

ÖZET

SIRALI ARDIŞIK TEK BAZ DEĞİŞİKLİKLERİ KULLANARAK YÜKSEK TOPOLOJİK BENZERLİKTE PH-ÖZGÜ PROTEİNLER TASARLAMAK İÇİN YÖNTEM

- 5 Bu buluş, pH'ye duyarlı proteinlerin tasarımı için geliştirilen yenilikçi bir yaklaşımdır. Geleneksel protein mühendisliği yöntemleri, genellikle proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini optimize etmek için çok sayıda değişiklik gerektirirken, bu buluş, tek baz değişiklikleri ile pH-özgü proteinlerin tasarımını basitleştirir, sistematik hale getirir ve hızlandırır. Bu süreç, ardışık olarak yapılan $G \leftrightarrow C(A)$ ve $C \leftrightarrow A$
- 10 değişiklikleri ile gerçekleştirilir ve proteinlerin pH duyarlılığını topolojik benzerliğini koruyarak optimize eder. Bu buluş, biyoteknolojik uygulamalar için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Özellikle pH-özgü proteinlerin tasarımı, biyoteknoloji, biyomühendislik, ilaç geliştirme ve biyosensör teknolojilerinde kullanılabilir. Bu yöntemle üretilen pH-özgü enzimler, asidik veya bazik ortamlarda daha verimli çalışacak şekilde
- 15 tasarlanabilir ve çeşitli endüstriyel, sağlık ve çevre mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir.

İSTEMLER

1. Sekansın tamamında ya da bir bölümünde amino asit değişiklikleriyle proteinlerin pH duyarlılığını optimize etmek amacıyla, aspartik asit (D) $\leftrightarrow$ asparajin (N), glutamik asit (E) $\leftrightarrow$ glutamin (Q), asparajin (N) $\leftrightarrow$ histidin (H), glutamin (Q) $\leftrightarrow$ lizin (K) veya arjinin (R) ve opsiyonel olarak histidin (H) $\leftrightarrow$ arjinin (R) ile lizin (K) $\leftrightarrow$ arjinin (R) değişikliklerini içeren bir pH-özü protein veya peptit tasarım yöntemi.
2. İstem 1'de belirtilen yönteme göre, sekansın tamamında veya bir bölümünde ardışık çift yönlü baz değişikliklerine dayalı olarak amino asit değişimlerini içeren, bazik özellikleri artırmak için D>N, E>Q, N>H ve Q>K (veya Q>R) dönüşümlerini, isteğe bağlı olarak H>R dönüşümünü; asidik özellikleri artırmak için K>Q (veya R>Q), H>N, Q>E ve N>D dönüşümlerini, isteğe bağlı olarak R>H dönüşümünü ve K>R değişimini içeren bir yöntem.
3. İstem 1'de belirtilen yönteme göre, sekansın tamamında veya bir bölümünde aynı anda D>N, N>H, E>Q, Q>K (veya Q>R) baz değişikliklerini içeren ve ayrıca D>H, N>H, E>K, Q>K değişiklikleri ile uygulanabilen, opsiyonel olarak H>R veya K $\leftrightarrow$ R değişimlerini içeren bir yöntem.
4. İstem 1'de belirtilen yönteme göre, sekansın tamamında veya bir bölümünde aynı anda N>D, H>N, Q>E, K>Q (veya R>Q) baz değişikliklerini içeren ve ayrıca H>D, H>N, K>E, K>Q değişiklikleri ile uygulanabilen, opsiyonel olarak R>H ve K $\leftrightarrow$ R değişimlerini içeren bir yöntem.
5. Birinci ikinci, üçüncü veya dördüncü istemlerden herhangi birinde belirtilen yöntemin, pH-özü protein (veya peptit) tasarımında kullanılmasıyla asidik ve bazik ortamlarda stabiliteyi artırarak proteinlerin (veya peptitlerin) biyoteknolojik uygulamalar ve araştırmalar için uygun hale gelmesini sağladığı bir yöntem.
6. Birinci, ikinci, üçüncü veya dördüncü istemlerden herhangi birinde belirtilen yöntemi kullanarak, H $\leftrightarrow$ R veya K $\leftrightarrow$ R değişimleri içerebilecek veya içermeyebilecek şekilde, pH değişimlerine duyarlı, hedeflenmiş veya belirli pH değerlerine sahip doku ve çevrelerde kullanılmak üzere optimize edilmiş makromoleküllerin tasarımını gerçekleştiren bir biyoteknolojik yöntem.
7. Birinci, ikinci, üçüncü veya dördüncü istemlerden herhangi birinde belirtilen yöntemi kullanan; pH-özü biyoteknolojik ürünlerde, enzim optimizasyonunda, bilimsel

Çalışmalarda, biyosensörlerde, ilaç geliştirme uygulamalarında veya ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmak üzere tasarlanmış ürün.

5 **8.** Birinci, ikinci, üçüncü veya dördüncü istemlerden herhangi birinde belirtilen yöntemin, evrimsel araştırmalarda amino asit değışikliklerinin pH ve çevresel stres koşullarına duyarlı adaptasyonlarını incelemek ve protein evriminin yönelimlerini analiz etmek amacıyla kullanıldığı evrimsel biyoloji veya genetik optimizasyon çalışmaları için tasarlanmış yöntem.

10 **9.** Birinci, ikinci, üçüncü veya dördüncü istemlerden herhangi birinde belirtilen yöntemin, evrimsel araştırmalarda amino asit değışikliklerinin pH ve çevresel stres koşullarına duyarlı adaptasyonlarını incelemek ve protein evriminin yönelimlerini analiz etmek amacıyla kullanıldığı evrimsel biyoloji veya genetik optimizasyon çalışmaları için tasarlanmış ürün.

15 **10.** Birinci, ikinci, üçüncü veya dördüncü istemlerden herhangi birinde belirtilen yöntemi kullanan, belirli amino asit değışimlerini ($D \leftrightarrow N$, $E \leftrightarrow Q$, $N \leftrightarrow H$, $Q \leftrightarrow K$ veya R) analiz eden, aynı anda yapılan değışiklikleri ($D > N$, $N > H$, $E > Q$, $Q > K$ veya $Q > R$); veya $N > D$, $H > N$, $Q > E$, $K > Q$ veya $R > Q$) değerdendiren, $H \leftrightarrow R$ ve $K \leftrightarrow R$ değışimlerini opsiyonel olarak içerebilen ve protein yapısının pH'ya duyarlı özelliklerini optimize eden pH-özü protein tasarım yazılımı.

