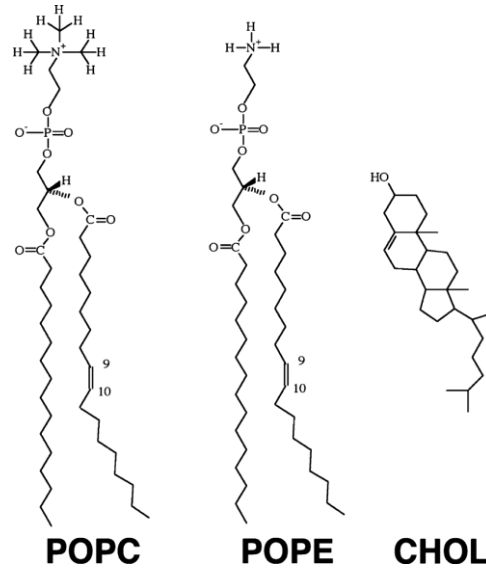
Protonların sulu çözeltide iletimi bu olayı ilk defa açıklayan bilim insanının ismine atfen Grotthuss mekanizması olarak bilinmektedir. Hidronyum iyonu şeklindeki hidrate hidrojen iyonları birbirine hidrojen bağlarıyla bağlı bulunan su moleküllerinin üzerinden atlayarak çözelti boyunca iletilmektedir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Protonun Hidrojen Bağlı Su Molekülleri Üzerinden Atlayarak İletilmesi.

2.16. Membran Modelleri

Fosfatidiletanolamin (POPE), bir gliserofosfolipiddir ve bakterilerde en bol bulunan lipid türlerinden biridir. CHARMM36 proteinler ve lipidler için etkili kullanılabilen bir kuvvet alanıdır. Membran yapıları POPE ve POPC gibi temel yapıların değişik oranda karışımları şeklinde modellenebilmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.10. POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine, POPC:1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine CHOL Kolesterol Yapıları.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kerevitler (*Astacus leptodactylus*) Hacettepe Üniversitesi deney hayvanları etik kurulu yönergelerine ve hayvan refahına uygun olarak Orta Anadolu nehirlerinden toplanmış, 18-20 °C’de havalandırılmış tatlı suda tutularak beslenmiş ve deney öncesinde 10 dakika buzda tutularak anestezi uygulanmış ve bu şekilde dekapite edilmiştir. Kerevitin dekapitasyonunun ardından çıkarılan ganglion zincirinden, “*QIAzol Lysis Reagent*” kullanılarak tüm RNA’ların izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA’dan “*SMARTer Pico Polypeptide Chain Reaction (PCR) complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit*” aracılığıyla cDNA kütüphanesi ganglion *template* hazırlanmıştır. Daha önce elde edilen transkriptomik verilerden bulunan *contigler* *NCBI Blast* platformunda taratılarak Otopettrin kanalıyla uyumlu *contigler* tespit edilmiştir. Ardından bu *contiglerden* MATLAB (MATLAB, 2018.9.7.0.1190202 (R2019b), The MathWorks Inc. Natick, Massachusetts, ABD) platformunda araştırma grubumuzun algoritmaları kullanılarak uygun PCR primerleri tasarlanmıştır. Bu primerlerle yapılan PCR’lar sonrasında elde edilen ürünler Sanger ve Illumina MiSeq NGS sekanslama hizmetlerine gönderilmiştir. Sanger’den ve MiSeq’ten gelen diziler kalite kontrollerinin yapılması ve eldeki verilerle kıyaslanmalarının ardından Otopettrin kanalının genine ait olduğu düşünülen cDNA dizisi elde edilmiştir. Pr_F3 (ATCACAGCCCAATACACAGAGGG) ve Pr_R1 (TAGTAGGTGTGTGAAGCATAGGTTCC) primer çifti Otopettrin cDNA’sının tüm *open-reading frame* (ORF)’sini kapsayacak şekilde ve jel elektroforez görüntüsünde tek bant veren bir PCR ürünü oluşturmuştur. Araştırma grubumuzun *de novo* dizilediği bu AA dizisi aşağıda Tablo 3.1’de yer almaktadır. Bu tez kapsamında aşağıdaki metodlarla elde edilen amino asit dizisi kullanılarak sadece hesaplamalı metodlarla çalışmalar gerçekleştirilmiştir(46).

Tablo 3.1. Membran Proteini Kodladığı Düşünülen AA Dizisi

```

MKERLLLSRDPPLATMDEPSPHDATDNQLLEVHQTPVGTVVKLNADG
YGSHTSPTHRVESYYTGTLESRRGLLEYYPKNAKTSTFITLSLLYATLLVVVC
LGFVLSEVLTHNVPLYYYEAFPTYLYGLSILFLLYVLCYLLSDSARDRKPCKP
QVFMGHHSQGQYNVSEYEYYAYNEGV LQKVRQPEGIPDGSPTQEKLTPSSCSK
PRKHKTSDNEHSHGSSFFLRIGAI AFGLGTMIYNGLEFGVFFEIPITSPCYQILRG
VNPLLQLVFTFMQMYFIFMNARLNIHKFKFLARFGLMHIVATNLCVWVRTLV
RESLKEINEFRVTQGHKGEDY MILEGIRRALENRGLMAPNKYLYNLDDDFVEM
QEINETMQQASGWVNEEDIVNRTCERVEIMGSIVSDSAPYLYPFIVEYSLIGAA
VLYIMWKHIGRNPRFVYDPEVAGDGMSVLSRRCHSRVDCVGASKGLFCGLL
VLVASLICLILFFVLVNREELKMLAIYL ADCSHCGIMFFSIIAMFIGFVRVRQLK
FHGEREEELDDILLMVSAFGLFAYAVFSTVAGSLSAYTKEPNLLVMVTGILSV
LQVIIQMVFIKDTQRRQVSLPEHERTKPGRQVVTFLICNLTMWVIYTFETQK
VEANPVQLEFFGDLPWTILLRCTLPLAIFHRFHSTVVLAAIWKNSYKTRIE

```

Kerevit ganglion dokusunda tespit edilen tam dizilenmiş ve NCBI veri tabanının koduna göre annotate edilmiş protein <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> üzerinden protein kodlayan kısımları belirlenerek BLAST aracı ile (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) başka organizmalardaki benzer diziler ve kodladıkları amino asit (AA) dizileri bulunarak annotate edilen dizi verileriyle karşılaştırılmıştır (47).

681 AA dizisinin rastgele hizalama olasılığı ($E < 1 \cdot 10^{-180}$) olan taksonomik olarak kerevite yakın 100 adet organizmanın hepsinde korunmuş alan olarak Otopetrin domainine sahip ‘Otopetrin benzeri’ proton kanalı olduğu görünmektedir (OtopLc). Orijinal dizide 204üncü sırdaki AA diğer dizilerde *gap* olarak görünmekteydi ve hepsinde S (serine) olarak yer almaktaydı bu sebeple dizinin alignment verilerine dayanarak 204üncü sıraya Tablo 3.2’deki gibi S terimi eklendi.

Tablo 3.2. Diğer Organizmaların Dizisinden Düzeltilmiş Aa Dizisi.

```

MKERLLLSRDPPLATMDEPSPHDATDNQLLEVHQTPVGTVVKLNADG
YGSHTSPTHRVESYYTGTLESRRGLLEYYPKNAKTSTFITLSLLYATLLVVVC
LGFVLSEVLTHNVPLYYYEAFPTYLYGLSILFLLYVLCYLLSDSARDRKPKKP
QVFMGHHSGQYNVSEYEYYAYNEGVLQKVRQPEGIPDGSPTQEKLTPSSSCS
KPRKHKTSDNEHSHGSFFLRIGAIAFGLGTMIYNGLEFGVFFEIPITSPCYQILR
GVNPLLQLVFTFMQMYFIFMNARLNIHKFKFLARFGLMHIVATNLCVWVRTL
VRESLKEINEFRVTQGHKGEDYMILEGIRRALENRGLMAPNKYLYNLDDFVE
MQEINETMQQASGWVNEEDIVNRTCERVEIMGSIVSDSAPYLYPFIVEYSLIG
AAVLYIMWKHIGRNPRFVYDPEVAGDGMSVLSRRCHSRVDCVGASKGLFCG
LLVLVASLICLILFFVLVNREELKMLAIYLADCSHCGIMFFSIIAMFIGFVRVRQ
LKFHGEREEELDDILLMVSAFGLFAYAVFSTVAGSLSAYTKEPNLLVMVTGIL
SVLQVIIQMVFIKDTQRRQVSLPEHERTKPGRQVVTFLLICNLTMWVIYTFET
QKVEANPVQLEFFGDLPWTILLRCTLPLAIFHRFHSTVVLAAIWKNSYKTRIE

```

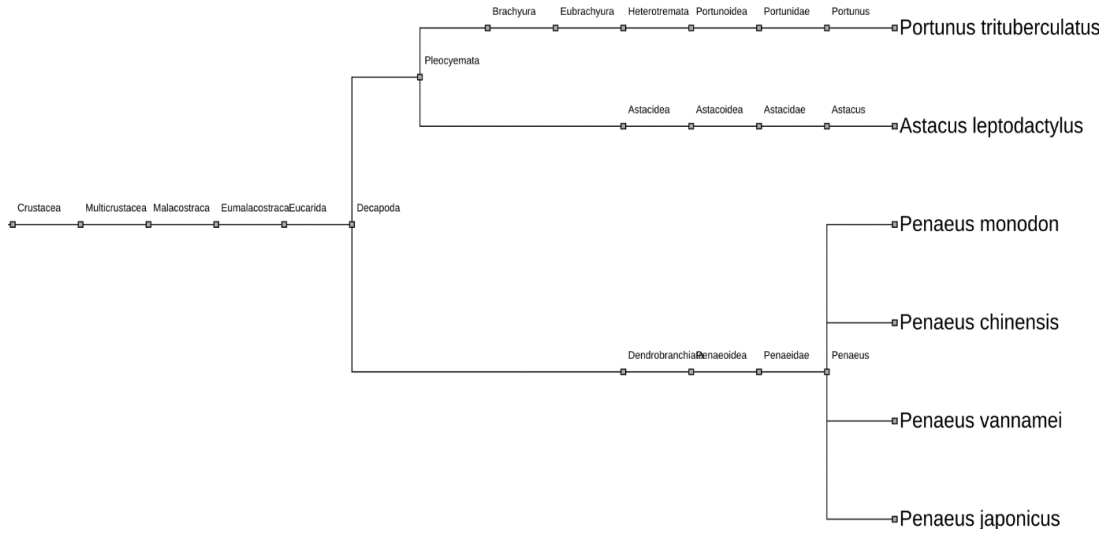
S(204)

Tablo 3.2'deki dizi giriş kısmına kopyalanarak varsayılan ayarlarda blastp işlemi uygulandı;

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Translations&PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC= (RID-G92UJA4X013)

(48). Dizi hizalaması yapılan protein, araştırma grubumuzun proton kanalını izole ettiği kerevit transkriptomunda yer almaktadır. Blast sonucuna göre AA dizimizin *Penaeus chinensis* (Çin beyaz karidesi) gibi birçok organizmanın proton kanalı OtopLc-like protein dizisine benzediği görülmektedir.

BLAST ile yakınlığı görülen türlerin filogenetik ağacı iTOL aracı ile Şekil 3.1'de görselleştirilmiştir (<https://itol.embl.de/itol.cgi>) (49).



Şekil 3.1. BLAST İle Yakınlığı Görülen Türlerin Filogenetik Ağacı.

Daha sonra orijinal dizinin kodladığı AA dizisi Alphafold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) aracı üzerinden herhangi bir şablon kullanılmadan modellenmiştir (50). Modelleme yapılırken AA dizisi arasında ‘:’ işareti olacak şekilde Colab satırına iki defa yapıştırılmıştır. Şekil 3.2’de görülen dimerik protein yapılar elde edilmiştir.

