T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ACE2 RESEPTÖRÜNÜN TAHMİNİ MUTASYON NOKTALARININ VE ETKİLERİNİN *İN SİLİCO* OLARAK BELİRLENMESİ

Emre AKTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Haziran, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ace2 Reseptörünün Tahmini Mutasyon Noktalarının ve Etkilerinin *In Silico* Olarak Belirlenmesi

Emre AKTAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması **29.06.2022** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr Tülin ÖZBEK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr.Üyesi Ahmet EFE KÖSEOĞLU, Üye
Biruni Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan ‘Ace2 Reseptörünün Tahmini Mutasyon Noktalarının ve Etkilerinin *In Silico* Olarak Belirlenmesi’ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Emre AKTAŞ

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde bilgisi, özverisi, yönlendirmesi ve tecrübesiyle bana akademinin her alanında destek olan saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr.Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e, tezin her aşamasında yanımda olduğu için saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu geçiçi dünyada insanın hakkı gözetmesi gerektiğini, başarının sadece maddiyatla ölçülen bir şey olmadığını, insan kazanmanın da en büyük başarılarından biri olduğunu söyleyen, bunları bana empoze eden ve her zaman desteklerini veren başta anne, babama ve tüm diğer aile bireylerime çok teşekkür ediyorum.

Hayatımı paylaştığım, hayatta pozitif bakmamı sağlayan, eve her geldiğimde günün yorgunluğu unutturan, gülüşüyle enerji saçan biricik eşim Nazlı AKTAŞ'a da her daim yanımda olduğu için çok teşekkür ediyorum.

Yüksek Lisans dahil olmak üzere bu sürece kadar üzerimde emekleri olan; İlkokul, Ortaokul, Lise ve Üniversite hocalarıma sonsuz saygılarımı sunarım.

Zamanımızın çoğunu geçirdiğimiz okuldaki mesai arkadaşlarım; Şener ÇİNTESUN ve Emrah BERTAN'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Emre AKTAŞ

SİMGE LİSTESİ vi
KISALTMA LİSTESİ vii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ x
ÖZET xi
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Ace2 Reseptörü Neden Önemlidir? 4
2.1.1 Ace2 Reseptörü Tanımı ve Salgılandığı Yerler 4
2.1.2 Ace2 Reseptörün Görevleri 5
2.1.3 ACE2 Reseptörün Koronavirüs Hastalığı Salgınındaki Rolü 6
2.2 Ace2 Genin Kromozum Üzerindeki Yeri 8
2.3 Rekombinant Ace2 Proteinin Kullanım Alanları 8
3 HAZIRLIKLAR 10
3.1 Ace2 Tahmini Mutasyon Noktalarının ve Etkilerinin *In Silico* Olarak Belirlenmesi İçin Kullanılacak Akış Şeması 10
3.2 Ace2 Genin Etkileşim İçinde Olabileceği Genlerin Tespiti 10
3.3 Ace2'nin FASTA'sının Alınması ve Gösterilmesi 10
3.4 Ace2 Reseptörünün Transmembran Topolojisinin ve Sinyal Peptitlerin Yerlerinin Gösterimi 11
3.5 Ace2 Reseptörüne Yönelik Düzensizlik ve Yapılanmamış Yerlerin Tespiti 11
3.6 Ace2 Reseptöründeki Olası Nokta Mutasyonların veya Silinmelerin Ace2'nin Biyolojik Fonksiyonuna Nasıl Etki Edebileceğinin Tahminlerinin Yapılması 11
3.7 Ace2 Reseptörünün Olası Mutasyonlara Karşı Stabilitesinin Tahmini Değişikliklerinin Tespiti 11
3.8 Ace2 Reseptörünün Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonlarla ile Doğal yapısının Boyut, Yük, Hidrofobiklik Bakımından Karşılaştırılması 11
3.9 Ace2 Reseptörünün Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonların Tahmin Edilen Fiziko-Kimyasal Parametre Sonuçları 12
3.10 Olası Mutasyonlar Sonucu Ace2 Reseptörü ve Spike Proteinin Kenetlenme(Docking) Tahmini Skorlarının Bulunması ve Gösterilmesi.. 12
3.11 Ace2 Reseptörünün Korunmuş Bölgelerinin Tespitinin Yapılması 12

3.12 Ace2 Reseptörünün Bazı Proteinlerle Etkileşiminin Gösterilmesi..... 12
3.13 Aday Rekombinant Ace2'ler için Transmembran Sarmal Sayısı ve Alerjinitesinin İncelenmesi 13
4 SONUÇ VE ÖNERİLER 14
4.1 Ace2 Genin Etkileşim İçinde Olabileceği Genlerin Tespiti..... 14
4.2 Ace2'nin FASTA'sının Alınması ve Gösterilmesi..... 15
4.3 Ace2 Reseptörünün Transmembran Topolojisinin ve Sinyal Peptitlerin Yerlerinin Gösterimi..... 16
4.4 Ace2 Reseptörüne Yönelik Düzensizlik ve yapılanmamış Yerlerin Tespiti 17
4.5 Ace2 Reseptöründeki Olası Mutasyon veya Silinmelerin Ace2'nin Biyolojik Fonksiyonuna Nasıl Etki Edebileceğinin Tahminlerinin Yapılması..... 18
4.6 Ace2 Reseptörünün Olası G104 ve L108 Mutasyonlara Karşı Stabilitesinin Tahmini Değişimlerinin Tespiti 29
4.7 Ace2 Reseptörünün Korunmuş Bölgelerinin Tespitinin Yapılması..... 30
4.8 Ace2 Reseptörünün G104 ve L108 Noktalarındaki Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonlarla ile Doğal yapısının Boyut, Yük, Hidrofobiklik Bakımından Karşılaştırılması 32
4.9 Ace2 Reseptörünün G104 ve L108 Bölgelerindeki Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonların Tahmin Edilen Fiziko-Kimyasal Parametre Sonuçları..... 35
4.10 G104 ve L108'deki Olası Mutasyonların Ace2 Reseptörü ve Spike Proteinin Kenetlenme(Docking) Tahmini Skorlarınına Etkisinin Bulunması ve Gösterilmesi 40
4.11 Ace2 Reseptörünün Bazı Proteinlerle Etkileşiminin Gösterilmesi..... 43
4.12 Aday Rekombinant Ace2'lerin Alerjinitesi ve Sarmal Sayılarının Tahminin Yapılması 45
4.13 Ace2 Reseptörünün İn Sliko Ortamında Bulunan Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması..... 48
KAYNAKÇA 55
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 68