TARİFNAME

SIRALI ARDIŞIK TEK BAZ DEĞİŞİKLİKLERİ KULLANARAK YÜKSEK TOPOLOJİK BENZERLİKTE PH-ÖZGÜ PROTEİNLER TASARLAMAK İÇİN YÖNTEM

5 Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Bu buluş, protein mühendisliği alanında, pH'ye özgü proteinler tasarlamak için amino asit değişikliklerini sıralı bir şekilde gerçekleştiren yenilikçi bir yöntemi tanıtmaktadır. Geleneksel protein tasarımı genellikle rastgele amino asit değişiklikleri içerirken, bu buluş, proteinlerin fonksiyonel ve yapısal özelliklerini optimize etmek amacıyla amino asit değişikliklerini ihtiyaca göre ardışık bir şekilde sıralar. İzoelektrik nokta (pI) ve kodon tabanlı üretilen yöntemi kullanılarak yapılan bu ardışık tek baz değişiklikleri, yüksek topolojik benzerlikte, pH'ye duyarlı proteinlerin tasarımını sağlar. Evrimsel ve kimyasal ilkeleri birleştirerek, pH spesifik proteinlerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar, ilaç geliştirme ve biyomühendislik gibi alanlarda önemli avantajlar sunmaktadır.

Tekniğin Bilinen Durumu

Protein mühendisliği alanında, pH'ye özgü proteinlerin tasarımı, genellikle proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini hedefleyen çeşitli stratejilerle gerçekleştirilmiştir. Bu stratejiler arasında amino asit dizilerindeki değişiklikler, proteinlerin stabilitesini, aktivitesini ve diğer biyolojik işlevlerini optimize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, mevcut yöntemlerde genellikle protein mühendisliği süreçleri rastgele veya sistematik olmayan değişiklikler üzerine odaklanmaktadır.

Bu tasarımlar, genellikle proteinlerin yapılarını pH'ye duyarlı hale getirmek için yapısal değişiklikler yapmak amacıyla amino asit değişiklikleri kullanmaktadır. Ancak, mevcut yöntemlerin çoğu, bu değişikliklerin sırasının ve etkileşimlerinin doğru bir şekilde optimize edilmesine yönelik sistematik bir yaklaşım sunmamaktadır. Ayrıca, proteinlerin topolojik benzerliklerinin yüksek tutulması ve pH değişimlerine duyarlı olmasının sağlanması genellikle karmaşık ve zaman alıcı süreçler gerektirmektedir.

Diğer bir yaygın yöntem, evrimsel algoritmalar kullanılarak yapılan protein tasarımlarıdır. Bu yöntemlerde, doğal evrimsel süreçler taklit edilerek, hedeflenen özelliklere sahip proteinlerin ortaya çıkması sağlanmaktadır. Ancak, evrimsel süreçlerin taklidi ve istenen protein yapısının doğru bir şekilde elde edilmesi zorlu ve belirsiz olabilmektedir. Kimyasal modifikasyonlar da protein mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan bir diğer yaklaşımdır. Kimyasal modifikasyonlar, genellikle proteinlerin fonksiyonlarını değiştirmek amacıyla kullanılsa da elde edilen proteinlerin genetik yöntemlerle yüksek miktarda üretimi ve pH'a özgü olarak optimize edilmesi gerektiği durumlarda yetersiz kalmaktadır. Bu alanda yapılan bazı çalışmalar, amino asitlerin yer değiştirilmesi ve modifikasyonları üzerine odaklanmakta, ancak çoğu yaklaşımda, istenilen sonuçlara ulaşmak için çok sayıda değişiklik yapılması gerektiği ve değişikliklerin sıralamasının belirlenmesinin karmaşık olduğu gözlemlenmektedir. Örneğin, pH-özellikli proteinlerin tasarımında yapılan değişiklikler, genellikle rasgele veya karmaşık algoritmalarla sıralanır, bu da işlemi daha zaman alıcı ve verimsiz hale getirir.

Öte yandan, pH değişikliklerine optimizasyon amaçlı için kullanılsa da çeşitli yöntemler özellikle proteinlerin hidrofilik ya da hidrofobik yapılarının optimize edilmesinde kullanılır [1]. Bunlara, amino asitlerin yapısal elektriksel alan benzerliklerine dayalı olarak tasarlanan QTY-kodu örnek verilebilir (US10035837B2) [1]. QTY kodu ile değiştirilen membranla etkileşen amino asit kalıntılarının (L, I, V, F) suyla etkileşimi yüksek olanlarla (Q, T, Y) değiştirilmesi, suda çözünür hale getirilen proteinlerinin yapısal dinamiğini korumasına katkı sağlar [2]. QTY-kodu, membran proteinlerinin suda çözünür hale getirilmesine olanak tanır [1], ligand etkileşimlerini koruyan detergent-free kemokin reseptörlerinin ve kimerik reseptörlerin tasarlanmasına kullanılmıştır (US11401320B2) [1,3]. QTY-kodu tasarım stratejisi, çok sayıda biyoteknolojik uygulamada, özellikle ilaç geliştirme ve biyomühendislikte başarılı bir şekilde kullanılmıştır [1-7]. Ancak, bu gibi yöntemlerin çoğu, proteinlerin pH duyarlılığı gibi daha spesifik özelliklerini optimize etmek için tasarlanmamıştır. Bununla birlikte, Tek baz değişimlerine dayanmaması, sıralı ve spesifik bir yaklaşım sunmaması eksikleri olarak sıralanabilir. Bunu destekler biçimde, QTY-kodunun bazı tek baz