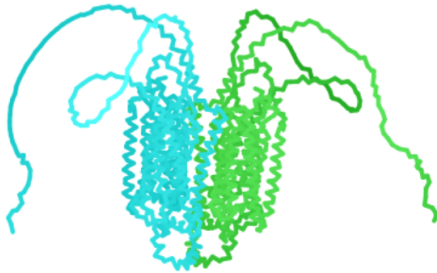
Modellenen bizim dizimizin çıktılarında en yüksek pLDDT= 67.5, pTM=0.74 ve iptm skoru ile Model-4 öne çıkmaktadır (Şekil 3.2).

```

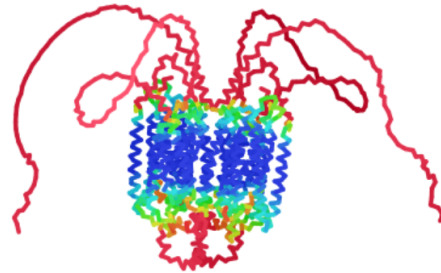
Downloading alphafold2 weights to .: 100% [██████████] 3.82G/3.82G [00:29<00:00, 137MB/s]
2022-08-04 14:45:29,940 Found 5 citations for tools or databases
2022-08-04 14:45:35,748 Query 1/1: OtoPLC204S_6672d (length 1364)
PENDING: 0% | 0/150 [elapsed: 00:00 remaining: ?]2022-08-04 14:45:36,158 Sleeping for 10s. Reason: PENDING
RUNNING: 7% | 10/150 [elapsed: 00:10 remaining: 02:31]2022-08-04 14:45:46,574 Sleeping for 7s. Reason: RUNNING
RUNNING: 11% | 17/150 [elapsed: 00:18 remaining: 02:22]2022-08-04 14:45:54,009 Sleeping for 8s. Reason: RUNNING
RUNNING: 17% | 25/150 [elapsed: 00:26 remaining: 02:12]2022-08-04 14:46:02,418 Sleeping for 9s. Reason: RUNNING
COMPLETE: 100% [██████████] 150/150 [elapsed: 00:37 remaining: 00:00]
2022-08-04 14:46:14,168 Running model_1
2022-08-04 15:28:20,245 model_1 took 2526.1s (3 recycles) with pLDDT 65.2, ptmscore 0.727 and iptm 0.719

```

colored by chain

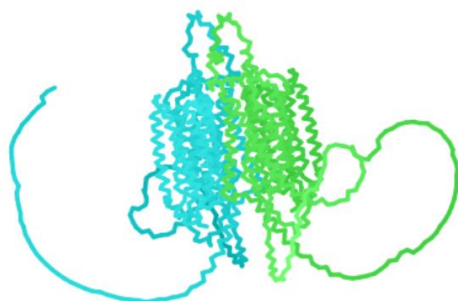


colored by pLDDT

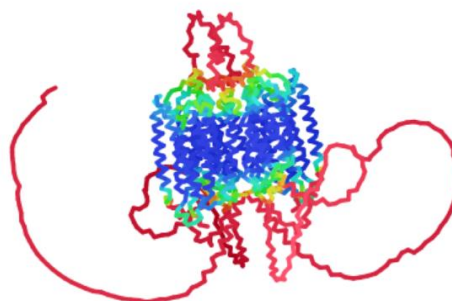


2022-08-04 15:30:18,209 Running model_2
2022-08-04 16:10:59,193 model_2 took 2441.0s (3 recycles) with pLDDT 66.5, ptmscore 0.729 and iptm 0.716

colored by chain



colored by pLDDT

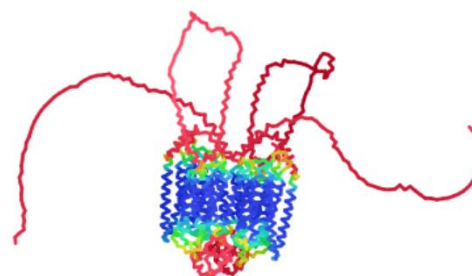


2022-08-04 16:12:56,419 Running model_3
2022-08-04 16:53:39,966 model_3 took 2443.5s (3 recycles) with pLDDT 64.2, ptmscore 0.723 and iptm 0.715

colored by chain

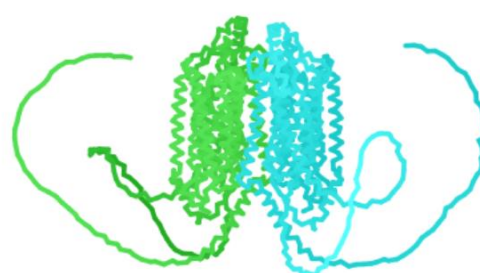


colored by pLDDT

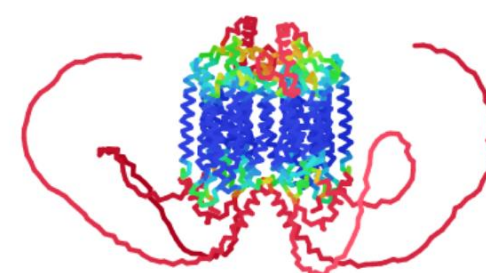


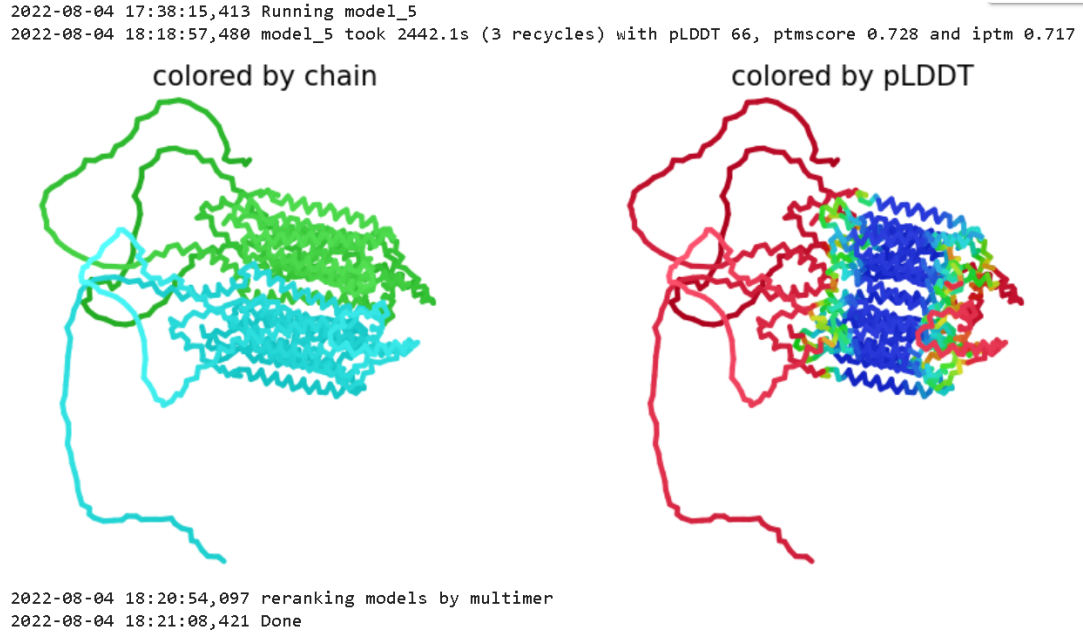
2022-08-04 16:55:37,418 Running model_4
2022-08-04 17:36:18,580 model_4 took 2441.2s (3 recycles) with pLDDT 67.5, ptmscore 0.74 and iptm 0.729

colored by chain



colored by pLDDT

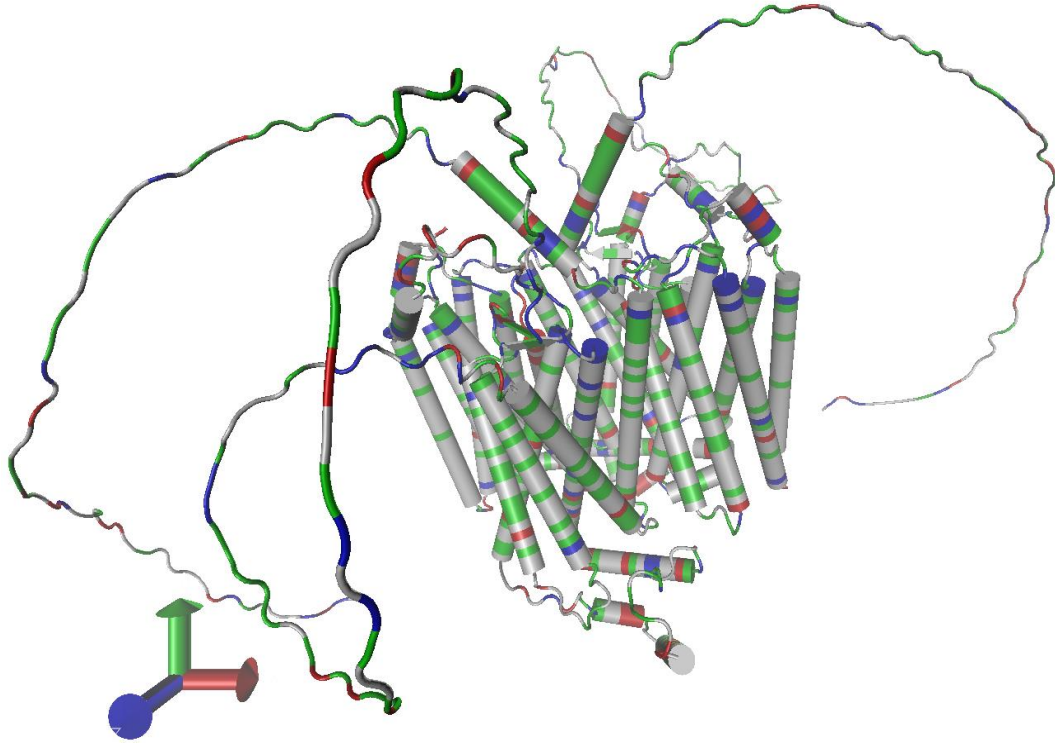




Şekil 3.2. AlphaFold2 Colab Notebook İle Elde Edilen Muhtemelen Farklı Konformasyonlara Sahip Protein Yapılar.

Bu çalışmada kullanılan AlphaFold (Deepmind Inc-Google Inc, ABD) tahminleri, bir atomun genişliğiyle (veya bir nanometrenin 0.1'i) ile karşılaştırılabilir olan yaklaşık 1.6 Angstrom'luk bir ortalama hataya (RMSD) sahiptir (51).

AlphaFold2 Colab Notebook çıktılarında PDB biçimli yapılar ortalama pLDDT'ye göre ve kompleksler ise pTM puanına göre sıralanır. OtopLc Model-4 VMD ile incelendiğinde mavi ile gösterilen z eksenine oturmayan yapı elde edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. OtoplC Proton Kanalı Proteinin Karton Görüntüsü. Protein yapı rezidü tipine göre renklendirilmiştir.

Yine VMD menü tablalarından Extensions>Tk Console aşağıdaki kodlar komut satırına girilerek bazı veriler elde edildi. Bunlar, OTOPLc geometrik merkezi;

```
>Main< (VMD) 4 % measure center $sel
```

```
0.0004111643065698445
```

```
0.0002091285859933123
```

0.00030057664844207466 OTOPLc minimum ve maksimum için koordinatlar Å cinsinden;

```
>Main< (VMD) 5 % measure minmax $sel
```

```
{-39.487998962402344 -57.266998291015625 -39.612998962402344}
```

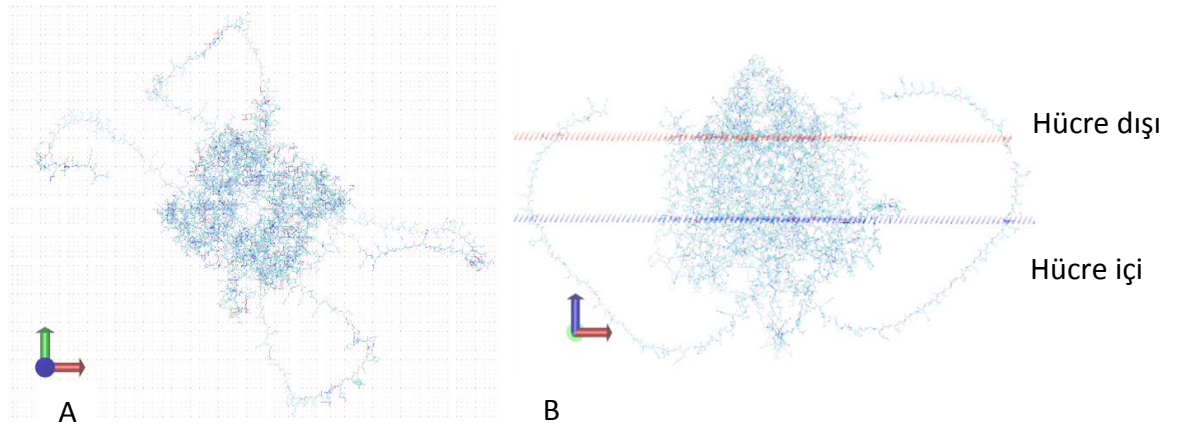
```
{ 39.02199935913086 53.48500061035156 50.11399841308594}
```

şeklinde elde edildi. Buna göre OtopLc proton kanalı proteinin boyutu yaklaşık [79, 111, 90] Å olarak belirlendi.