SİMGE LİSTESİ

/	Hem hem de
-	Negatif
0	Nötr
pH	Power Of Hydrogen
+	Pozitif

KISALTMA LİSTESİ

A	Alanin
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ALI	Akut Akciğer Hasarı
ARDS	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
AT1	Anjiyotensin I reseptör tip 1
AT2	Anjiyotensin II reseptör tip 2
ATP6AP2	ATPase H taşıyan lizozomal aksesuar protein 2
C	Sistein
CLEC4M	C-tipi lektin alan ailesi 4
D	Aspartik asit
Del	Delesyon
E	Glütamik asit
F	Fenilalanin
FASTA	Metin tabanlı bir format
G	Glisin
GeneMANIA	Gen Çoklu İlişki Ağı Entegrasyon Algoritması
GRAVY	Büyük Ortalama Hidropati
H	Histidin
I	İzolösin
K	Lizin
L	Lösin
M	Metiyonin
MEP1A	Meprin A alt birimi alfa
MME	Membran Metalloendopeptidaz
mRNA	Mesajcı RNA
N	Asparajin

NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
P	Prolin
PROVEAN	Protein Varyasyon Etkisi Analiz Aracı
Q	Glütamin
R	Arjinin
RAS	Renin-Anjiyotensin Sistemi
rhACE2	Rekombinant ACE2 proteinini
RI	Güvenilirlik İndeksi
S	Serin
SARS-CoV	Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü
T	Treonin
TCR	T-hücresi reseptörü
TMPRSS2	Transmembran proteaz, serin 2
TP	Transmembran proteini
V	Valin
W	Triptofan
Y	Tirozin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 İnsanda ACE2'nin dokulardaki dağılımının gösterimi[35,36] 4

Şekil 2.2 Ace2 proteinin eksprese edildiği dokular ve organların gösterimi[18-20] 5

Şekil 2.3 Renin-anjiyotensin sisteminin basitleştirilmiş diyagramı (G proteinine bağlı reseptörler anjiyotensin II reseptör tip 1 (AT1) ve anjiyotensin II reseptör tip 2 (AT2)) [38] 6

Şekil 2.4 Ace2 reseptörün SARS CoV spike proteinin konak hücreye geçişinde kritik rol oynamaktadır. SARS CoV spike proteini, bu virüsün aktivasyonu için hem Ace2 hem de TMPRSS2'yi(Transmembran proteaz, serin 2) kullanmaktadır [37,38] 7

Şekil 2.5 Spike proteinin yapsının gösterimi [37,38] 7

Şekil 2.6 Ace2 genin kromozom üzerindeki yerinin gösterimi 8

Şekil 3.1 Ace2'nin veri tabanından alınarak gen-gen etkileşimi ve tahmini mutasyon noktalarının ve etkilerinin *in silico* olarak belirlenmesinde izlenecek yolları gösteren akış şeması 10

Şekil 4.1 ACE2'nin etkileşim içinde olduğu genlerin etkileşimin gösterimi. Tüm veriler Genemania veri tabanından alınmıştır.(TMPRSS2 Transmembran proteaz, serin 2, ATP6AP2 ATPase H taşıyan lizozomal aksesuar protein 2,MME; Membran Metalloendopeptidaz,) 14

Şekil 4.2 ACE2'nin amino asit dizileri kullanılarak transmembran topolojisinin ve sinyal peptitlerinin tahmini.(Gri renk: transmembranı, yeşil renk: sitoplazmik kısmı, sax mavisi: sitoplazmik olmayan kısmı ve kırmızı renk: sinyal veren peptitleri göstermektedir. 16

Şekil 4.3 ACE2 proteinin korunmuş bölgelerin tespitinin ConSurf Server kullanılarak tahmin edilmesi. (A) ACE2'nin üç boyutlu yapısı üzerinde yerlerin tespiti iken (B) ACE2'nin 180 derece döndülmüş halini temsil etmektedir. Skor tablosu verilmiş ve bu sonuçlara göre G104-L108 arasında G(1), S(9), L(3), V(8), N(7), Q(7) sonuçlar bulunmuşur. 36

Şekil 4.4 (A)G104-L108 arasındaki bölgenin olası üç boyutlu yapısının tahmini ve 3Dpro kullanılarak elde edilmiştir.(**B**) ilgili bölgenin ACE2 proteinin üzerindeki konumu (**C**) Bu bölgenin SARS CoV ile(pdb:6VXX) olası etkilşimin olabileceği yer. (**D**) ACE2-spike(pdb:6VXX)) yerleştirmenin yapılmaşı hali, tüm görüntülemeler Chimera 1.15 kullanılarak elde edilmiştir 37