değişikliklerine dayanan aminoasit değişimlerinin evrimsel ve genetik çalışmalarda gösterilmesi, bu teknolojinin daha da geliştirilmesine ve akademik kullanım alanlarının artmasına olanak sağlamıştır [6,7]. Evrimsel temellendirilmiş tek baz değişikliklerine dayalı algoritmalar, proteinlerin doğal evrimsel süreçlere dayalı olarak tasarlanmasını mümkün kılar [6,7]. Buna dayanarak incelenen evrimsel temellere sahip baz değişimleri, protein tasarımını yalnızca laboratuvar ortamında değil, aynı zamanda doğal süreçlerin moleküler düzeyde yeniden yapılandırılmasında da kullanılabilir hale getirme potansiyeline sahiptir [6,7]. Bunun yanında, QTY-kodu gibi yöntemler protein tasarımında sıralı bir yaklaşım sunmamasıyla da öne çıkar. Karşıt kimyasal özelliklere sahip iki yönlü değişiklikler, genellikle ara çevresel koşullara uyum sağlayacak protein tasarımını karşılamada zorluk yaşar. Bunun yanında, sıralı değişiklikler, proteinlerin yapısal özelliklerini optimize ederken, aynı zamanda topolojik benzerliklerini korumalarına olanak tanır.

15 **Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları**

Bu buluş, amino asit değişikliklerini ihtiyaca göre sıralayarak, proteinlerin pH'a duyarlı ve yüksek topolojik benzerliğe sahip olmasını sağlayan ardışık tek baz değişiklikleri kullanma yaklaşımını sunarak mevcut yöntemlere önemli bir yenilik getirmektedir. Yüksek verimlilik ve basitlik, bu buluşu mevcut yöntemlere göre daha verimli ve uygulanabilir hale getirir. Sistematik tek baz değişimlere dayanması ise bu yöntemi kullanan çalışmaların daha kontrollü olmasına ve tekrarlanabilirliğin artmasına olanak tanır.

Bu buluşta açıklanan yöntem, ilk olarak G $\leftrightarrow$ C (guanin $\leftrightarrow$ sitozin) ve G $\leftrightarrow$ A (guanin $\leftrightarrow$ adenin) değişiklikleri yapılmasını içerir. Ardından, C $\leftrightarrow$ A (sitozin $\leftrightarrow$ adenin) değişiklikleri yapılır. Duyulan ihtiyaca göre üçüncü değişiklik A $\leftrightarrow$ G (adenin $\leftrightarrow$ guanin) eklenmesine olanak tanır. Bu sıralı baz değişiklikleri sonucu değişen amino asitler, proteinlerin topolojik benzerliklerini korurken, pH duyarlılığını artırır ve onların farklı pH koşullarına daha uygun hale gelmesini sağlar. Yöntem, tek baz değişiklikleri ile yapılan tasarım sürecinin evrimsel ve kimyasal ilkelerle uyumlu olmasını sağlar. Bu sayede, doğada mevcut olan protein yapılarına benzer yapılar tasarlanabilir.

Bu yöntem, protein mühendisliği ve biyoteknoloji alanlarında, pH-özgü proteinlerin hızlı ve etkili bir şekilde tasarlanmasına olanak tanımayı amaçlamaktadır. pH-özgü proteinler, kan şekeri ölçmek için glikoz oksidaz bazlı biyosensörler gibi tanı cihazlarında kullanılırken, çevresel kirleticileri algılayan protein yapılı mikrosensörler de geliştirilebilir. Ayrıca, pH değişikliklerine duyarlı ilaç taşıyıcı sistemleri, kanser tedavisinde tümör mikro çevresine özgü ilaç salınımını hedef alır. Enzim mühendisliği, çeşitli hastalıklar için pH duyarlı tedavi seçenekleri sunar. Bu yenilikler, daha hızlı, hedefe yönelik tedavi yöntemleri ve izleme/tanı cihazları gibi tıbbi uygulamalarda da önemli ilerlemeler sağlar.

Buluşun Açıklanmasına Yardımcı Şekiller

Şekil 1. EAA1 proteininin doğal formu (a) ile tasarlanmış varyantları (b, c, d) arasındaki yapısal değişiklikleri ve yapılar arasındaki kök ortalama kare sapma (RMSD) değerlerini göstermektedir. Her bir varyantın amino asit değişimlerini ve bu değişimlerin yapısal etkilerini değerlendirmek için RMSD kullanılmıştır. Varyant 1 (b) değişimleri: aspartik asit (D) > asparajin (N) ve glutamik asit (E) > glutamin (Q). Varyant 2 (c) değişimleri: Varyant 1'e ek olarak, glutamin (Q) > lizin (K) ve asparajin (N) > histidin (H). Varyant 3 (d) değişimleri: Varyant 2'ye ek olarak, histidin (H) > arjinin (R). Bu amino asit değişiklikleri, proteinin hesaplamalı olarak tahmin edilmiş yapısında doğal forma göre oldukça hafif (RMSD = 0.96Å.) bir değişiklik yaratmıştır. 1Å gibi çok küçük bir değer elde edilmesi, evrimsel olarak kodon bazlarına göre planlanan amino asit değişimlerinin protein yapısında beklenen korunma ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Özellikle, bu değişimlerin doğal formdan büyük ölçüde sapma yaratmadan protein yapısını koruduğu ve optimize ettiği anlaşılmaktadır. N, C terminalleri ve loop bölgeleri, doğrudan karşılaştırma amacıyla analizden çıkarılmıştır. Protein yapıları hesaplamalı yöntemlerle elde edilmiştir.

Şekil 2. Yapılan mutasyonlar protein topolojisinde yapıda sınırlı değişimlere yol açmış ve proteinin genel mimarisi büyük ölçüde korunmuştur. a) EAA1 native: Proteinin doğal formu olarak referans alınmıştır ve RMSD değeri 0 Å'dır. b) EAA1 variant4 (H>N, K>Q): Bu varyantta histidin (H) asparajin (N) ve lizin (K) glutamin (Q) ile değiştirilmiştir.