Proteini z eksenine membran düzlemine dik doğrultuda olacak şekilde membrana yerleştirdiğimizde aşağıdaki sonucu elde ederiz (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/&uuid=a8cacae0-14ba-11ed-b80b-00163e100d53> ,

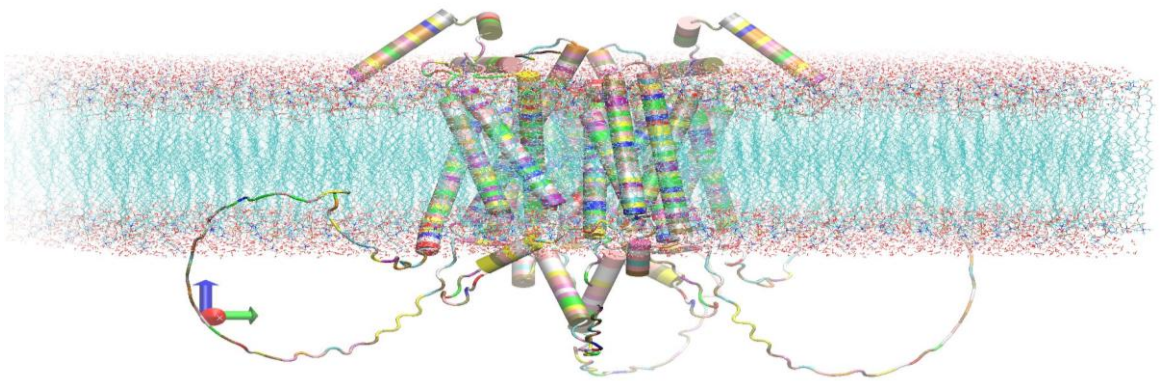
University College London'daki Biyoinformatik Grubunun Psipred-MEMEMBED web tabanlı uygulaması aracılığı ile üretilmiştir) (52).

OtopLc Proteinin membran yüzeyine dik eksene yerleştirildiği Şekil 3.4'de görülmektedir.



Şekil 3.4. Membrana Yerleştirilmiş OtopLc Proton Kanalı Proteininin A) Üstten B) y Eksenini Negatif Tarafından Görünüşü.

VMD'de membrana uygun şekilde yerleştirilen OtopLc proton kanalı proteini aynı konuma denk gelen lipid moleküllerinin combine.tel komutu ile kaldırılması ve membran-protein yapısının birleştirilmesiyle aşağıdaki şekilde görünecektir (Şekil 3.5).

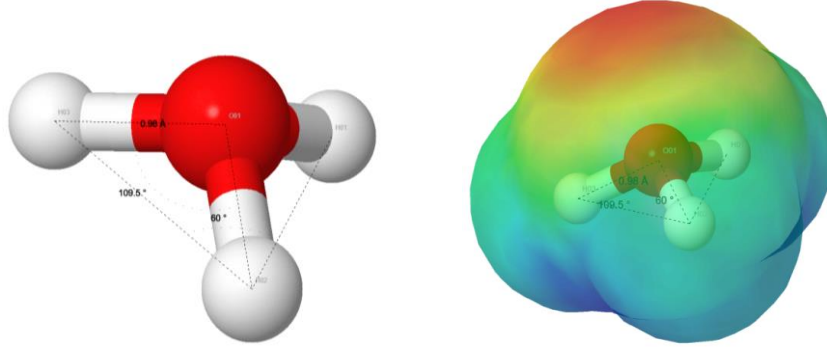


Şekil 3.5. Membrana yerleştirilmiş, lipid molekülleri kaldırılmış ve bütünleştirilmiş membran-protein yapısı. Protein yapı rezidü tipine göre renklendirilmiştir.

3.1. Truba Üzerinde Yapılan Moleküler Dinamik Çalışmalar

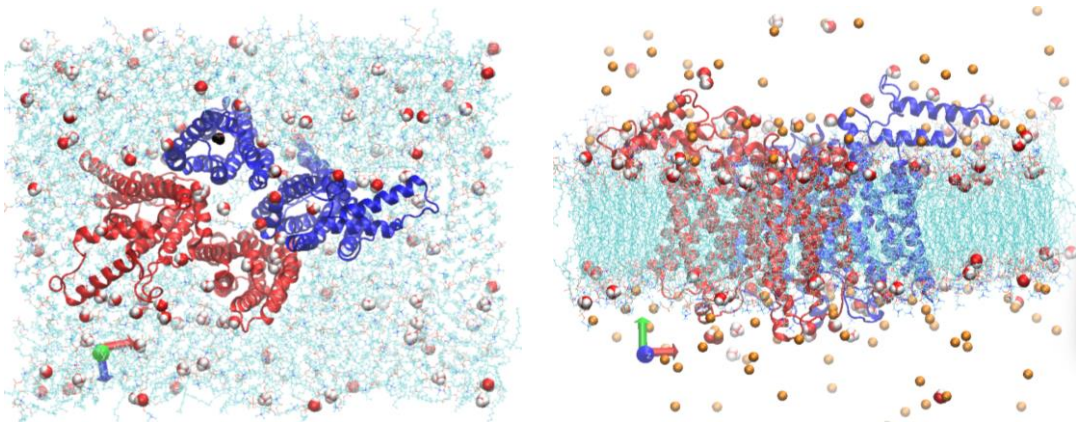
3.1.1. Hidronyum iyonun oluşturulması

Hidronyum iyonu ATB veri tabanı ([H₃O⁺ atb.uq.edu.au](http://H3O+atb.uq.edu.au)) topoloji parametreleri kullanılarak CHARMM TIP3P kuvvet alanı parametreleri ile yeniden yapılandırılarak tetragonal bir geometride üretildi (53)(Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Hidronyum iyonu topoloji modeli ve elektrostatik yüzey ile gösterimi.

Bu işlemler için hazırlanan sistemde OtopLc dizimizde ,fonksiyonel olmadığı düşünülen sekans parçaları çıkarılarak dizi 498 AA uzunluğuna indirgenmiş ve Alphafold2 üzerinde yeniden modellenmiştir. Önceki tam dizi sistemle topolojik bir farklılığı olmadığı görülerek sistem hidratlanmış, dimerik OtopLc molekülüne 7Å'dan daha uzak su molekülleri çıkarılmış ve sistem CHARMM36 kuvvet alanı ile modellenen POPC membrana yerleştirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Membran Üzerine Yerleştirilmiş İndirgenmiş OtopLc Simülasyon Başlangıç Sistemi, özel olarak tasarlanmış hidronyum iyonları yer almaktadır.

VMD (54) programı üzerinde POPC lipidleri seçilerek 120x160 Å² boyutunda xy düzleminde 382 adet lipid zincirinden (51188 atom) oluşan lipid çift tabaka elde

edildi. Protein bu yapının içerisine yerleştirildi. Membran içindeki yapıyı fizyolojik ortama benzetmek için sisteme toplam 34637 adet su molekülü (103911 atom) eklenerek membran-protein sistemi kuruldu. Proton iyonlarını temsilen trigonal yapıda tasarlanan 120 adet hidronyum iyonu suya yerleştirildi. Sistemi nötralleştirmek ve fizyolojik değeri sağlamak üzere 0.15 M'lık bir iyon eklendi (121 sodyum, 221 klor atomu). Rezidülerde 44868 olmak üzere toplamda sistemde 196732 atom bulunmaktadır ve sistem boyutu $120 \times 160 \times 94 \text{ \AA}^3$ boyutlarındadır. Sistemin görünümü Şekil 3.7'de verilmiştir.

Tüm MD simülasyonları NAMD (55,56) programının 2.11 versiyonu ile yapıldı ve CHARMM (19) kuvvet alanı (versiyon CHARMM36) kullanıldı. Tüm yönler için periyodik sınır koşulları uygulandı.

PME algoritması kullanan sabit NPT topluluğunda uzun menzilli elektrostatik etkileşimler gerçekleştirildi. Langevin Pistonu, 50 fs piston bozulumu ve 100 fs piston periyodu ve 1 atm basınç sağlamak üzere kullanıldı. Van der Waals etkileşimlerinde kesme (*cut-off*) mesafesi 12 \AA ve switching mesafesi 10 \AA değerinde tutuldu. Simülasyon boyunca zaman adımı 2 fs olarak alındı ve her 1 ps aralıklarla simülasyon verileri kaydedildi.

Sistem kurulduktan sonra öncelikle sistemin dengeye getirilmesi gerekmektedir. Sistemi dengeye getirme işlemi sırasında protein yapısının omurga ve diğer ağır atomlarına harmonik kuvvetler (*constraint*) uygulandı. Buradaki amaç proteinin lipit ve su atomlarıyla birlikte adapte olmasını ve sistemde sabit NPT simülasyon koşullarını sağlamaktır. Protein üzerindeki harmonik kuvvetler belirli zaman aralıklarında azaltıldı ve k kuvvet sabiti 0 kcal/mol/\AA^2 olana kadar simülasyon devam ettirildi. Tablo 3.3'te MD simülasyon zamanı; K_{bb} protein yapının omurga atomlarına; K_{sc} yine protein yapının hidrojen atomu hariç yan zincirlerine; K_{ion} iyonlara xyz yönünde uygulanan kuvvet sabitini göstermektedir (57-59).

Tablo 3.3. Harmonik Kuvvet Sabitlerinin Simülasyon Süresince Azaltılması.

MD Zamanı(ps)	k_{bb} (kcal/mol/Å²)	k_{sc} (kcal/mol/Å²)	k_{ion} (kcal/mol/Å²)
1000	10	5.0	2.0
1000	5.0	2.0	1.0
1000	2.0	1.0	0
1000	1.0	0.5	0
1000	0.5	0.0	0
1000	0.1	0.0	0
1000	0	0	0

4. BULGULAR

Otopetrin benzeri proton kanalı proteini transmembran AA ve yüklü segmentler aşağıdaki web arayüzü ile bulundu (<http://tmfinder.research.sickkids.ca/cgi-bin/TM-Finder.cgi?ID=guest1655203193>) (60,61). Bu web aracı ile elde edilen veriler Tablo 4.1'de OtopLc proton kanalı transmembran segmentleri AA numaraları ve elektriksel yükleriyle birlikte görülmektedir.

Tablo 4.1. TM finder Web Uygulmasından El Edilen Transmembran Segmentler ve Yükleri

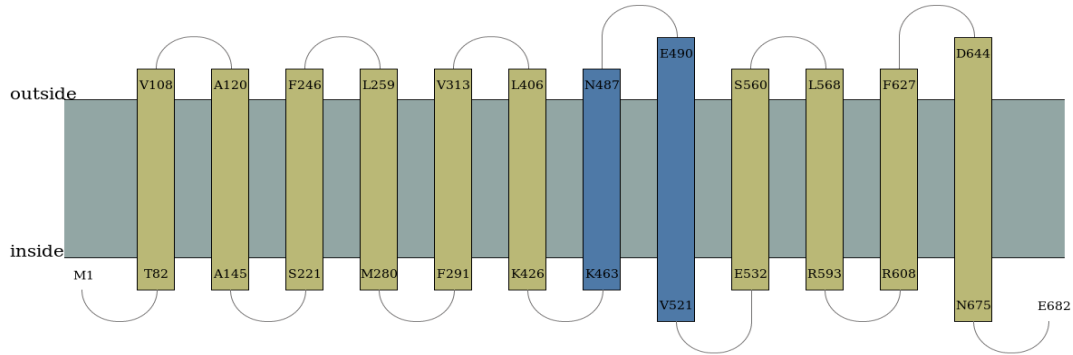
Segment No	Başlangıç	Son	Uzunluk	Yük miktarı	TM segmentlerin AA dizisi
1	85	108	24	--	FITLSLLYATLLVVVCL GFVLSEV
2	118	140	23	--	YEAFFTYLYGLSILFLL YVLCYL
3	223	247	25	--	LRIGAIAFGLGTMIYNG LEFGVFFE
4	262	281	20	--	NPLLQLVFTFMQMYFIF MNA
5	292	311	20	Yüksek*	ARFGLMHIVATNLCVW VRTL
6	409	424	16	--	IVEYSLIGAAVLYIMW
7	465	485	21	--	FCGLLVLVASLICLILFF VLV
8	506	520	15	--	MFFSIIAMFIGFVRV
9	537	553	17	--	LLMVSAFGLFAYAVFS T
10	569	586	18	--	VMVTGILSVLQVHIQMV F
11	610	626	17	--	VTFL LICNLTMWVIYTF
12	653	671	19	Yüksek *	TLPLAIFHRFHSTVVLA AI

*yüksek yük içeriği, TM segmentde \geq %15 yüklü amino asitlerin varlığını gösterir. Helisite > 1.1 ve Hidrofobiklik > 0.4 , uzunluk ≥ 6 olan çekirdeklerden başlayarak ≤ 4 'lük boşluklar kapatılmış, < 10 'lük segmentler kaldırılmıştır. Mor renk kodlu amino asitler TM segmentindeki yüklü amino asitleri göstermektedir.

4.1. Yapısal Analiz

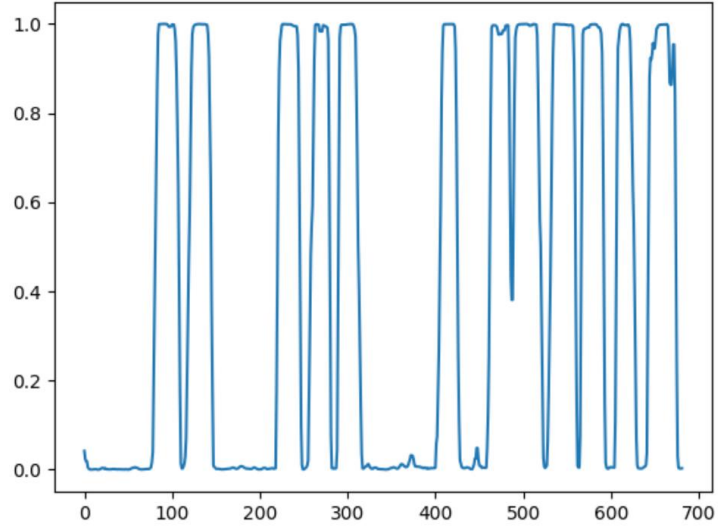
Transmembran protein yapısı tahmini; (62,63)

<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/> AA dizisinin sitesinde uygun alana girilmesi ile aşağıdaki yapı elde edildi. MemBrain, transmembran protein yapı tahmini için geliştirilmiş bir web sunucusudur. Bugüne kadar, iki ana tahmin fonksiyonunu, yani transmembran heliks (TMH) tahmini ve TMH-TMH rezidü temas tahmini içermektedir. OtopLc proton kanalının bir momomerinin transmembran heliks segmentleri Şekil 4.1’de görülmektedir. Otopetirin ailesindeki diğer proton kanalları gibi 12 adet TMH segmenti bulunmaktadır.