Şekil 4.5 ACE2'nin FASTA'sı alınarak STRING aracında kullanılması sonucu elde edilen ACE2 ve diğer olası proteinlerin etkileşimin gösterimidir. Litereatürde referenası olan çalışmaların etkileşimleridir. 38

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 disEMBL aracı tarafından ACE2 reseptörüne yönelik bulunan ve ortak olan düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgelerin gösterimi. Bu ortak bölgeler, hem konum hem de diziler siyah renkle vurgulanmıştır 18

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin (ACE-2:NP_068576.1) tahmin edilmesi. GSSVLSE(NP_068576.1 üzerinde 104-110) ve DRKKKNKARS(NP_068576.1 üzerinde 767-777) Tablo4.1'deki veriler baz alınmıştır. Tahmin edilen tüm zararlı sonuçlar ve silme sonuçları siyah renkle vurgulanmıştır 20

Tablo 4.3 I-Mutant2.0 tarafından tahmin edilen tek bölgeli mutasyon sonuçlarına göre protein stabilitesi değişikliklerinin tahmini. (RI: Güvenilirlik İndeksi) I-Mutant2'de Santigrat derece cinsinden sıcaklık 25 ve pH(-log[H+]) 7 olarak ayarlandı..... 30

Tablo 4.4 Hope aracından elde edilen doğal tip ve mutant tip amino asit (ACE-2: NP_068576.1)) özelliklerinin sonuçları. [a]HOPE aracına göre sonuç elde edilemedi.(0:Nötr, +:Pozitif, -, Negatif) 33

Tablo 4.5 Ace2'nin oluşturulan olası mutasyonların ExPASyProtParam tarafından tahmin edilen fiziko-kimyasal parametre sonuçları. [a]Normal, NP_068576.1'dir..... 36

Tablo 4.6 Tahmin edilen modeller içinde en yüksek iki yerleştirme skoru (ACE-2 reseptörü ile spike protein arasında). HDOCK sunucusu tarafından elde edilmiştir. En düşük yerleştirme sonuçlarına sahip olanlar siyah ile vurgulanmıştır 41

Tablo 4.7 Olası aday Ace2'lerin alerjen olup olmadığı AllerTOPv.2.0 aracıyla ve transmembran sarmal sayısının TMHMM Server v. 2.0 aracıyla tahmini sonuçlarının gösterimi..... 43

ÖZET

Ace2 Reseptörünün Tahmini Mutasyon Noktalarının ve Etkilerinin *In Silico* Olarak Belirlenmesi

Emre AKTAŞ

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Bir metalopeptidaz çeşidi olan Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (Ace2); 2019 yılının sonunda Çin'de ortaya çıkmış ,tüm dünyaya yayılmış ve şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-COV-2) neden olduğu salgında SARS-COV-2'nin konak hücreye girip replike olmasında kritik rol oynamıştır. Bu nedenle pandemiyle birlikte Ace2 üzerine yapılan çalışmalar oldukça hız kazanmış olsada özelikle üst solunum rahatsızlıklarında, böbrek yetmezliğinde, tansiyon ve kardiyovasküler sistemlerde de çok önemli görevler üstlendiği literatürde belirtilmiştir. Birçok hastalıkta oldukça kritik rolü bulunan bu reseptörün yapısını oluşturan amino asitlerin; bulundukları pozisyonların, olası mutasyon/ delesyonlarda Ace2 reseptörünün kimyasal ya da fiziksel olarak nasıl etkileneceğine dair literatürde çok kısıtlı çalışmalar yapıldığı tespit edildi. Biyoinformatik araçlar kullanılarak Ace2'yi oluşturan amino asitler üzerine *in silico* ortamda kapsamlı bir çalışma yapılarak olası değişikliklerin etkilerinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Ace2'nin amino asit düzeyinde FASTA'sı kullanılmıştır. Ace2'nin yapısının düzensizliğe ve yapılanmasında hangi bölgelerin(pozisyon) rol oynadığı disEMBL aracı tarafından tahmin edildi ve bu

tahmin edilen bölgeler tek tek olası mutasyonlar ve delesyonlara maruz bırakılmıştır.

G104 ve L108 pozisyonlarının; Protein Varyasyon Etkisi Analiz (PROVEAN) aracıyla Ace2'nin biyolojik aktivite fonksiyonunda, I-Mutant2.0 ile Ace2'nin stabilitesinin değişiminde, HOPE aracıyla Ace2'nin fiziksel (boyut, yük ve hidrofobiklik) değişimlerinde, ExPASyProtParam ile Ace2'nin fiziko-kimyasal parametreleri etkilemesinde, HDOCK aracıyla Ace2'nin- Korona Virüsün yüzey proteiniyle(spike) kenetlenme(docking) skorların değişimlerinde etkili olabilceği valide edildi. Valide edilen bu pozisyonların korunmuş bölgeye ait olmadığı da ConSurf Server tarafından tahmin edilmiştir. G104 ve L108 pozisyonlarındaki olası Ace2 rekombinant adayları olması durumunda alerjen özellikleri de AllerTOPv.2.0 tarafından tahmin edilmiş ve alergen olmadıkları belirlenmiştir. Bu tezdeki sonuçların; üst solunum rahatsızlıklarında önemi artan farklı rekombinant Ace2 adayların belirlenmesinde, ACE2-spike etkileşiminin daha da detaylandırılmasında, Ace2'nin kritik rol oynadığı hastalıklara yönelik çalışmalara olumlu yönde katkı sağlayacak bir kaynak olacağı düşünülmektedir. İleriki çalışmalarımızda bu validasonların in vitro ortamında kanıtlanması da düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Spike-Ace2 etkileşimi, protein biyoinformatik, Ace-2 biyoinformatik analizi, Ace2'nin olası kırılgan noktaların tahmini