RMSD değeri 0.78 Å olarak hesaplanmıştır. Bu, değişimlerin yapıya sınırlı düzeyde bir etkisi olduğunu ve proteinin yapısal bütünlüğünün korunduğunu gösterir. c) EAA1 variant5 (H>N, K>Q, N>D, Q>E): Daha fazla amino asit değişimi yapılmış olmasına rağmen, RMSD değeri yalnızca 0.91 Å'ye yükselmiştir. Yapıda meydana gelen değişim minimaldir. d) EAA1 variant6 (H>N, K>Q, Q>E, R>H): En fazla değişime uğrayan varyanttır (arginin > histidin). RMSD değeri 1.06Å olarak hesaplanmıştır, bu artış küçük bir sapma (<3Å) olarak değerlendirilir ve yapısal stabilitenin büyük ölçüde korunduğunu gösterir. RMSD değerlerindeki küçük artışlar, mutasyonların yapısal stabilite üzerinde minimal bir etkiye sahip olduğunu ve değişikliklerin kontrollü şekilde planlandığını göstermektedir. N, C terminalleri ve loop bölgeleri, doğrudan karşılaştırma amacıyla analizden çıkarılmıştır. Protein yapıları hesaplamalı yöntemlerle elde edilmiştir.

Şekil 3. Sıralı baz değişimi sonucu tasarlanan farklı varyantlarda EAA1 proteinine ait yüzey modelleri gösterilmektedir. Her bir varyantın tasarımında elektrostatik yük dağılımında yük yoğunluğunun düzenli bir şekilde arttığını gösteren belirgin bir değişiklik sağlanmıştır. a, b, c (pH=11): Siyah alanlar pozitif yüklü bölgeleri ifade eder. d, e, f (pH=4.5): Siyah alanlar negatif yüklü bölgeleri ifade eder. pH 11 koşullarında (a, b, c), pozitif yüklü alanların varyantlar arasında giderek daha belirgin bir şekilde yüzeyde yoğunlaştığı görülmektedir. Benzer şekilde, pH 4.5 koşullarında (d, e, f), negatif yüklü alanlarda varyantlar arasında düzenli bir artış gözlenmekte ve bu yüklerin yüzeydeki lokalizasyonunda yoğunlaşma artmaktadır. Yük yoğunluğunun pH koşullarına bağlı olarak varyantlar arasında sıralı bir artış göstermesi, tasarımların proteinlerin doğal adaptasyon mekanizmalarını taklit ettiğini veya bu mekanizmalarla uyumlu olduğunu düşündürmektedir. Bunu yanında, pH'ya duyarlı yüklerin yüzeyde belirli bölgelerde (eaa1 membran yerleşimine uygun) artış göstermesi, varyant tasarımının doğal proteinlerdeki yük dağılımına uyumlu şekilde optimize edildiğini göstermektedir. N, C terminalleri ve loop bölgeleri, doğrudan karşılaştırma amacıyla analizden çıkarılmıştır. Belirtilen pH'ta protonasyon durumlarını atanmıştır ve yük dağılımı sürekli elektrostatik denklemleri (Poisson-Boltzmann) kullanılarak hesaplanmıştır. Poisson denklemi, bir yük dağılımından kaynaklanan elektrik potansiyelini tanımlar. Boltzmann dağılımı, iyonların termal hareket nedeniyle bir elektrik alan içinde nasıl dağıldığını ifade eder.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Bu buluş, pH'ye duyarlı proteinlerin tasarımı için geliştirilen yenilikçi bir yaklaşımdır. Geleneksel protein mühendisliği yöntemleri, genellikle proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini optimize etmek için çok sayıda rastlantısal değişiklik gerektirirken, bu buluş, tek baz değişiklikleri ile pH-özgü proteinlerin tasarımını basitleştirir, hızlandırır ve sistematik araştırmalara daha uygun hale getirir. Belirli bir dizi baz değişimini ve bu değişimlerin ardışık etkilerini dikkate alan bu yöntem, proteinlerin pH duyarlılığı gibi çevresel faktörlere adaptasyonunu etkili bir şekilde optimize etmektedir.

10

Bu buluş, çeşitli amino asitlerin sistematik olarak değiştirilmesine dayanır. İlk olarak, asidik yapıli amino asit kalıntılarına karşılık gelen kodonların ilk bazında guanin (G) bazının sitozin (C) ile değiştirilmesi sağlanır (G>C değişikliğı) ve G>A (guanin>adenin) değişiklikleri yapılır. İkinci adımda, sitozin (C) adenin (A) ile dönüştürölür (C<->A değişikliğı), bu da çevresel pH artışına uygun şekilde protein yapılarını değiştirir. Bu değişimler sonucu asidik amino asitlere kıyasla histidin (H) ve lizin (K) gibi bazik, asparagin (N) ve glutamin (Q) gibi nötr amino asitlerin sayısı artar. Kodondaki birinci baz, protein evriminde özellikle ilginç ve stratejik açıdan önemlidir. Çünkü ikinci baz genellikle kodlanan amino asidin polaritesini (hidrofobik veya polar doğasını) belirlemekle ilişkilendirilmişken [6,7], birinci baz daha geniş biyokimyasal ve yapısal özellikleri etkiler. Bu etkiler, yük, pKa ve amino asit yan zincirinin esnekliğı gibi özellikleri içerir ve birinci bazı, daha az belirgin ancak adaptif moleküler evrimin eşit derecede güçlü bir itici gücü haline getirir. Bu, asidik çözeltilerde DNA'nın i-motif yapılar oluşturmaya benzerlikler taşır. Sitozin (C), protonasyonla stabilize olan i-motif yapılarının temel bileşenlerinden biridir ve asidik pH'da daha stabildir [8]. Sonuç olarak, bu stratejik baz değişiklikleri, evrimsel moleküler mekanizmaların doğal süreçlerini taklit ederek, protein yapılarını çevresel stres faktörlerine uyumlu hale getiren yapısal düzenlemeler sağlar.