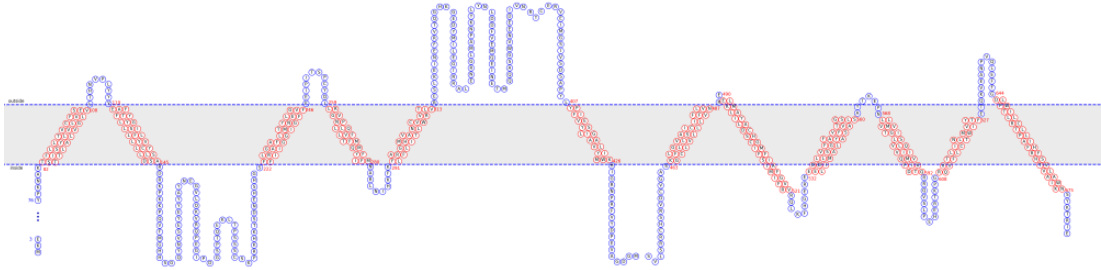
Şekil 4.1. OtopLc Proton Kanalının Bir Momomerinin Transmembran Heliks Segmentleri. Mavi ile gösterilenler ard arda olan TMH segmentleridir.OTOP1 Şematik Gösterimi (29).

Transmembran helikslerin bulunduğu rezidü numaralarına göre eğilim (*prospensity*) değerlerinin değişimi Şekil 4.2’de görülmektedir. Buradan OtopLc proton kanalını oluşturan yapının her bir dimerinin 12 adet transmembran heliksini bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.2. Her Rezidü İçin TMH Eğilimleri.

Protein-lipid etkileşimleri, zar proteinlerinin yapısal stabilitesinde ve biyolojik işlevlerinde önemli roller oynamaktadır. Zar proteinlerindeki amino asit eğilimleri lipid moleküllerinin baş ve kuyruk gruplarıyla etkileşim lipofilisite ile açıklanır (64). Ayrıca intraselüler ve ekstraselüler heliks yapılar Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3. Membran ve Transmembran Segmentler Kırmızı: TMH (Transmembran Heliks), Mavi: ilmekler (*linker*).

OtopLc proton kanalının N ve C domainleri Tablo 4.2'deki gibi ayrı parçalar olarak değerlendirildiğinde 6'şar adet TM segmenti bulunan protein Şekil 4.4'te görüldüğü gibi bir yapıya sahiptir. Bu domainlerin yapısının Otop-1 ve Otop-3 ile benzer şekilde birbirini tekrarlayan yapılar olduğu Şekil 4.5'te görülmektedir.

Tablo 4.2. N ve C Domainlere Ayrılmış AA dizisi

N Domain	MKERLLLSRDPPLATMDEPSPHDATDNQLLEVHQTPVGTVVKLNAD GYGSHTSPTHRVESYYTGTLESRRGLLEYYPKNAKTST 1-(İSS)-FITLSLLYATLLVVVCLGFVLS VLTHNVPLYY 2-(ESS)- YEAFFTYLYGLSILFLLYVLCYLLSDSARDRKPKKPQVFMGHHSQY NVSEYEY YAYNEGVLQKVRQPEGIPDGSPTQEKLTPSSSCSKPRKHKTSKDNEHSH GSFF 3-(İSS)-LRIGAI AFGLGTMIYNGLEFGVFF IPIT SPCYQILRGV 4-(ESS)-NPLLQLVFTFMQMYFIFMNA RLNIHKFKFL 5-(İSS)-RFGLMHIVATNLCVWVRTL VRESLKEINEFRVTQGHKGEDYMILEGIRRALENRGLMAPNKYLYNL DDFVEMQEINETMQQASGWVNEEDIVNRTCERVEIMGSIVSDSAPYL YPF 6- (ESS)-IVEYSLIGAAVLYIMW(İSS)K
C Domain	HIGRNPRFVYDPEVAGDGMSVLSRRCHSRVDCVGASKGL 7-(İSS)-FCGLLV VASLICLILFFVLVNREELKMLAIYLADCSHCGI 8-(ESS)-MFFSIAMFIGFVR RQLKFHGEREEELDDI 9-(İSS)-LLMVS AFGLFAYAVFSTVAGSLSAYTKEPNLL 10-(ESS)-VMVTGILSVLQVIQMVFIKDTQRRQVSLPEHERTKPGRQV 11-(İSS)- VTFL LICNLTMWVIYTFETQKVEANPVQLEFFGDLPWTILLRC 12-(ESS)-TLPLAIFHRFHSTVLA AI(İSS)WKNSYKTRIE

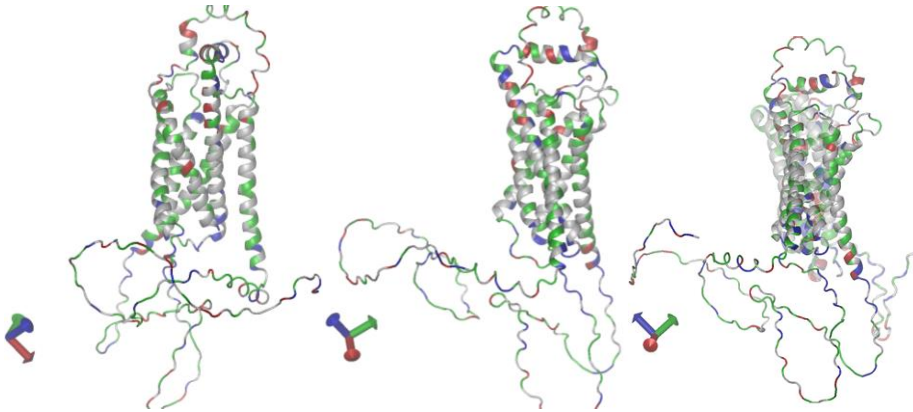
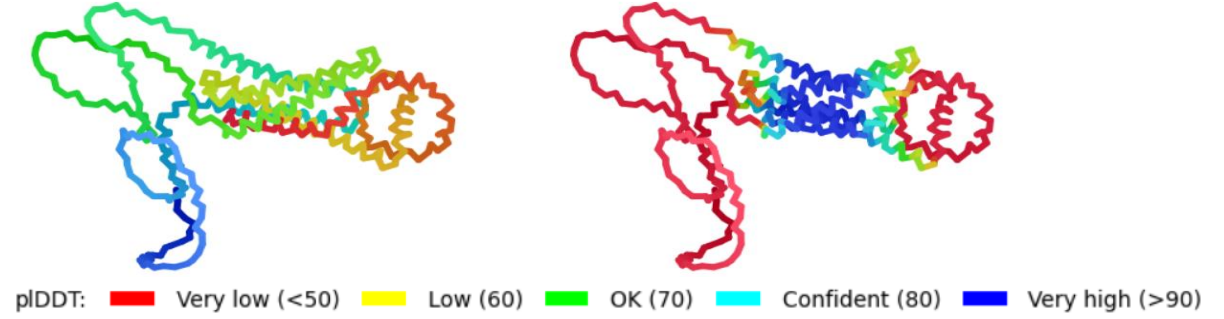
Transmembran segmentler kırmızı olarak işaretlenmiştir. Mor renk yüklü AA'leri göstermektedir. Koyu renkli TMH'ler yüksek yük miktarını göstermektedir. Koyu kırmızı alfa heliks oluşumunu önleyen prolin AA (P). N ve C domainleri ayrı ayrı modellendiğinde Alphafold'da elde edilen üç boyutlu yapılar Şekil 4.4'te görülmektedir. Bu yapılar üst üste bindirildiğinde Şekil 4.5'te görüldüğü gibi N ve C domainlerin birbirine benzer yapılar olduğu görülmektedir.

2022-08-17 07:56:30,771 Running model_3

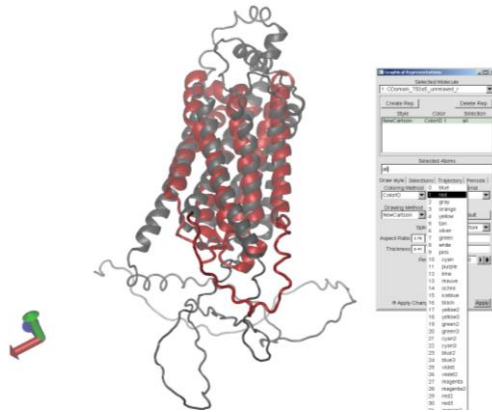
2022-08-17 08:00:46,000 model_3 took 252.1s (3 recycles) with pLDDT 60.1 and ptmscore 0.56

colored by N→C

colored by pLDDT

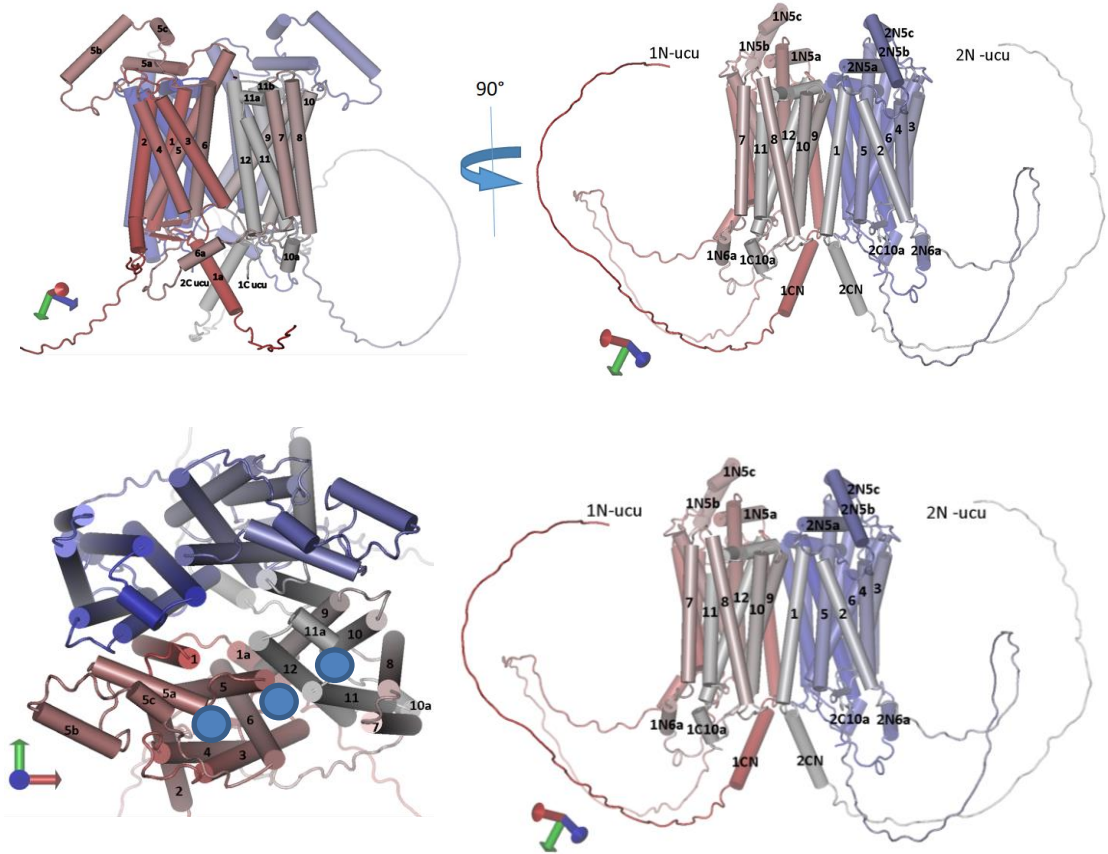


Şekil 4.4. N-Domain AphaFold Sonucu ve VMD de Farklı Açılardan Görünüşü.