ABSTRACT

In Slico Determination of Predicted Mutation Points and Effects of the Ace2 Receptor

Emre AKTAŞ

Department of Moleculer Biology and Genetic

MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Angiotensin-converting enzyme 2 (Ace2), a type of metallopeptidase; played a critical role in the replication of SARS-COV-2 in the host cell in the epidemic caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-COV-2), which emerged in China at the end of 2019, spread all over the world. For this reason, although the studies on Ace2 have gained speed with the pandemic, it has been stated in the literature that it plays a very important role, especially in upper respiratory diseases, kidney failure, blood pressure, and cardiovascular systems. The amino acids that make up the structure of this receptor, play a critical role in vital events; It has been determined that very limited studies have been carried out in the literature on how their positions will affect the Ace2 receptor chemically or physically in possible mutations/deletions. By using bioinformatics tools, it is aimed to add a new study to these limited studies with a very comprehensive study on the amino acids that make up Ace2 in the *In Silico* environment. Based on Ace2's FASTA at the amino acid level, this FASTA was used in all bioinformatics tools. Regions predicted by the disEMBL tool to

play a role in disorder/unstructured regions of the structure of Ace2 were individually exposed to possible mutations and deletions. G104 and L108; The effect of Protein Variation Analysis (PROVEAN) on the biological activity function of Ace2, the change of the stability of Ace2 with I-Mutant2.0, the physical (size, charge, and hydrophobicity) changes of Ace2 with the HOPE tool, the Physico-chemical changes of Ace2 with ExPASyProtParam It was validated by HDOCK tool that Ace2-Corona Virus can be effective in the changes of docking scores with the surface protein (spike) in affecting the parameters. It was estimated by ConSurf Server that these validated positions do not belong to the protected area. In the case of possible Ace2 recombinant candidates at positions G104 and L108, their allergenic properties were also predicted by AllerTOPv.2.0 and they were determined to be non-allergenic. The results of this study; It is thought that it will be a resource that will contribute positively to studies on diseases in which Ace2 plays a critical role, in identifying different recombinant Ace2 candidates, which have increased importance in upper respiratory diseases, and in further detailing the Ace2-spike interaction. It is also considered that these validations will be proven in vitro in our future studies.

Keywords: Spike-Ace2 interaction, protein bioinformatics, Ace2 bioinformatics analysis, Predicted vulnerabilities of Ace2

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 veya kısaca Ace2; akciğerler, arterler, kalp, böbrekler ve bağırsaklardaki hücrelerin dış yüzeyine (hücre zarına) bağlı bir metalopeptidaz çeşidi olan enzimdir [1]. Bu enzim 2019 yılının sonunda ortaya çıkmış ,tüm dünyaya yayılmış ve şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-COV-2) neden olduğu salgında SARS-COV-2'nin spike proteiniyle etkileşime girerek bu virüsün konak hücre girişinde öncü bir rol oynamıştır [1-3]. Bu nedenle pandemiyle birlikte Ace2 üzerine yapılan çalışmalar oldukça hız kazanmış olsada Ace2'nin çok önemli rollerinin olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bunlardan birkaçı; Ace2'nin, kuş gribi A'nın (H5N1, H7N9) neden olduğu akut solunum sıkıntısı sendromunda (ARDS) ve akut akciğer hasarında (ALI) önemli bir etken olarak bilinmesi, Ang II'nin (vazokonstriktör anjiyotensin II) RAS'ın (renin-anjiyotensin sistemi) temel bir negatif düzenleyicisi olarak görev yapmasıdır [3-6]. RAS için olan önemli düzenleyici rolü olan Ace2'nin; inflamasyon, anti-hipertansiyon, anti-trombüs ve anti-fibroz aktivitesinin kardiyovasküler korumayı iyileştirmede rol oynadığı literatürde belirtilmiştir [6,7]. Ayrıca Ace2, çok farklı ve önemli doku/organlarda eksprese edildiği literatürde yer almaktadır. Örneğin;küçük ve büyük arterlerdeki endotel hücrelerinde, arteriyel düz kas hücrelerinde, ince bağırsağın enterositlerinde, leydig hücrelerinde ve sertoli hücrelerinde, renal proksimal tübülde ve ince bağırsakta, kalp, böbrek, testis ve gastrointestinal sistemde, akciğerde, emici enterositler, bağırsak epitel hücreleri, kornea, safra kesesi ve nazal salgı hücreleri içinde protein düzeyinde eksprese edilmektedir [20-30]. Ace2, anjiyotensin-II miktarını azaltarak, anjiyotensin (1-7)'yi arttırarak anjiyotensin dönüştürücü enzimin (Ace) aktivitesine karşı koymaktadır. Bu sayede kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde umut verici bir ilaç hedefi

haline gelmiştir [21-23] . Tüm bu önemli veriler [7-30] dikkate alındığında Ace2 üzerine yapılacak çalışmalar daha da önem kazanmaktadır.

Gelişmekte olan rekombinat teknolojisi sayesinde Ace2'nin rekombinant formları oluşturulmuş ve bu formlar rhACE2 olarak adlandırılmıştır [13]. Rekombinant Ace2 (rhACE2) enjeksiyonunun akut solunum sıkıntısı sendromunda (ARDS) ve pulmoner arteriyel hipertansiyonu tedavi ettiği düşünülmektedir. Özelikle üst solunum rahatsızlıklarında etkin olduğu; sigara dumanına maruz kalan kişilerde akciğerlerdeki Ace2 eksprese seviyesi artığı, akut solunum sıkıntısı sendromu yaşayan domuz yavrularında oksijen satürasyonunu arttırdığı, COVİD-19'da üst solunum yolları rahtasızlıklarında da oksijen tedavisi için önerildiği örnekleri verilebilir ve tüm bunlar literatürde önemli çalışmalar olarak yerini almıştır [28-35]. Eksprese edildiği önemli yerler, görev aldığı yolaklar, etkileşimleri [7-35] Ace2'nin yapısının incelenmesi açısından, yaptığımız analizlerin önemini ortaya koymaktadır.