30

Geleneksel protein mühendisliği yöntemlerinde, çok sayıda baz değişikliğı ve karmaşık algoritmalar kullanılarak istenen protein yapıları tasarlanır. Bu süreçler, genellikle zaman alıcı ve yüksek hata payına sahiptir. Bu buluş, pH-özgü proteinlerin tasarımında

sıralı bir yaklaşım benimseyerek, basit ve sistematik araştırmalara uygun adımlarla protein yapısını değiştirmeyi mümkün kılar. Bu basitlik, sürecin hızını artırırken, tasarımın doğruluğunu da artırır. G>C(A) baz değişiklikleri sonucu gerçekleşen D>N ve E>Q amino asit değişiklikleriyle, asidik amino asitlere kıyasla N ve Q amino asit kalıntılarını arttırarak protein yapısının nötr ortama uygun bir hale gelmesini sağlar. Bazik ortamlar için tasarıma N>H ve Q>K değişiklikleriyle dahil edilir. Değişimler sonucu sayısı artan histidin (H), lizin (K) ve arginin (R) bazik pH'a duyarlı proton kabul etme kapasitesine sahip olan amino asitlerdir. Bu yöntem, proteinlerin pH'a duyarlı yapılarını ve fonksiyonel özelliklerini optimize ederken, topolojik benzerliklerini de korur.

D<->N<->H Değişiklikleri: Bu değişiklikler, asidik ve nötral ortamlar arasında pH'a duyarlı geçişler sağlamak amacıyla uygulanır. Asidik ortamlarda genellikle aspartik asit (D) veya glutamik asit (E) gibi negatif yüklü amino asitler, protonasyon ile nötralize olur. Bu protonasyon ve deprotonasyon süreçleri, proteinlerin pH'a duyarlı yapısal değişiklikler geçirmesine olanak tanır.

1. D<->N (Aspartik Asit - Asparagin): Aspartik asidin, nötral pH koşullarına uyum sağlamak için asparaginle değiştirilmesi, protein yapısının daha nötr bir hale gelmesini sağlar. G<->A değişiklik ile elde edilen bu amino asit değişimi, asidik ortamda protonlanan amino asit kalıntılarının, pH değişimlerine duyarlı olarak daha kararlı hale gelmesini sağlar.

2. N<->H (Asparagin - Histidin): A<->C değişikliği ile elde edilen asparaginin histidine dönüştürülmesi pH'a duyarlı bir değişim gerçekleştirilir. Histidin, protonasyonu kolayca kabul edebilen bir amino asittir ve bu özellik, pH'a duyarlı proteinlerin tasarımında kritik rol oynar.

a. H<->R (Histidin - Arginin): Kodonun ikinci bazındaki A<->G değişiklikleri ile elde edilen histidinin argininle değiştirilmesi, pH-özümlü özelliklerini optimize etmek ve bazik ortamda stabilite sağlamak için uygulanabilir.

E<->Q<->K(veya R) Değişiklikleri: Glutamik asit (E) gibi negatif yüklü amino asitler, asidik ortamda protonlanarak nötralize olurlar.

1. E<->Q (Glutamik Asit - Glutamin): Glutamik asidin, glutamin ile değiştirildiğinde bu kalıntılar nötral pH'a uygun bir yapıya bürünür. G<->C değişiklik ile elde

edilen bu amino asit değişimi, proteinlerin n6tr ortamlardaki pH değişimlerine uyum sağlamasını kolaylaştırır.

2. Q $\leftrightarrow$ K (Glutamin - Lizin): C $\leftrightarrow$ A değişiklik ile elde edilen glutaminin lizinle değiştirilmesi, bazik pH duyarlılığını artıran 6nemli bir adımdır. Lizin, pH'a duyarlı proton kabul etme kapasitesine sahip olan bir bazik amino asittir ve bu değişiklik bazik ortamlarda da y6ksek stabiliteyi korur.

a. Q $\leftrightarrow$ R (Glutamin - Arginin): Kodonun ikinci bazındaki A $\leftrightarrow$ G değişiklikleri ile elde edilen glutaminin argininle değiştirilmesi, pH duyarlılığını artıran 6nemli bir adımdır. Arginin, pH'a duyarlı proton kabul etme kapasitesine sahip olan bir bazik amino asittir.

b. K $\leftrightarrow$ R (Lizin - Arginin): Kodonun ikinci bazındaki A $\leftrightarrow$ G değişiklikleri ile elde edilen lizinin argininle değiştirilmesi, pH-6zg6 özelliklerini optimize etmek ve bazik ortamda stabilite sağlamak i7in uygulanabilir.

D $\leftrightarrow$ N $\leftrightarrow$ H ve E $\leftrightarrow$ Q $\leftrightarrow$ K değişiklikleri ger7ekleştirildiğinde, proteinler pH'ye duyarlı şekilde optimize edilir. EAA1 proteini, y6ntemin etkinliğini test etmek i7in 6rnek olarak kullanılmıştır. Doğal formu ile tasarlanmış varyantları arasındaki yapısal değişiklikler ve bu yapılar arasındaki k6k ortalama kare sapma (RMSD) değerleri analiz edilmiştir:

- Varyant 1: aspartik asit (D) > asparajin (N) ve glutamik asit (E) > glutamin (Q) değişikliklerini i7erir. (Doğal formdan RMSD değeri= 0.55 Å).

- Varyant 2: Varyant 1'e ek olarak glutamin (Q) > lizin (K) ve Asparajin (N) > Histidin (H) değişikliklerini i7erir. Buna benzer olarak, ikinci varyant i7in aspartik asit (D) > asparajin (N) > Histidin (H) ve glutamik asit (E) > glutamin (Q) > lizin (K) varyasyonları kullanılabilir. (Doğal formdan RMSD değeri= 1.01 Å).

- Varyant 3: Varyant 2'ye ek olarak histidin (H) > arjinin (R) değişikliğini i7erir. Bu varyant y6ntem dahilinde kullanılabilir veya kullanılmayabilir. (Doğal formdan RMSD değeri = 0.96 Å).