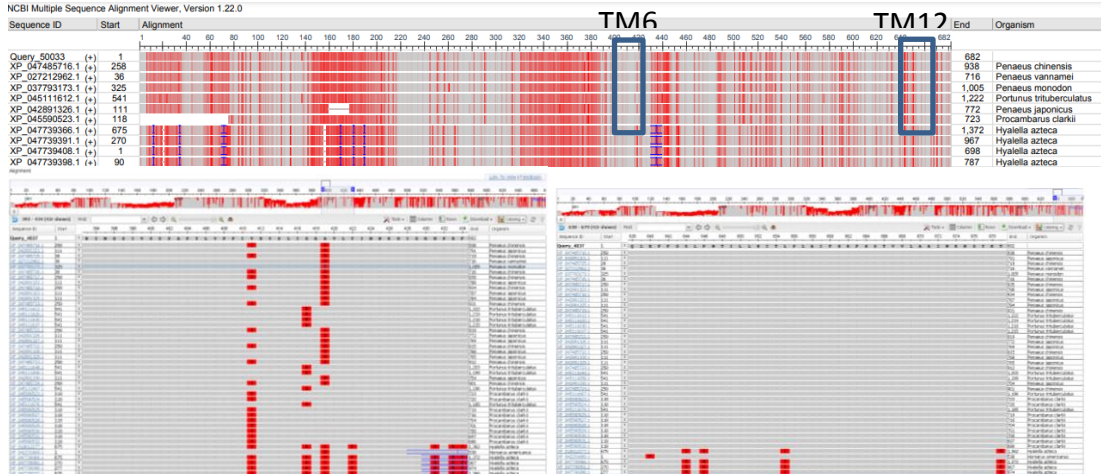
Şekil 4.5. A) N-Domain farklı açılardan B) N-Domain Gri, C-Domain kırmızı renkle birlikte gösterilmiştir.

OtopLc dimerik proton kanalının yapısı TMH segmentleri numaralandırılarak Şekil 4.6’da farklı projeksiyonlardan karton gösterim ile verilmiştir.



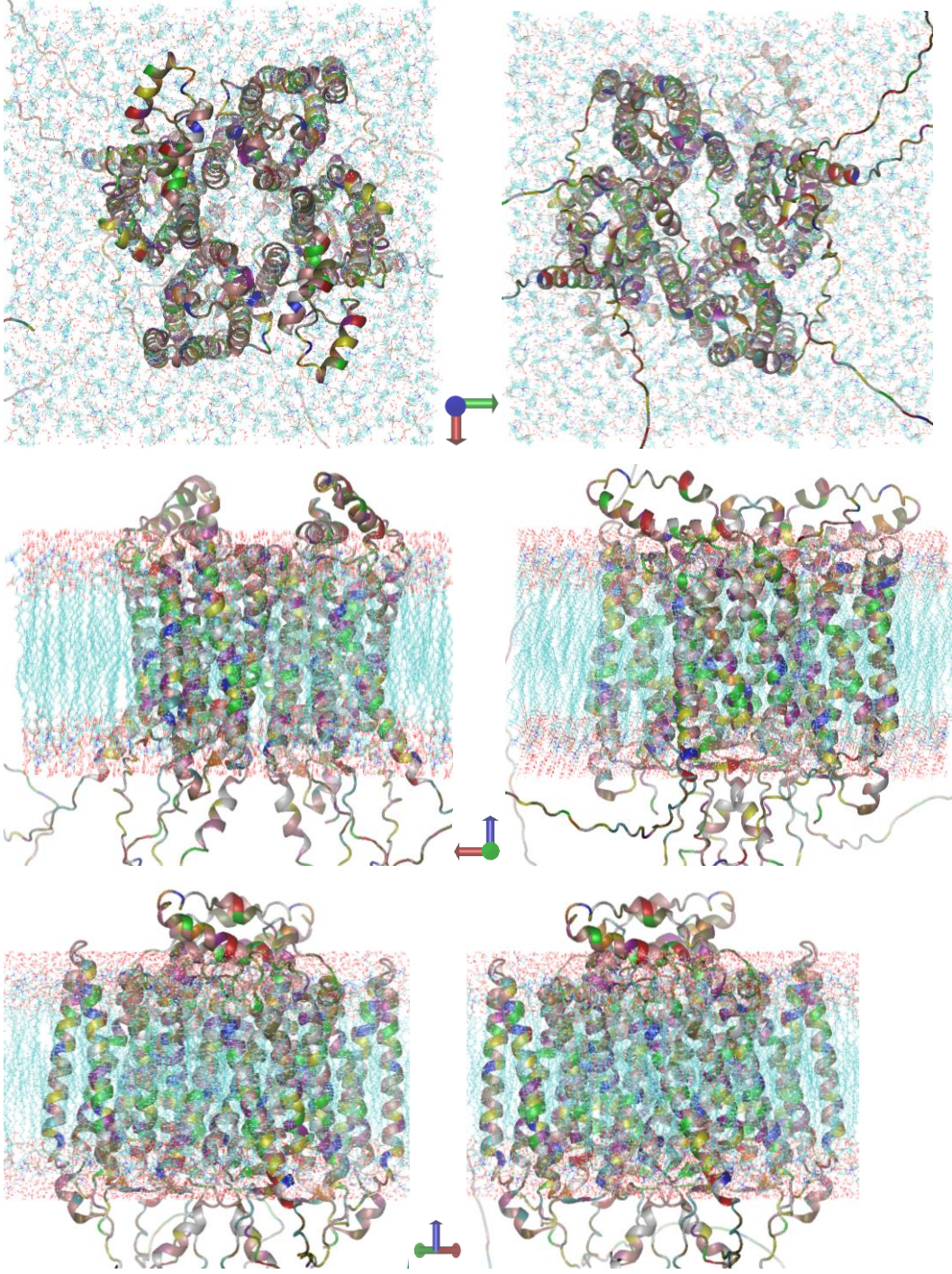
Şekil 4.6. OtopLc Proton Kanalının Dimerik Yapısı İçersinde TM Segmentler ve Domainler.

Otop1'in alt birim arayüzüne esas olarak TM6 ve TM12 aracılık ettiği ve yüksek oranda korunduğu, bunun da yapısal ve işlevsel bütünlükte kritik bir rol olduğunu gösterdiği ifade edilmektedir (29). OtopLc proteinimizde TM6: L406-K426 AA arasında, TM12: D644-N675 AA arasında yer almaktadır. Özellikle TM12'nin akraba organizmalar arasında büyük oranda korunduğu görülmektedir. TM1 ve TM9'un aracılık ettiği alt birimler arası arayüz, Otop1 ve Otop3 arasında ve Otopetrinler arasında daha az korunur (Şekil 4.7). TM segmentlerin türler arasındaki korunumu gri bölgeler halinde MSA hizalama analizinde görülmektedir. Aynı resimdeki kırmızı işaretli AA'ler farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.7. OtopLc Proton Kanalının Otopetrin Ailesiden Diğer Yapılara Göre AA Dizileri İçerisindeki Farklılıklar (kırmızı ile işaretlidir).

Her OtopLc alt birimi, ilk altısı (TMH1-6) N alanını, kalan altısı (TMH7-TM12) C alanını oluşturan on iki transmembran sarmal (TMH1-TMH12) içermektedir. N ve C alanları yapısal ve boyutsal olarak benzerdir. Yapıların, Otop1 ve Otop3'e benzer şekilde $70\text{\AA} \cdot 50\text{\AA} \cdot 50\text{\AA}$ boyutlarında küboid şekilli homodimerler olduğu ve sıralı segmentlerinin büyük kısmının zar içinde bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.8). OtopLc, diğer Otopetrinlere benzer şekilde N (amino-terminal) ve C (karboksi-terminal) *domain* olmak üzere iki kısma bölünebilir. Bu proteinin özdeş iki yapısının homodimerik düzenlemesiyle, iki alt birimden N ve C *domain*leri, bir merkezi eksen çevreleyen dört kadranı teşkil eder. Sonuçta psödötetramerik bir yapı oluşur (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Membrana yerleştirilmiş dimerik otople proton kanalının farklı açılardan görünümü.

4.2. Moleküler Dinamik Çalışmaları

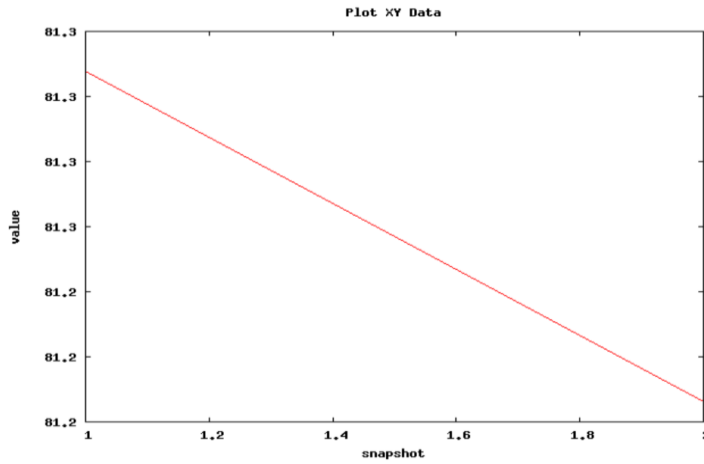
WebMD platformu üzerinde yapılan çalışmalarda ilk sistem, fizyolojik ortamın bir tahmini olan OtopLc'nin konformasyonel dinamiklerini araştırmak için kuruldu, burada tüm protein bir lipid çift tabakasına yerleştirildi ve bir kutu içinde solvatlandı.

4.2.1. Sistem Hazırlama ve Simülasyonlar

Otoplc VMD Charmm 36 (C-36) lipid çift katmana yerleştirildi. Proteinle örtüşen lipid molekülleri, combine.tcl uygulaması ile çıkarıldı ve WebMD (irbbarcelona.org) (65) ortaya çıkan OtopLc/çift tabakalı sistemin enerjisi en aza indirildi ve 5 ns için dengelendi. OtopLc'nin H olmayan atomları protein etrafındaki lipidlerin paketlenmesinin gevşemesine izin vermek için sınırlandı.

Dönme yarıçapı (Radius of gyration) zaman ekseninde değişimi Şekil 4.9'da görülmektedir. Dönme yarıçapı, basitçe proteinin kütle merkezi ile her iki terminali arasındaki mesafenin uzunluğudur. Proteinlerin dönme yarıçapı (RoG), kompaktlığının bir ölçüsüdür. Bir protein kararlı bir şekilde katlanırsa, muhtemelen nispeten sabit bir RoG değerini koruyacaktır. Bir protein açılırsa, RoG zamanla artacaktır. Burada bizim proteinimiz modelleme sürecinde RoG küçülmekte dolayısıyla kompaktlaşmaktadır.

Radius of Gyration_07 (Units in Å)

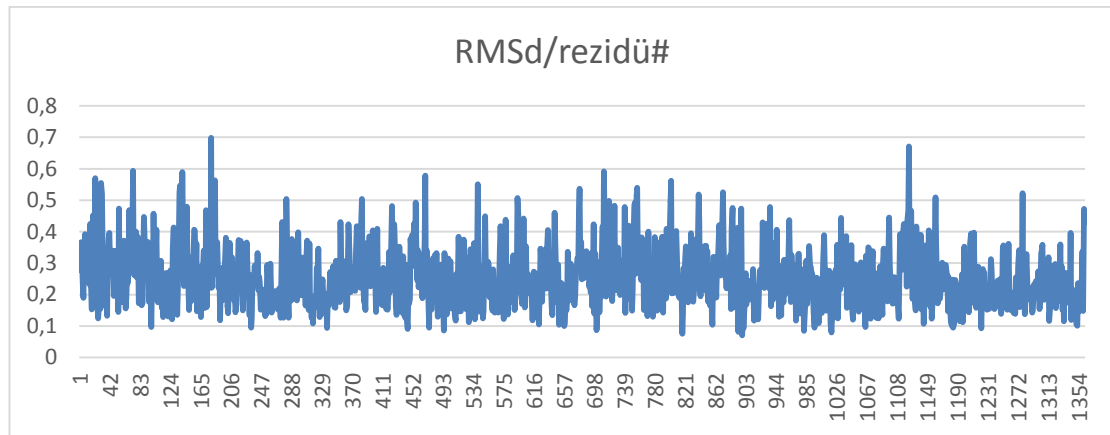


Şekil 4.9. Dönme Yarıçapının Zamanla Değişimi.

OtopLc'nin kristal yapısına polar hidrojenler eklendi. Tüm rezidüler için default protonasyon durumları varsayılmıştır. Doğal lipid çift katmanlarda, kolesterol veya kolesterol benzeri lipidler, dimerik protein düzeneğini stabilize etmek için muhtemelen merkezi tünele bağlanmaktadır (29). Saotome ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (29) Otop1 ve Otop3 için merkezi vestibüldeki kolesterol moleküllerinin düzenlenmesinin, mikrosaniye altı MD simülasyonları boyunca korunduğu, kolesterol benzeri parçalar için kararlı bağlanma sağladıkları ifade edilmiştir. Bizim sistemimiz de benzer şekilde ancak daha kısa süreli (100ns) MD simülasyon boyunca stabil kaldığı ve dimerik yapının dağılmadığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada kolesterolün çıkarıldığı Otop1 simülasyonlarında, geniş merkezi vestibülden önemli ölçüde konformasyonel kayma ve sınırsız su ve iyon difüzyonu gözlemlendiği ifade edilmiştir. Buna karşılık bizim modelimizde böyle bir dağılma ve membran üzerinde su veya diğer iyonların serbest geçişi gözlemlenmemiştir.