1.2 Tezin Amacı

İnsan vücudunda önemli doku ve organlarda eksprese edilen, SARS CoV-2'ye ait spike proteiniyle etkileşime girerek bu virüsü konak hücreye girmesine neden olan, oluşturulan rekombinant çeşidiyle oksijen satürasyonu etkileyen, renin-anjiyotensin sistemi(RAS) düzenleyicisi olan Ace2 proteinin [7-35] yapısını oluşturan tüm amino asitlerin konumlarının bilinmesi oldukça önemlidir. Ace2'nin yapısını oluşturan bu amino asitlerin olası mutasyon/ delesyonlarda Ace2'nin biyolojik fonksiyonlarında, Ace2'nin fiziksel-kimyasal özelliklerinde nasıl roller üstleneceğini anlamak için kapsamlı bir *in silico* analizleri yapılması hedeflenmektedir. Bu hedeflenen sonuçların; spike-Ace2 etkileşimine farklı bir perspektif kazandırması, üst solunum rahatsızlıkları ve kardiyovasküler rahatsızlıklara yönelik çalışmalara olumlu yönde katkı sağlaması , yapılacak olan rekombinant Ace2 çalışmalarına ve literatürdeki Ace2'nin yapısına yönelik kısıtlı olan *in silico* çalışmalarına önemli bir kaynak olmasıdır.

1.3 Hipotez

Proteinlerin yapılarında bazen bazı konumlardaki amino asitlerlerin değişimi; protein yapısının stabil kalmasında, proteinin biyolojik aktivitesinde, protein yapısının korunmasında, proteinin diğer proteinlerle etkileşiminde etkin rol üstlenebileceği, proteinin fiziksel-kimyasal özelliklerin değişiminde kayda değer şekilde ön plana çıktığı bilinmektedir [1-15,25-35]. Bunun gibi Ace2'nin de bazı pozisyonlardaki değişimlerin Ace2'yi etkileyebileceği olasıdır. Bu hipotezimizi sliko ortamında temellendirmek için Ace2'nin amino asit düzeyinde ve literatüre göre mutasyon ya da delesyon olmayan FASTA'sı baz alındı. Kullanılan biyoinformatik araçların sonuçları birbirlerini desteklemeli ve bazı pozisyonlardaki amino asitlerin değişimi;

- Ace2'nin yapısının düzensizliğinde/yapılanmasında,
- Ace2'nin biyolojik aktivite fonksiyonunda,
- Ace2'nin stabilitesinin değişiminde,
- Ace2'nin fiziksel (boyut, yük ve hidrofobiklik) değişimlerinde,
- Ace2'nin- korona virüsün yüzey proteiniyle(spike) kenetlenme(docking) skorların değişimlerinde ,
- Ace2'nin fiziko-kimyasal parametreleri etkilemesinde,
- Olası Ace2 rekombinant adayların belirlenmesi gibi önemli özelliklerin hepsini birden etkileyecek şekilde ön plana çıkmalıdır.

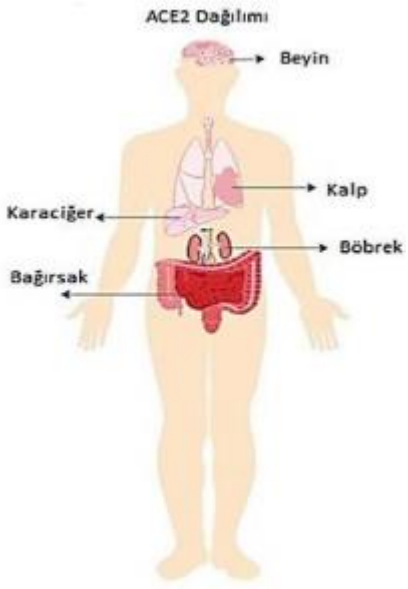
Tüm bu özellikler birbirini valide etmeli ve olası aday rekombinant Ace2'ler de alergen olmamalıdır. Ace2 için tüm bu özellikleri etkileyebileceği pozisyonların olabileceği ve bu pozisyonların sonuçlarıyla birlikte tespit etmek hipotezimiz için önem arz etmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

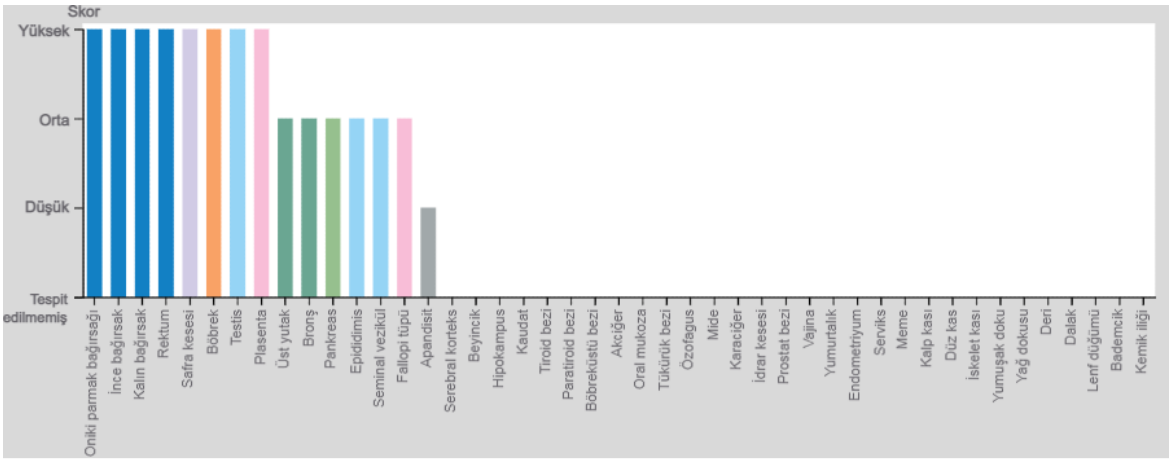
2.1 Ace2 Reseptörü Neden Önemlidir?