Değişimler sonucu sayısı artan histidin (H), lizin (K) ve arginin (R) pH'a duyarlı proton kabul etme kapasitesine sahip olan bir bazik amino asitlerdir. Bu y6ntemle tasarlanan varyantlar proteinlerin pH-6zg6 özelliklerini optimize etmek ve bazik ortamda stabilite

sağlamak için uygulanabilir. Bunun yanında ters yönlü varyasyonlar asidik karakterli amino asitlerin sayısının artmasına yol açar:

- Varyant 4 ($H > N$, $K > Q$): Bu varyantta histidin (H) asparajin (N) ile ve lizin (K) glutamin (Q) ile değiştirilmiştir. Doğal formdan RMSD değeri 0.78 Å olarak hesaplanmıştır. Değişimlerin yapıya sınırlı düzeyde etkisi olduğu ve proteinin yapısal bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir.
- Varyant 5 ($H > N$, $K > Q$, $N > D$, $Q > E$): Daha fazla amino asit değişimi yapılmasına rağmen, RMSD değeri yalnızca 0.91 Å'ye yükselmiştir. Bu minimal değişim, proteinin stabilitesini ve genel yapısını büyük ölçüde koruduğunu göstermektedir.
- Varyant 6 ($H > N$, $K > Q$, $Q > E$, $R > H$): En fazla değişime uğrayan varyanttır ve arjinin (R) histidin (H) ile değiştirilmiştir. Doğal formdan RMSD değeri 1.06 Å olarak hesaplanmıştır. Bu artış küçük bir sapma (<3 Å) olarak değerlendirilmiş ve proteinin yapısal stabilitesinin büyük ölçüde korunduğunu ortaya koymuştur.

Bu amino asit değişiklikleri, proteinin hesaplamalı olarak tahmin edilen yapısında doğal forma göre oldukça küçük bir yapısal değişikliğe yol açmıştır. RMSD'nin 1Å gibi düşük bir değerde olması, evrimsel olarak kodon baz alınarak planlanan amino asit değişimlerinin, protein yapısında beklenen korunmayı sağladığını ve yöntemin başarılı bir şekilde uygulanabildiğini göstermektedir. Özellikle, yapılan değişikliklerin protein yapısında büyük sapmalara yol açmadan optimize ettiği ve yapıyı koruduğu anlaşılmıştır. EAA1 proteini üzerindeki mutasyonların elektrostatik etkilerini değerlendirmek için, farklı varyantlara ait yüzey modelleri analiz edilmiştir. Belirtilen pH koşullarında protonasyon durumları atanmış ve yüzey yük dağılımı sürekli elektrostatik denklemler (Poisson-Boltzmann) kullanılarak hesaplanmıştır. Poisson denklemi, bir yük dağılımından kaynaklanan elektrik potansiyelini tanımlarken, Boltzmann dağılımı, iyonların termal hareket nedeniyle bir elektrik alan içinde nasıl dağıldığını ifade etmektedir. Her bir varyantın elektrostatik yük dağılımında, yük yoğunluğunun düzenli bir şekilde arttığını gösteren belirgin değişiklikler gözlenmiştir:

- pH 11 Koşulları (varyant 1, 2, 3): Pozitif yüklü alanların varyantlar arasında giderek yüzeyde daha yoğunlaştığı görülmüştür. Bu artış, tasarımların

yüzeydeki yük dağılımını düzenli bir şekilde optimize ettiğini ve protein yapısının pH 11 ortamına duyarlı bir şekilde uyum sağladığını göstermektedir.

- pH 4.5 Koşulları (varyant 4, 5, 6): Negatif yüklü alanların varyantlar arasında düzenli bir artış gösterdiği ve bu yüklerin yüzeyde belirli bölgelerde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Bu durum, varyant tasarımının pH 4.5 ortamına duyarlı yük dağılımını doğal proteinlerdeki adaptif özelliklerle uyumlu hale getirdiğini göstermektedir.

Yük yoğunluğunun pH koşullarına bağlı olarak varyantlar arasında sıralı bir artış göstermesi, tasarımların proteinlerin doğal adaptasyon mekanizmalarını taklit ettiğini veya bu mekanizmalarla uyumlu olduğunu düşündürmektedir. Bu durum:

- Proteinlerin asidik ve bazik ortamlardaki işlevselliğini artırabilir ve geniş bir pH aralığında stabilite sağlayabilir;
- Yük yoğunluğu paternindeki sıralı artış, tasarımların biyolojik aktivite ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu, özellikle enzimatik reaksiyonlar veya protein-protein etkileşimleri gibi işlevlerin optimize edilmesine katkı sağlayabilir;
- pH koşullarına bağlı varyasyonlar, tasarımların evrimsel olarak seçilmiş mekanizmalarla uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır. Bu, protein mühendisliğinde doğadan ilham alan yaklaşımların başarı potansiyelini artırmaktadır;
- pH'ya duyarlı varyasyonların öngörülebilir bir şekilde tasarlanabilmesi, fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ve endüstriyel enzimatik süreçlerde yüksek verimlilik ve stabilite sağlayabilir.

Bunu yanında, pH'ya duyarlı yüklerin yüzeyde belirli bölgelerde (örneğin membran yerleşimine uygun) artış göstermesi, varyant tasarımının doğal proteinlerdeki yük dağılımına uyumlu şekilde optimize edildiğini göstermektedir. Bu çeşitli uygulamalarda avantajlı olabilir:

- Yük yoğunluğundaki değişikliklerin kontrol edilebilir olması, proteinlerin yüzey etkileşimleri ve çözünübilirlik özellikleri üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Bu

durum, proteinlerin biyoteknolojik uygulamalarında daha geniş bir kullanılabilirlik sunmaktadır;

- Bu tasarımların doğal proteinlerle uyumlu mekanizmalar sergilemesi, biyoteknoloji ve ilaç geliştirme süreçlerinde daha az yan etki potansiyeli ile etkili sonuçlar alınabileceğini göstermektedir.