Protonların, su moleküllerinden ve/veya amino asit parçalarından oluşan hidrojen bağlı bir ağ boyunca Grotthuss mekanizmasıyla 'atlayarak' zar proteinleri üzerinden taşındığı düşünülmektedir. Otopetrinlerdeki proton iletim yolları bu sebeple muhtemelen en azından kısmen hidrate olmalıdır (29).

Çalışmanın başlangıcında gerçekleştirdiğimiz MD simülasyonlarında protein omurga karbonlarının yerdeğiştirme ölçüsü RMSD değerlerindeki 3 Å altındaki dalgalanmalar kısa süre içerisinde konformasyonel bir değişiklik olmadığını göstermektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Rezidülerin RMSD Değişimi.

Atomik dalgalanmaları gösteren B faktöründeki dalgalanmalar özellikle intraselüler ve ekstraselüler *linker*ların bağıl serbest dalgalanmalarından kaynaklanmaktadır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Rezidülerin Atomik Harmonik Osilatör Dalgalanma (B) Faktörü.

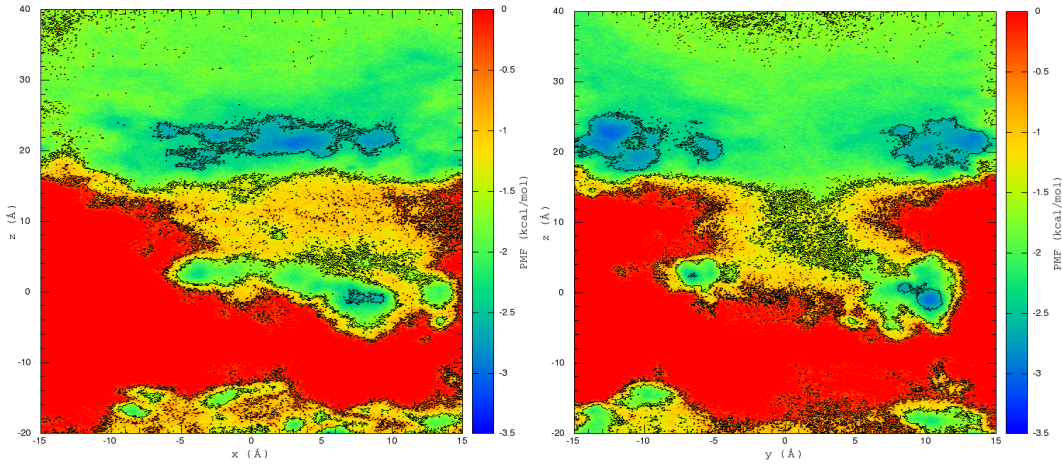
4.2.2. TRUBA MD Simülasyonları

Sistem Bölüm 3.1'de anlatıldığı şekilde kuruldu. Tübitak Ulakbim *High Performance Computing* (HPC- yüksek başarımlı hesaplama) altyapısı TRUBA üzerinde NAMD kullanılarak her biri 2 fs olan 500k adımdan oluşan 100ns lik simülasyonlar NAMD kodların *batchscript* (toplu iş kodları dosyası) olarak girilmesiyle 20 günlük hesaplama periyotları boyunca gerçekleştirilmiş ve toplamda 200ns'lik veriler elde edilmiştir.

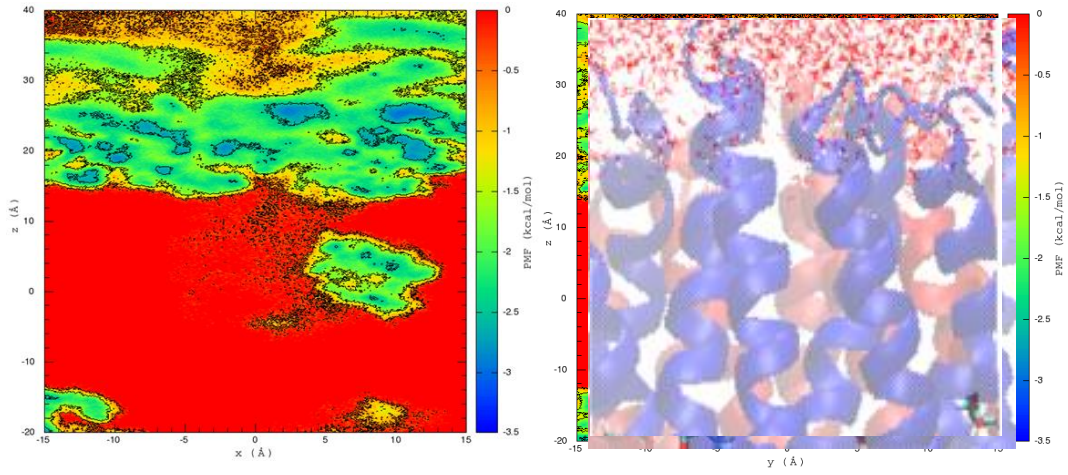
Tüm sistemin boyutları: {-59.99800109863281 -81.58399963378906 -41.99599838256836} {59.98099899291992 80.09400177001953 51.99399948120117} koordinat aralığında yaklaşık $120*160*94\text{\AA}^3$ olarak belirlenmiştir.

Sodyum ve hidronyum iyonlarının MD simülasyonu ile elde edilen izledikleri yol verilerinden x-z ve y-z düzleminde PMF haritaları elde edildi. Hücre dışı ve hücre içi bölgelerin iyon iletim yollarını araştırmak için iyon yol harita yoğunluklarının iyon başına termal enerji ($k_B T$) ile çarpımından elde edilen PMF profilleri hesaplandı. 2-D PMF profilini hesaplamak için hücre dışı bölgeden $0.3\ \mu\text{s}$ MD simülasyonundan elde edilen iyon dağılımını kullanıldı. 2-D PMF profiline göre, Şekil 4.12A,B'de için sırasıyla x-z ve y-z düzlemlerinde mavi bölgeler Na^+ iyonların bulunma olasılığının yüksek olduğu bölgeleri göstermektedir. Na^+ iyonların simülasyon boyunca izledikleri yol verilerinden ile etkileşime giren rezidüler

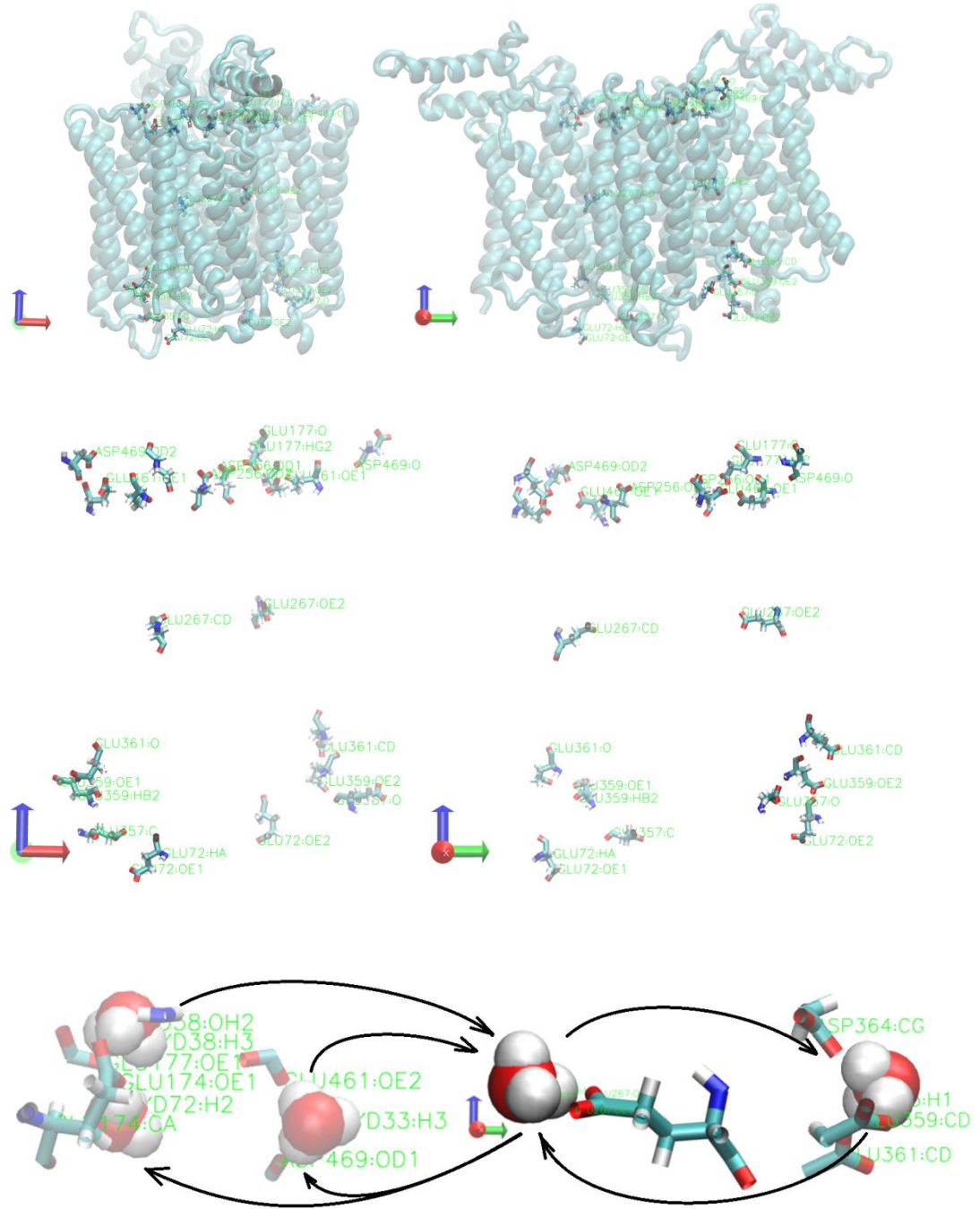
belirlendi (Şekil 4.12). Hidronyum iyonları için de aynı veriler görselleştirilerek Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.12. Na^+ İyonlarının Sırasıyla x-z ve y-z Düzlemlerindeki PMF Profili.



Şekil 4.13. Hidronyum İyonlarının Sırasıyla x-z ve y-z Düzlemlerindeki PMF Profili.



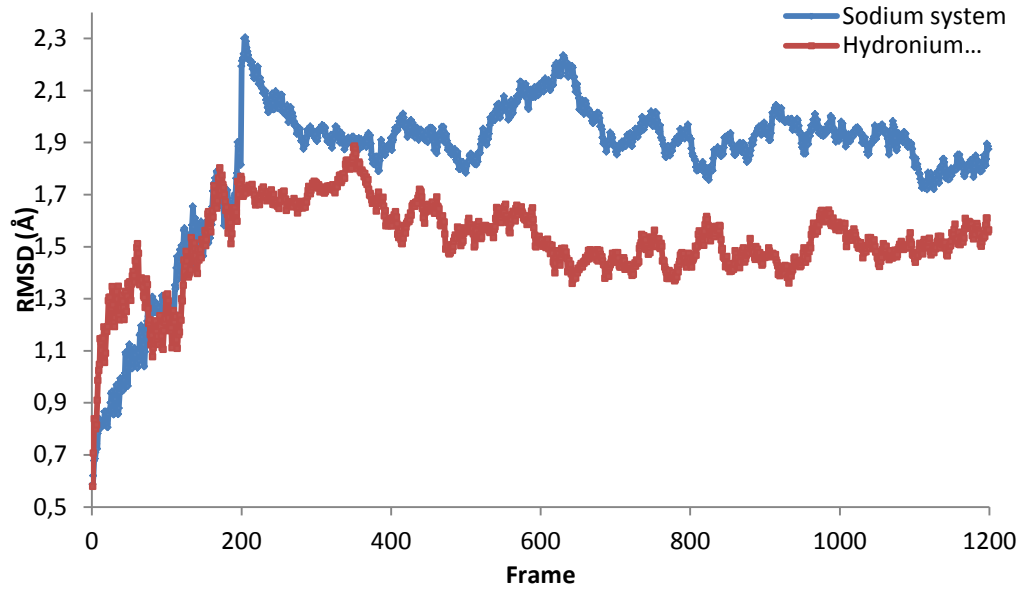
Şekil 4.14. Katyonların Bağlandığı AA'ler ve Protein Yapı İçerisindeki Yerleri.

5. TARTIŞMA

İyon kanallarını işlevini anlamak için kapılama işlevinin, iyon seçicilik mekanizmasının ve iyon iletim yollarının anlaşılması gerekir. İyon kanallarındaki kapılama işlevi voltaj, ligand veya mekano duyarlı olarak membran proteinin konformasyonuna dayalıdır. Şimdiye kadar en detaylı şekilde karakterize edilen proton seçici iyon kanalları, influenza virüsünün içinde pH düşmesinde rol alan bir viral protein olan M2 ve pH'yı korumak için fagositik solunum artışı sırasında protonların dışa akımının gerçekleştiği insan voltaj kapılı proton kanalı olan Hv1'dir (66). Ancak yapısal olarak bu kanallardan ayrı olan bizim membran proteinimizin de üyesi olduğu Otopetrin (OTOP) proton kanallarının voltaja bağlı olmadıkları da deneysel olarak gösterilmiştir (41).