2.1.1 Ace2 Reseptörü Tanımı ve Salgılandığı Yerler

Ace2 reseptörü; akciğerler, arterler, kalp, böbrekler ve bağırsaklardaki hücrelerin dış yüzeyine (hücre zarına) bağlı bir metalopeptidaz çeşidi bir enzimdir [1]. Bu enzim; küçük/büyük arterlerdeki endotel hücrelerinde, arteriyel düz kas hücrelerinde, ince bağırsağın enterositlerinde, leydig hücrelerinde , sertoli hücrelerinde, renal proksimal tübülde ,ince bağırsakta, kalp, böbrek, testis ve gastrointestinal sistemde, akciğerde, bazı alveolar tip 2'lerde , nazal epitel hücrelerinde ,bazı akciğer alveolar tip 2 hücreleri, enterositler, bağırsak epitel hücreleri, kornea, safra kesesi, serebral korteks arteriyel düz kas hücreleri, beyin sapı ve nazal salgı hücreleri içinde eksprese edildiği bilinmektedir [7-25,33]. Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de Ace2'nin eksperese edildiği doku ve organlar gösterilmiştir.



Şekil 2.1 İnsanda ACE2'nin dokulardaki dağılımının gösterimi[35,36]



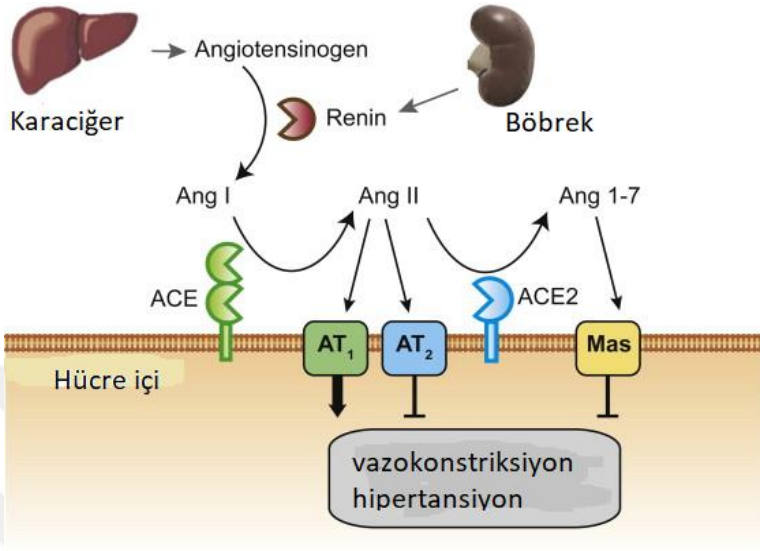
Şekil 2.2 Ace2 proteinin eksprese edildiği dokular ve organların gösterimi[18-20]

İnsan Protein Atlası kullanılarak Ace2'nin protein düzeyinde ekspresyonun olduğu yerler belirlenmiştir ve Şekil 2'de göserilmiştir.
https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130234-ACE2/tissue

2.1.2 Ace2 Reseptörün Görevleri

Ace2; anjiyotensin I hormonunu vazokonstriktör anjiyotensin II'ye ayıran Ace'ye yönelik vucütta dengeleme mekanizması görevini üstlemiştir [34], bradykinin, apelin, nörotensin, dinorfin A ve grelin peptitleri gibi çoksayıda peptitleri ayırmada da görevlidir. Ayrıca nötr amino asit taşıyıcısının membran çıkışını da düzenler ve Hartnup hastalığında Ace2; nötr amino asit taşıyıcısında da önemli bir görev üstlemiştir. Bu hastalıkta Triptofan ve nötral amino asitlerin bağırsak ve böbrekteki emilim bozukluğu vardır. Dolayısıyla Ace2'nin amino asitlerin emiliminde de görev aldığını söylemek mümkündür [35,37]. Renin; böbrekte granüler hücrelere salınan ve depolanan 340 amino asitten oluşan, tek başına biyolojik aktiviteye sahip olmayan bir enzimdir, bu enzim Ace2 ile birlikte renin-anjiyotensin sistemi(RAS) önemli görevler yapmaktadır, düşen kan basıncı renin tarafından anjiyotensinojen uyarılır ve angiyotensin I ACE etkiler ve angiyotensin II dönüşüm olur ve Ang 1-7, Ang II'nin AT1'e bağlanmasının aktivitesini engellemek için ilgili reseptör olan MAS reseptörüne bağlanır(Şekil 2.3) [38]. Bu mekanizma damar daralma ve genişlemeye de etki ederek tansiyon olayında etkili olurlar, bu mekanizma Şekil 2.3'te gösterilmiştir [38]. Ang II'nin (vazokonstriktör anjiyotensin II) RAS'ın (renin-anjiyotensin sistemi) temel bir