Bu buluşun sağladığı sıralı tek baz değişiklikleri, protein tasarımını ve moleküler evrimsel araştırmaları önemli ölçüde kolaylaştırarak birçok avantaj sunmaktadır:

- Daha önce zaman alıcı ve karmaşık olan protein tasarım süreçleri, tek baz değişimlerine dayanarak daha sistematik ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir;
- Bu yöntem, belirli amino asit pozisyonlarının değiştirilmesine olanak tanıyarak, proteinlerin yapısal ve işlevsel özelliklerini incelemede hedefe yönelik çözümler sunar;
- Tek baz değişiklikleri, protein tasarımında daha yüksek keskinlik sağlar ve elde edilen sonuçların tekrar edilebilirliğini artırır;
- Sıralı tek baz değişiklikleri, moleküler evrimsel süreçleri laboratuvar ortamında sistematik bir şekilde simüle etmeye olanak tanır. Bu yöntem, proteinlerin pH, sıcaklık veya diğer çevresel faktörlere uyum sağlamasında rol oynayan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlar;
- Doğal varyantlar ile tasarlanmış varyantların karşılaştırılması, evrimsel süreçlerin anlaşılmasını hızlandırır. Tek baz değişikliklerine dayalı sistemler, genetik ve protein seviyesindeki filogenetik analizleri destekler ve daha sistematik sonuçlar elde edilmesine yardımcı olur.

pH-özgü ve stabil proteinlerin hızlı bir şekilde tasarlanması, biyosensör ve endüstriyel enzim uygulamalarında büyük bir avantaj sağlar:

- Hastalıkla ilişkili tek baz mutasyonlarının modellenmesi, hedefe yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunur;
- pH-Özgü protein bazlı sensörler geliştirilmesine yardım eder;

- Hücresel veziküllerin pH ölçümlerine olanak sağlayarak fizyolojik ve patolojik araştırmalara katkı sağlar;
- pH-Özgü ilaç salınım sistemlerinde kullanılabilir. Örneğin asidik ortamda aktifleşen ve ilacı hedef dokuya yönlendiren taşıyıcı sistemler;
- 5 - Kanser tedavisinde tümör mikroçevresini gibi pH'ın etkilendiği durumlarda, pH değişikliklerini algılayan protein bazlı ilaç taşıyıcılar tasarlanmasına katkı sağlayabilir;
- Tanı ve izleme sistemlerinde ve acil tanıda kullanılabilir. Örneğin, sepsis gibi durumlarda kan pH değişikliklerini hızlı bir şekilde algılayan teşhis cihazları;
- 10 - Protein tasarımlarıyla, ilacı yalnızca düşük veya yüksek pH koşullarında serbest bırakan akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılabilir;
- Asidik ortamlarda aktif olan veya pH'ya duyarlı şekilde çalışan enzimlerin geliştirilmesine katkı sağlar (örneğin, lizosomal hastalıklar).
- 15 Tek baz değişikliklerine dayanan bu yöntem, proteinlerin yapılarını stabilize ederken, aynı zamanda asidik ve bazik ortamlarda daha verimli işlev göstermelerini sağlar. Bu buluşun sağladığı sıralı baz değişiklikleri, daha önce karmaşık olan protein tasarım süreçlerini basitleştirir ve daha hızlı bir şekilde pH-özü proteinler tasarlanmasını mümkün kılar. Sürecin tek baz değişimlerine dayanması moleküler evrimsel
- 20 araştırmaları da kolaylaştırır ve sistematize eder. Ayrıca, bu tasarımlar, özellikle biyoteknolojik uygulamalar, biyosensör teknolojileri ve ilaç geliştirme gibi alanlarda geniş bir potansiyel sunmaktadır.

Referanslar

- [1] Zhang, S., Tao, F., Qing, R., Tang, H., Skuhersky, M., Corin, K., ... & Maertens, B. (2018). QTY code enables design of detergent-free chemokine receptors that retain ligand-binding activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(37), E8652-E8659.
- 25 [2] Karagöl, A., Karagöl, T., & Zhang, S. (2024). Molecular dynamic simulations reveal that water-soluble QTY-Variants of glutamate transporters EAA1, EAA2 and

EAA3 retain the conformational characteristics of native transporters. *Pharmaceutical Research*, 1-13.

[3] Qing, R., Han, Q., Skuhersky, M., Chung, H., Badr, M., Schubert, T., & Zhang, S. (2019). QTY code designed thermostable and water-soluble chimeric chemokine receptors with tunable ligand affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(51), 25668-25676.

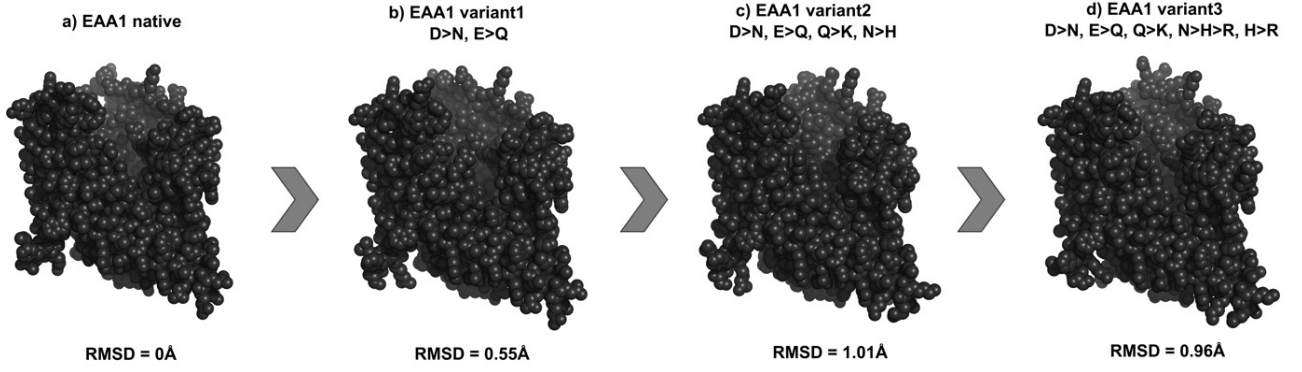
[4] Smorodina, E., Diankin, I., Tao, F., Qing, R., Yang, S., & Zhang, S. (2022). Structural informatic study of determined and AlphaFold2 predicted molecular structures of 13 human solute carrier transporters and their water-soluble QTY variants. *Scientific reports*, 12(1), 20103.

[5] Qing, R., Xue, M., Zhao, J., Wu, L., Breitwieser, A., Smorodina, E., ... & Zhang, S. (2023). Scalable biomimetic sensing system with membrane receptor dual-monolayer probe and graphene transistor arrays. *Science Advances*, 9(29), eadf1402.