OTOP proton kanallarının asit, ekşi tat algılama ve biyomineralizasyonda görev aldıkları, gastrointestinal sistemdeki mutasyonlarının inflamasyon, kanser gibi hastalıklarda etkili olabildiği (67, 68) omurgalılar ve kabuklular dahil bir çok türler arasında korundukları bilinmektedir (41, 42, 69-71). pH 'ya duyarlılıkları da bazik dış ortamda dışarı küçük akımlar, dış asitik ortamda içeri doğru pH ile artan akımlar olduğu gözlemlenmiştir. Yaptığımız simülasyonlarda hem ekstraselülerden intraselülere hem de intraselülerden ekstra selülere proton bağlanma bölgelerinin bulunması bu sonucu desteklemektedir. OTOP1-3 kanallarının ekstraselüler ortamda pH'nın 6'nın altında azalmasıyla doğru orantılı olarak içe doğru artan proton akımları ilettiği gösterilmiştir (41). Bizim sistemimizde 1085 nm³'lük hacim içerisinde sadece hidronyum iyonlarıyla pH'nın benzer değerlerini simüle etmek mümkün değildir. Ancak bu hacmin en az 100 katı büyüklüğünde bir hacimde 1 hidronyum iyonu ile fizyolojik bu durum simüle edilebilir. Bu durumda simülasyon süresini birkaç yüz µs ye uzatmak gerekir ki hesaplama maliyeti ve zaman açısından mevcut teknolojik imkanların yetersizliği sebebiyle bu mümkün değildir. Kaldı ki hesaplanabilen bu düşük pH (3-5) değerlerinde deneysel sonuçlar kanalın yeniden inaktif hale geldiğini göstermektedir (41). Bizim 24üncü-25inci ns'lerdeki *constraint*lerin kaldırılmasını müteakip kanal üzerinden herhangi konformasyon ve tüm simülasyonlarımız boyunca bir iyon geçişi (Şekil 5.1) gözlemlenmemiştir. Bu

veriler ışığında Na^+ iyonu ile kurulan sistemin pH değerinin nötr olması sebebiyle protein C_α omurga atomlarının daha fazla yer değiştirdiğini ve böylelikle Na^+ iyonlarının nüfuz edebileceği hidrate vestibüllerin oluşarak Şekil 4.12’de görüldüğü gibi Na^+ iyonlarının protein yapıda hidronyum iyonu ile kurulan sistemde daha derine gidebileceği gösterilmiştir. Hidronyum iyonlarının Cl^- iyonları ile nötralize edildiği sistemde ise protein C_α omurga atomlarının RMSD değerlerinin düşük çıkması buradaki OtopLc proteinin daha az gevşediğini göstermektedir. Bu durumu 1085 nm^3 hacimde bulunan 120 adet hidronyum iyonuna bağlı olarak pH değerinin yaklaşık 1 olarak hesaplanması sebebiyle bu pH değerinde iyon kanalının inaktif hale gelmesi deneysel gözlemiyle (66) örtüşmektedir.

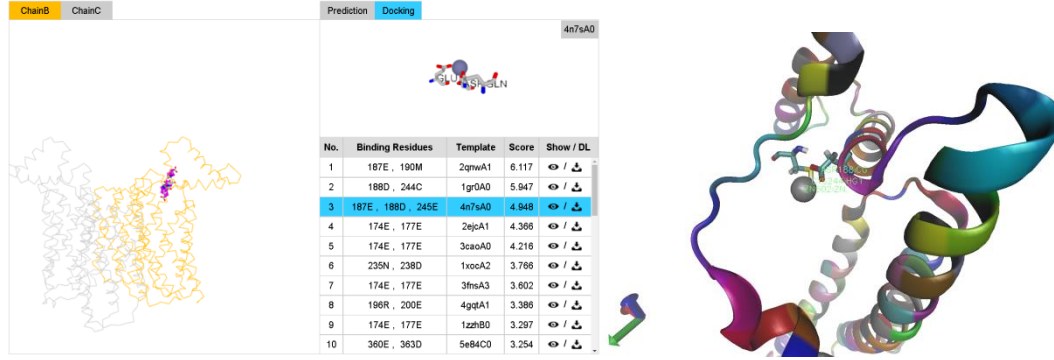


Şekil 5.1. Simülasyon Boyunca Protein Omurga C_α RMSD Değerleri.

Na^+ ve Cl^- iyonlarının bulunduğu MD simülasyonlarında ve hidronyumun Cl^- iyonları ile nötralize edildiği MD simülasyonlarında 300ns’ye kadar membran ve üzerindeki transmembran OtopLc proton kanalı üzerinden herhangi bir iyon geçişi gözlemlenmemiştir. Hidronyum iyonlarının OtopLc üzerinde buluma olasılığının yüksek olduğu özellikle tuz köprülerinin üzerinden Grotthuss mekanizmasıyla atlayarak geçebileceği ön görülmektedir (Şekil 4-14, 15).

İyon kanalının konformasyonel değişikliğe gitmesini sağlayabilecek diğer bir unsur ligand varlığıdır. Zn^{+2} iyonunun $5.6 \mu\text{M}$ ’lik bir IC_{50} değerinde nötr pH’da

OTOP2 kanalını bloke ettiği bildirilmiştir (44, 65). OtopLc modelimizin muhtemel Zn^{+} bağlanma bölgeleri MIB2 (72) web arayüzü ile belirlenmiştir (Şekil 5.2).



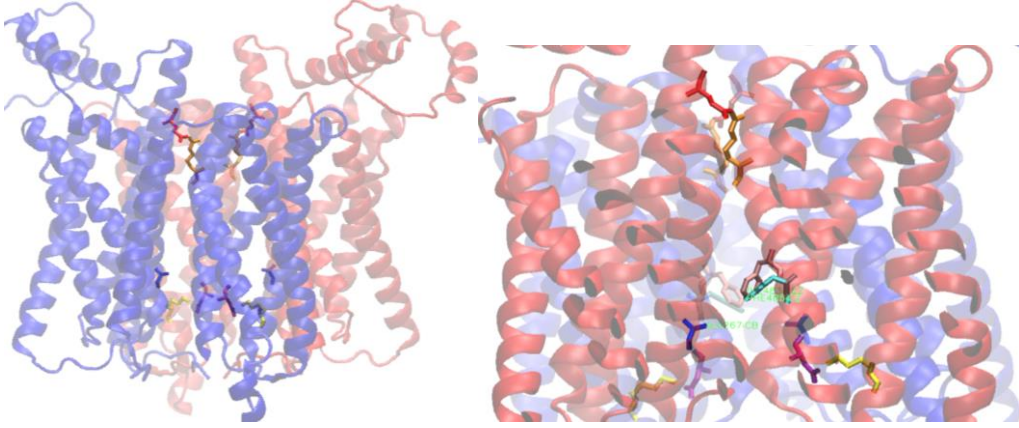
Şekil 5.2. Zn^{+} Bağlanma Bölgeleri.

Hidronyum iyonları simülasyonun başlamasından kısa bir süre sonra su-lipit arayüzüne yanaşmıştır. Bu konudaki başka bir çalışmada benzer durum hidronyum iyonlarının karbonil gruplarına yakın fosfat grubunun altına yerleşip stabil kaldığını göstermektedir (73).

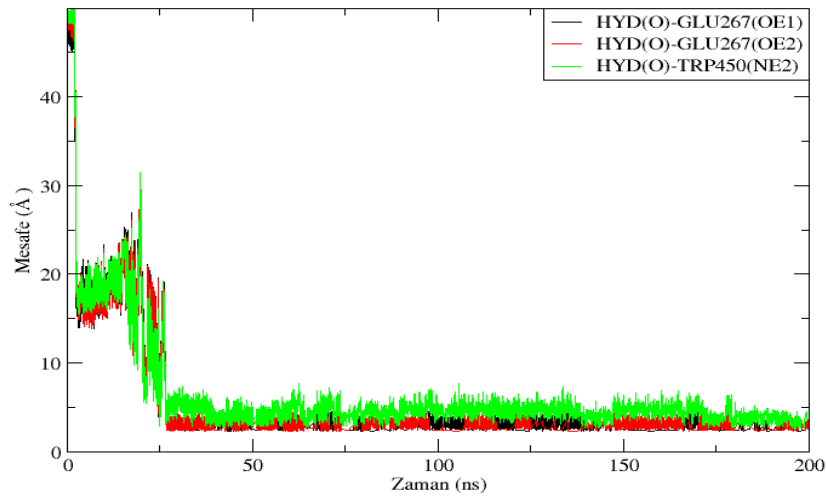
OtopLc alan organizasyonu, Otopetirin ailesindeki diğer transmembran proteinlere benzemektedir. TMH1 ve TMH9'un aracılık ettiği alt birimler arası arayüz, otopetirinler arasında daha az korunur. Lipidler içeren merkezi vestibül benzer çalışmalardaki gibi iyon geçirgenliği taşımamaktadır (29). Diğer vestibüller ve alt birimler arası arayüz MD simülasyonlarından çıkarılan Şekil 4.13'teki PMF profillerinden anlaşılacağı üzere kısmen hidrate olmakla birlikte W triptofan rezidüsü ve tuz köprüleri ile tıkalıdır. Na^{+} iyonları hidrate vestibüllerden geçerek Şekil 4.13 A ve B de görülen alanlara bağlanmaktadır. Hidronyum iyonları ise tıkalı olan z ekseninde proteinin ağırlık merkezinden 10Å ekstraselüler yakınında bir alandan atlayarak Şekil 4.13'de görülen maviye yakın tonlardaki bölgelerde gezinmektedir.

OtopLc'de Otop1'e benzer şekilde alt birim arayüzüne esas olarak TMH6 ve TMH12 aracılık eder ve bu yapı yüksek oranda korunmuştur. Şekil 4.14'te görülen TMH5-6 arası linker üzerindeki E177 ve TMH12 hemen ekstraselüler başlangıcındaki R469 rezidüleri alt birim arayüzünde ve de bizim OtopLc kanalında

korunmuştur. Araları ayrıktaysa aynı hat üzerinde farklı konformasyonlarla birbirlerine yaklaşabilecek hizada bulunan E267 ve H483-H486 köprüsü de (Şekil 5.3) MD simülasyonlarında da hidronyumların bağlı kaldığı bir alan olduğu Şekil 5.4'te görülmektedir. Bu da proteinimizin Otopetrin ailesi proton kanallarıyla yapısal ve işlevsel benzerliğini desteklemektedir.



Şekil 5.3. Alt Birim Arayüzünde TM6 ve TM12 Üzerindeki Tuz Köprüleri.



Şekil 5.4. TMH6 ve TMH12 Alt Birim Arayüzünde E267 Rezidüsüne Bağlanan Hidronyumun Rezidü Oksijenlerine Olan Mesafesinin Simülasyon Boyunca Değişimi.

Çalışmalarımızın devamında TRUBA üzerinde yürütülen MD simülasyon μ s mertebesine kadar uzatılacaktır. Bu şekilde protonların PMF profilleri daha belirgin hale geleceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Düşük pH (<1) değerinde hidronyum iyonları hidrate vestibüllere nötr pH değerindeki Na⁺ iyonları kadar nüfuz edememektedir. Bu da PMF profili verilerinin her iki MD simülasyondaki OtopLc Ca RMSD değerindeki farklılıkları desteklediğini göstermektedir. Lipid çift katmanın yağ zincirlerinin oksijen atomlarıyla ile hidronyumların alanyazına (72) uygun şekilde etkileşime girdiği görülmektedir.

Hidronyumların mebranın her iki tarafında OtopLc yapı boyunca PMF profiline dayanarak Otopetrinlerdeki deneysel çalışmalarla uyumlu şekilde (66) protonların her iki yönde de taşınabileceği simülasyonlarda görülmektedir.

Yapısal olarak altbirimler arası (*intrasubunit*) arayüzdeki tuz köprüsü rezidüleri gösterilmiştir. Ancak moleküler modellemenin bağ oluşumu ve kırılması gibi fiziksel olayları modelleyememesi buradaki Grothuss mekanizması ile protonların atlayarak geçişini gösterememektedir.

Ayrıca deneysel çalışmalar (29,66) benzer otopetrin proton kanallarının açılıp kapanma zaman sabitlerinin hidronyum kapılamalı olarak ms-s mertebesinde olduğunu göstermektedir. Bu sebeple μ s düzeyindeki simülasyonların konformasyonel değişiklikler ve proton iletimini göstermesi mümkün değildir.