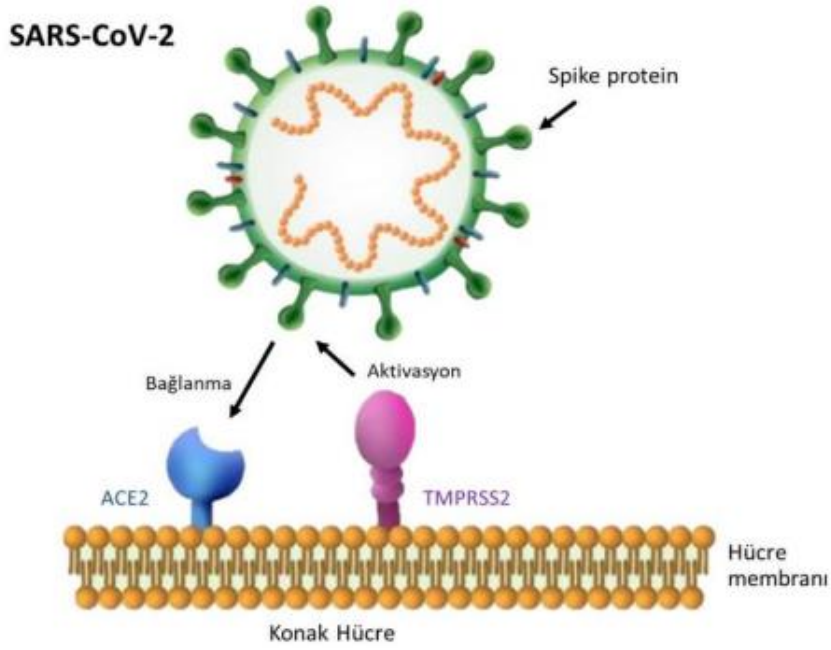
negatif düzenleyicisi olduğu da belirtilen bu enzimin; yapılan çalışmalarda önemli derece de oksijen saturasyonunda etkin olduğu , kardiyovasküler hastalıklarda kritik roller oynadığı, SARS CoV-2'nin konak hücreye alınmasında ana enzim olduğuda bilinmektedir [2,3, 26,28-37].



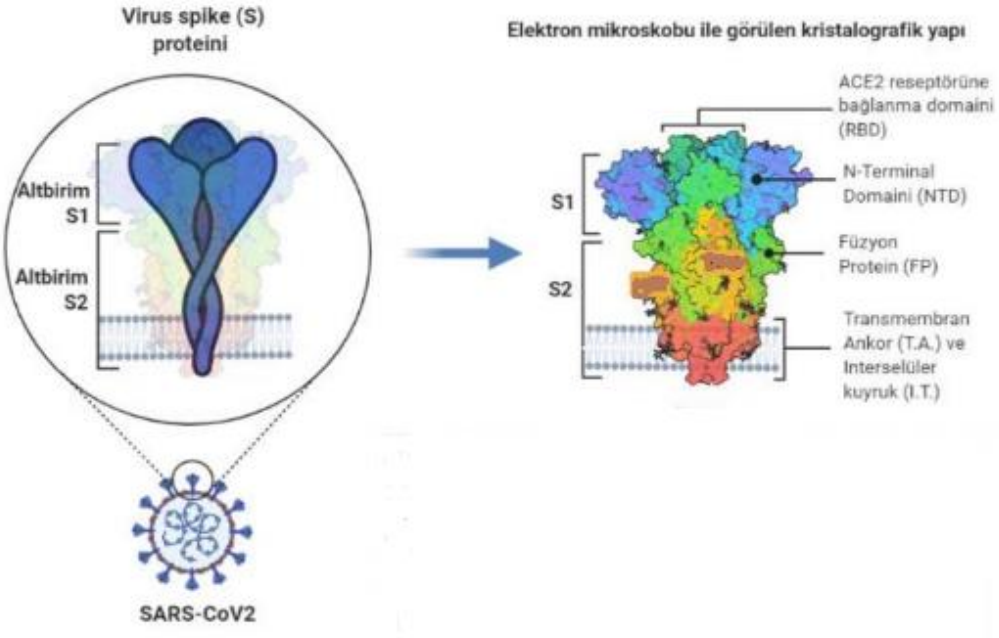
Şekil 2.3 Renin-anjiyotensin sisteminin basitleştirilmiş diyagramı (G proteinine bağlı reseptörler anjiyotensin II reseptör tip 1 (AT1) ve anjiyotensin II reseptör tip 2 (AT2)) [38]

2.1.3 ACE2 Reseptörün Koronavirüs Hastalığı Salgınındaki Rolü

SARS-CoV-2'nin konak hücreye girişinde , önce hücresel anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 reseptörüne bağlanır, bu bağlanmadan sonra transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) önemli rol oynar ve bağlanma bölgesinde kesim yaparak virüs proteinlerin hücre girişine neden olur [39]. Şekil 2.4 bu durumun özeti gösterilmektedir. Ace2, spike proteinin iki alt birimlerinden biri olan S1 alt birimine bağlanır. Bu bağlanma rastgele olmayıp S1 altbirimin üzerinde yer alan reseptör bağlanma bölgesiyle etkileşimle olmaktadır [5,6,37]. Şekil 2.4'te spike proteine ait birimler gösterilmiş ve S2 üzerinde sadece SARS CoV'a ait belli bölgeler olduğu da bilinmektedir [36-39]. Bu yüzden S2 daha çok spike proteinin yapısının korunmasında ve bu proteinin özgünlüğünde rol oynarken S1 ise mutasyonların daha açık ve Ace2'ye bağlanma için reseptör bağlanma yerlerine sahiptir(Şekil 2. 4,Şekil 2.5) [3,6,38-40].