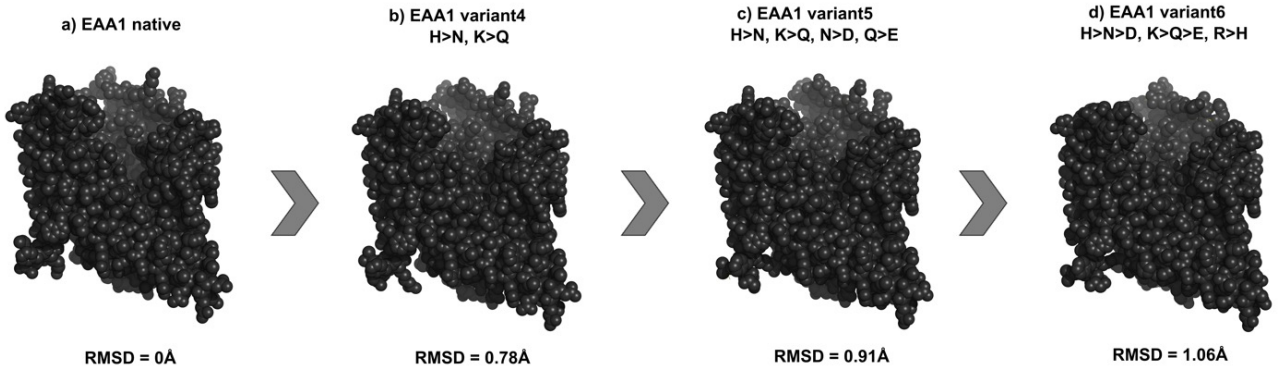
[6] Karagöl, T., Karagöl, A., & Zhang, S. (2024). Structural bioinformatics studies of serotonin, dopamine and norepinephrine transporters and their AlphaFold2 predicted water-soluble QTY variants and uncovering the natural mutations of L-> Q, I-> T, F-> Y and Q-> L, T-> I and Y-> F. *Plos one*, 19(3), e0300340.

[7] Karagöl, A., Karagöl, T., Smorodina, E., & Zhang, S. (2024). Structural bioinformatics studies of glutamate transporters and their AlphaFold2 predicted water-soluble QTY variants and uncovering the natural mutations of L-> Q, I-> T, F-> Y and Q-> L, T-> I and Y-> F. *Plos one*, 19(4), e0289644.

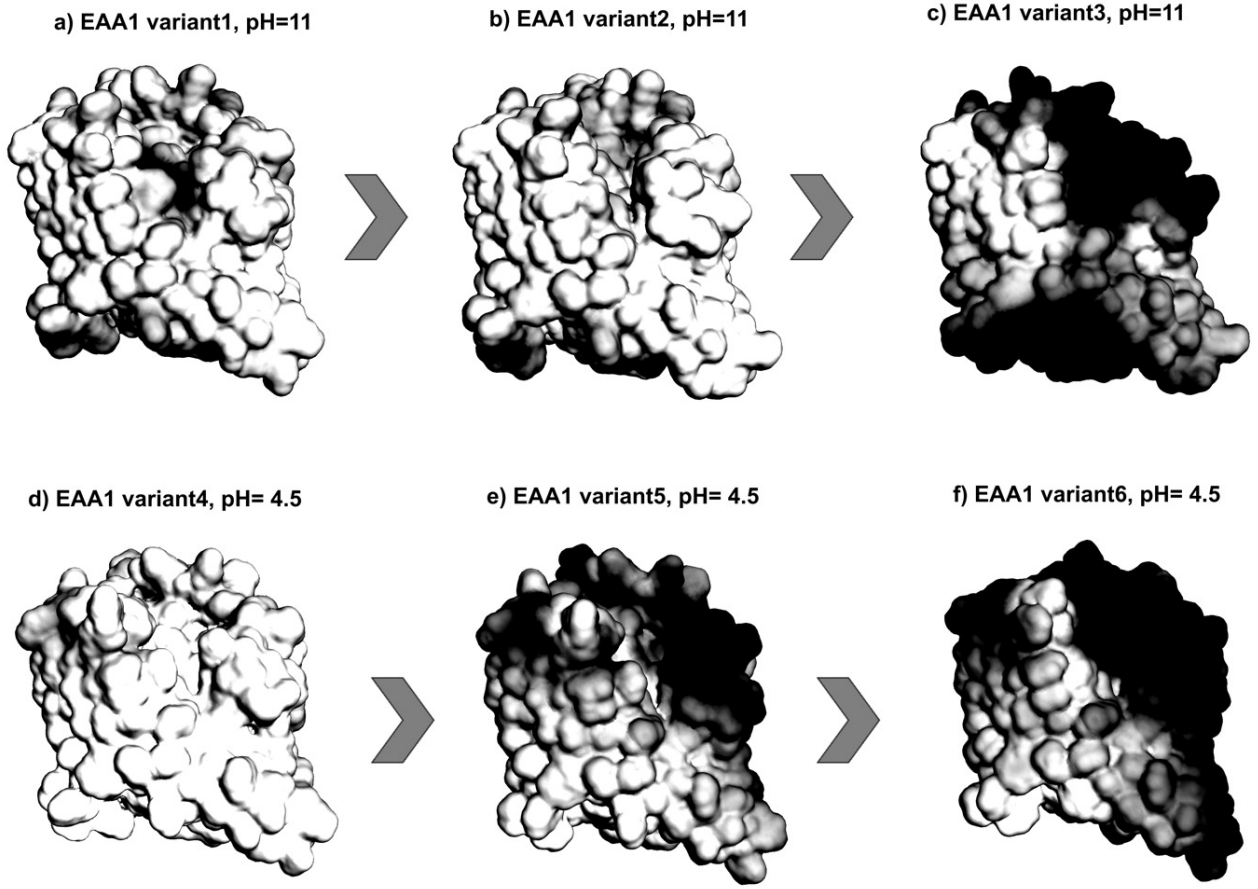
[8] Dettler, J. M., Buscaglia, R., Cui, J., Cashman, D., Blynn, M., & Lewis, E. A. (2010). Biophysical characterization of an ensemble of intramolecular i-motifs formed by the human c-MYC NHE III1 P1 promoter mutant sequence. *Biophysical journal*, 99(2), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.042>



Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3