Simülasyon süresinin uzatılmasıyla PMF profilleri üzerindeki proton iletim yolları belirginleşecektir. Yine sürenin uzatılması konformasyon gözlemlenebilirliği artırabilir. Zn⁺ inhibisyonu ve hidronyum kapılamaya ilişkin moleküler dinamik çalışmaları devam ettirilecektir. Klasik MD de Grothuss mekanizmasının Gromacs kuvvet alanı ile modellendiği çalışmalar mevcuttur (73) CHARMM kuvvet alanında bu olay modellenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Northcutt AJ, Lett KM, Garcia VB ve ark. Deep sequencing of transcriptomes from the nervous systems of two decapod crustaceans to characterize genes important for neural circuit function and modulation. *BMC Genomics*. 2016;**17**: 868.
2. Connor JA, Walter D, McKown R. Neural repetitive firing: modifications of the Hodgkin-Huxley axon suggested by experimental results from crustacean axons. *Biophys J*. 1977;**18**:81–102.
3. wwPDB, Consortium. "Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data". *Nucleic Acids Res*. 2019;**47** (D1): 520–528.
4. Dill KA, MacCallum JL. The protein-folding problem, 50 years on. *Science*. 2012;**338**(6110):1042-1046.
5. Kauzmann W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem*. 1959;**14**:1-63.
6. Hsu A. *Molecular Dynamics Simulations of Hydrophobic Solutes in Liquid Water [Doktora Tezi]*. Taiwan: Academia Sinica; 2007.
7. Brooks B R, Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations" *Journal of Computational Chemistry*, 1983;**4**(2), 187-217.
8. Wang J, Cieplak P, Kollman P. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? , *J. Comput. Chem*. 2000; **21**: 1049–1074.
9. Kaminski G, Friesner R, Tirado-Rives J. and Jorgensen W, Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem*. 2001;**105**, 6474–6487.
10. Oostenbrink C, Villa A, Mark A, van Gunsteren W. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6, *Journal of Computational Chemistry*. 2004;**25**:1656–1676.
11. Goodford PJ. *The Basic Principles of GRID in Molecular Interaction Fields* Eds G. Cruciani Wiley-VCH, Darmstadt, 2006.
12. Lindahl ER. *Molecular Dynamics Simulations*. Kukol A , editors. *Molecular Modeling of Proteins*. *Methods Molecular Biology™* vol 443. Humana Press; 2008.
13. Karplus M and Petsko GA, "Molecular dynamics simulations in biology", *Nature*. 1990; **347**, 631-639.

14. Aykaç Fas A B. Structure and dynamics of catabolite gene activator protein by molecular modeling and simulations [Yüksel Lisans Tezi]. İstanbul: Boğaziçi University; 2008.
15. Akı Yalçın, E. M edisinal Kimyada Bilgisayar Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri [Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 6 Ocak 2023]. Erişim adresi: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/77172/mod_resource/content/0/01_MedKimGiris.pdf
16. Karasu D. Investigating of interactions between statin-based cholesterol lowering drugs with p- glycoprotein membrane protein by molecular modeling. [Doktora Tezi] İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi; 2011.
17. Eren D, Yalçın İ. 2020. Rasyonel ilaç tasarımında moleküler mekanik ve moleküler dinamik yöntemlerin kullanılma amacı Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. 2020; 44(2): 334-355.
18. Cornell W, Cieplak P, Bayly C, Gould I, Merz K, Ferguson D, ve ark. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. J. Am. Chem. 1995; 117, 5179–5197.
19. MacKerell A, Brooks B, Brooks III C, Nilsson L, Roux B, Won Y and Karplus M, CHARMM: the energy function and its parameterization with an overview of the program, The encyclopedia of computational chemistry. 1998;1: 271–277.
20. Scott W, Hunenberger P, Tironi I, Mark A, Billeter S, Fennel J, ve ark. The GROMOS biomolecular simulation program package, J. Phys. Chem. A. 1999; 103: 3596–3607.
21. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. J. Med. Chem. 1985;28, 849–857.
22. Boobbyer DN, Goodford PJ, McWhinnie PM, Wade RC. New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. J Med Chem. 1989;32(5):1083-1094.
23. Wade RC, Clark KJ, Goodford PJ. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. J Med Chem. 1993;36(1):140-147.
24. Leach, A, 2001. Molecular modelling: principles and applications, Prentice Hall, Harlow, UK.
25. Hazra MK, Levy Y. Biophysics of Phase Separation of Disordered Proteins Is Governed by Balance between Short- And Long-Range Interactions. J Phys Chem B. 2021;125(9):2202-2211.
26. Essmann U, Perera L, Berkowitz M, Darden T, Lee H and Pedersen L. A smooth particle mesh Ewald method. Journal of Chemical Physics. 1995;103, 8577–8593.

27. Gelin B R, Karplus M. Side-chain torsional potentials: Effect of dipeptide, protein, and solvent environment. *Biochemistry*. 1979;18:1256-1268.
28. Pylaeva S, Brehm M, Sebastiani D. Salt Bridge in Aqueous Solution: Strong Structural Motifs but Weak Enthalpic Effect. *Sci Rep*. 2018; 8: 13626.
29. Saotome K, Teng B, Tsui CCA, Lee WH, Tu YH, Kaplan JP, Sansom MSP, Liman ER, Ward AB. Structures of the otopetrin proton channels Otop1 and Otop3. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(6):518-525.
30. Verlet, L. "Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard–Jones Molecules". *Physical Review*. 1967; 159 (1): 98–103.
31. Kastner J. Umbrella sampling. *WIREs Computational Molecular Science*. John Wiley & Sons, Ltd. Volume 1, 932-942, 2011.
32. Tunyasuvunakool K, Adler J, Wu Z ve ark. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*. 2021;596:590–596.
33. Rydqvist B, Purali N Potential-dependent potassium currents in the rapidly adapting stretch receptor neuron of the crayfish. *Acta Physiol*. 1991;142(1):67–76.
34. Heitler J. Krasnec FB, Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish, *Trends in Neurosciences*, Volume 22, Issue 4, 1 April 1999, Pages 153-161.
35. Ergin B, Purali N. Cloning of a putative sodium/calcium exchanger gene in the crayfish. *Invertebrate Neuroscience*. 2018; 18:9.
36. Marcus Y, Volumes of aqueous hydrogen and hydroxide ions at 0 to 200 °C, *Journal of Chemical Physics*. 2012;137(15):154501.
37. Chaplin M. Hidrojen iyonları, [Internet]. 2021 [Erişim Tarihi 6 Ocak 2023]. Erişim adresi: https://water.lsbu.ac.uk/water/hydrogen_ions.html#be2
38. Markovitch O and Agmon N, Structure and energetics of the hydronium hydration shells, *Journal of Physical Chemistry A*. 2007; 111:2253-2256.
39. DeCoursey TE. Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family. *Physiol Rev*. 2013;93(2):599-652.
40. Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, Clapham DE. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*. 2006;440:1213–1216.
41. Tu YH, Cooper AJ, Teng B, et al. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science*. 2018;359(6379):1047-1050.
42. Ganguly A, Chandel A, Turner H, Wang S, Liman ER, Montell C. Requirement for an Otopetrin-like protein for acid taste in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Dec 21;118(51):e2110641118.
43. Zheng J, Murugan M, Wang L, Wu LJ. Microglial voltage-gated proton channel Hv1 in spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2022;17(6):1183-1189.
44. Takeshita K, Sakata S, Yamashita E ve ark. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21,352–357.

45. Lim VT, Freitas JA, Tombola F ve ark. Thermodynamics and Mechanism of the Membrane Permeation of Hv1 Channel Blockers. *J Membrane Biol.* 2021. 254, 5–16.
46. Ergin, B., Saglam, B., Taskiran, E.Z., Bastug, T., Purali, N. De novo cloning and functional characterization of potassium channel genes and proteins in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Decapoda: Astacidea: Astacidae) *Journal of Crustacean Biology*, 2022; 42(1): ruac018, <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruac018>
47. Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403–410.
48. Altschul S, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
49. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293-W296.
50. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022;19(6):679-682.
51. The AlphaFold team, AlphaFold: a solution to a 50-year-old grand challenge in biology [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 2 Ağustos 2022]. Erişim adresi: <https://deepmind.com/blog/article/alphafold-a-solution-to-a-50-year-old-grand-challenge-in-biology>.
52. Nugent T, Jones DT. Membrane protein orientation and refinement using a knowledge-based statistical potential. *BMC Bioinformatics.* 2013;18(14):276. doi: 10.1186/1471-2105-14-276.
53. Malde AK, Zuo L, Breeze M, Stroet M, Poger D, Nair PC, Oostenbrink C, Mark AE. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2011, 7(12), 4026-4037.
54. Humphrey W, Dalke A and Schulten K. "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics.* 1996;14(1), 33-38.
55. Kalé L, Skeel R, Bhandarkar M ve ark. NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. *J Comp Phys.* 1999;151:283–312.
56. Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC ve ark. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys.* 2020;153(4):044130.
57. Allen TW, Baştuğ T, Kuyucak S, Chung SH. Gramicidin A channel as a test ground for molecular dynamics force fields. *Biophys J.* 2003;84(4):2159-2168.
58. Baştuğ T, Kuyucak S. Energetics of ion permeation, rejection, binding, and block in gramicidin A from free energy simulations. *Biophys J.* 2006;90(11):3941-3950.

59. Mahdavi S, Kuyucak S. Mechanism of Ion Permeation in Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels. *PLoS One*. 2015;10(8):e0133000. Published 2015 Aug 14.
60. Liu LP, Deber CM. Uncoupling hydrophobicity and helicity in transmembrane segments. Alpha-helical propensities of the amino acids in non-polar environments. *J Biol Chem*. 1998;273(37):23645-23648.
61. Liu LP, Deber CM. Combining hydrophobicity and helicity: a novel approach to membrane protein structure prediction. *Bioorg Med Chem*. 1999;7(1):1-7.
62. Feng SH, Zhang WX, Yang J, Yang Y, Shen HB. Topology Prediction Improvement of α -helical Transmembrane Proteins Through Helix-tail Modeling and Multiscale Deep Learning Fusion. *J Mol Biol*. 2020;432(4):1279-1296.
63. Feng SH, Xia CQ, Zhang PD, Shen HB. Ab-Initio Membrane Protein Amphipathic Helix Structure Prediction Using Deep Neural Networks. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*. 2022;19(2):795-805.
64. Morita, M., Katta, A.M., Ahmad, S. et al. Lipid recognition propensities of amino acids in membrane proteins from atomic resolution data. *BMC Biophys* 2011; 4: 21.
65. Hospital A, Andrio P, Fenollosa C, Cicin-Sain D, Orozco M, Gelpí JL .MDWeb and MDMoby: an integrated web-based platform for molecular dynamics simulations. *Bioinformatics*, 2012, 28(9):1278-1279.
66. Teng B, Kaplan JP, Liang Z, et al. Structural motifs for subtype-specific pH-sensitive gating of vertebrate otopetrin proton channels. *Elife*. 2022;11:e77946.
67. Parikh K, Antanaviciute A, Fawkner-Corbett D, et al. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*. 2019;567(7746):49-55.
68. Mi T, Mack JO, Lee CM, Zhang YV. Molecular and cellular basis of acid taste sensation in *Drosophila*. *Nat Commun*. 2021 Jun 17;12(1):3730.
69. Chang RB, Waters H, Liman ER. A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 21;107(51):22320-5. doi: 10.1073/pnas.1013664107. Epub 2010 Nov 23.
70. Chang WW, Matt AS, Schewe M, Musinszki M, Grüssel S, Brandenburg J, Garfield D, Bleich M, Baukowitz T, Hu MY. An otopetrin family proton channel promotes cellular acid efflux critical for biomineralization in a marine calcifier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jul 27;118(30):e2101378118.
71. Li B, Wang Y, Castro A, Ng C, Wang Z, Chaudhry H, Agbaje Z, Ulloa GA, Yu Y. The roles of two extracellular loops in proton sensing and permeation in human Otop1 proton channel. *Commun Biol*. 2022 Oct 20;5(1):1110.
72. Lu C, et al. MIB2: metal ion-binding site prediction and modeling server, *Bioinformatics*, 2022, 38(18), 4428-4429.

73. Deplazes E, Poger D, Cornell B and Cranfield CG. The effect of hydronium ions on the structure of phospholipid membranes† Check for updates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018;20:357-366.
74. Konermann L, Kim S. Grotthuss Molecular Dynamics Simulations for Modeling Proton Hopping in Electrosprayed Water Droplets. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2022; 18: 10.1021/acs.jctc.2c00001.

8. EKLER

Ek-1 Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

KEREVİT GANGLİA TRANSKRİPTOMUNDAKİ OTOPESTRİN BENZERİ BİR
PROTON KANALININ MODELLENMESİ

Mustafa Erdem SAĞSÖZ

80 Sayfa

Kerevit Ganglia Transkriptomundaki Otopetrin Benzeri Bir Proton Kanalının Modellenmesi

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 9	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.gsenst.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	gcris.etu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	avesis.atauni.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Üsküdar Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.truba.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	core.ac.uk İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
8	dadospdf.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<% 1

Ek-2 Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Mustafa Erdem Sagsoz
Ödev başlığı: Mustafa Erdem SAĞSÖZ
Gönderi Başlığı: Kerevit Ganglia Transkriptomundaki Otopetirin Benzeri Bir Pr...
Dosya adı: PhDThesisMESAGSOZ_6-4Victus.docx
Dosya boyutu: 28.65M
Sayfa sayısı: 83
Kelime sayısı: 13,353
Karakter sayısı: 93,592
Gönderim Tarihi: 01-Mar-2023 01:15ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2026068955



9. ÖZGEÇMİŞ