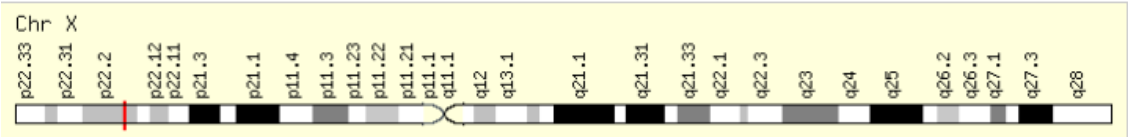
Şekil 2.4 Ace2 reseptörün SARS CoV spike proteinin konak hücreye geçişinde kritik rol oynamaktadır. SARS CoV spike proteini, bu virüsün aktivasyonu için hem Ace2 hem de TMPRSS2'yi(Transmembran proteaz, serin 2) kullanmaktadır [37,38]



Şekil 2.5 Spike proteinin yapsının gösterimi [37,38]

2.2 Ace2 Genin Kromozum Üzerindeki Yeri

GeneCards online weri tabanı tüm açıklamalı ve tahmin edilmiş insan genleri hakkında, bilgilerler içerebilir [41]. Bu veri tabanı kullanarak Ace2 genin kromozum üzerindeki yeri alınmış ve Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Ace2 genine ait veriler; X kromozumun kısa kolu(p:petit) 22.2'nci lokus bölgesinde bulunmaktadır ve Xp22.2 şeklinde kısaltılabilir. X kromozumu üzerindeki yeri Şekil 2.6'da kırmızı bir işaretlenmeyle gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Ace2 genin kromozom üzerindeki yerinin gösterimi

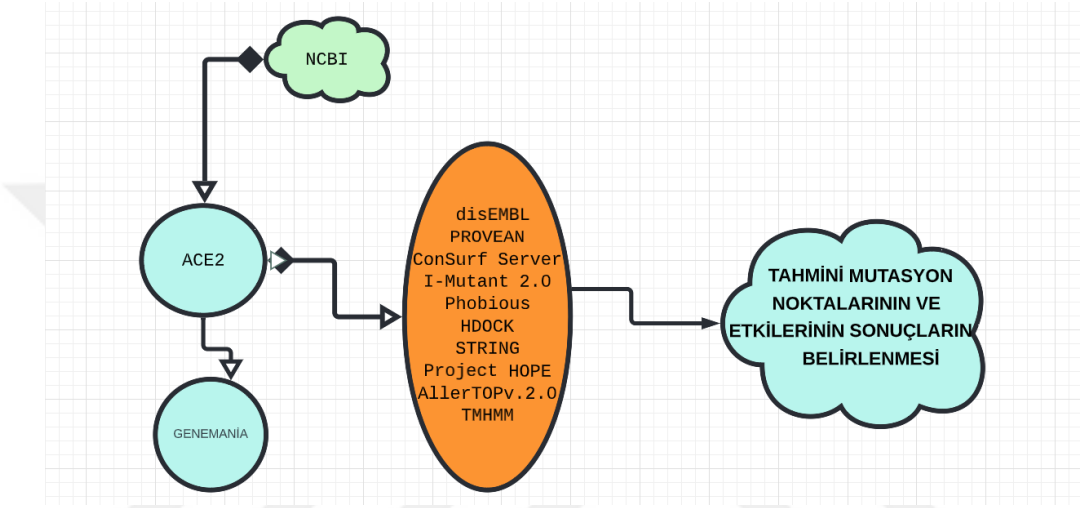
2.3 Rekombinant Ace2 Proteinin Kullanım Alanları

Gelişen Rekombinant DNA teknolojisi Ace2'ye yönelik çalışmalarda da etkisini göstermiştir ve bu teknoloji sayesinde Ace2'nin insan sağlığı için rhACE2 formu oluşturulmuştur. Bu oluşturulan rekombinant Ace2 çeşitlerin tedavilerde de kullanılmaya başlandığı ve umut verici sonuçlar alındığıda literatürde belirtilmiştir [42-46]. Bu rhACE2 isimli yeni bir tedavinin, akut akciğer hasarını giderdiği tahmin edilmekte ve pulmoner hemodinamiği iyileştirdiği görülmektedir. Bu durumu kanıtlaması için akut solunum sıkıntısı sendromu yaşayan domuz yavruları üzerine çalışma yapılmış ve sonuç olarak oksijen satürasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir [42-47]. Klasik renin-anjiyotensin sistem inhibitörlerine (RAS inhibitörlerine) toleransı olmayanlar ve kan dolaşımındaki anjiyotensin II'nin yükseldiği hastalıklarda rhACE2 umut verici bir ilaç olabileceğini düşünülmüştür. rhACE2, Ang II seviyelerini düşürebilir ve Ang 1-7 seviyelerini etkili bir şekilde artırabilir ve kalp, akciğer, karaciğer ve böbrekte koruyucu etkiler gösterebilir [42-44]. rhACE2'nin; kalp-damar rahatsızlıklarında kullanılmış ve olumlu yönde etklileri/sonuçları belirtilmiş [43,44], böbrek yetmezliği çalışmalarında Renin enzimi ile birlikte RAS mekanizmasını olumlu

etkisi tespit edilmiş ve böbrek yetmezliğinde alternatif tedavilerde kullanıldığı bilinmektedir [45,46], diyabet çalışmalarında bu rekombinat Ace2'nin olumlu sonuçlar elde edildiği literatürde belirtilmiştir [47]. Buradaki çalışmalar tek ya da normal Ace2'yi rekombinant teknoloji kullanılarak elde edilmiştir. Bu tezimizde çok sayıda elde edilen aday rekombinant ACE2 formları, bu tür çalışmaları [40-50] daha da artırıcı yönde destekleyecektir.

3
HAZIRLIKLAR

3.1 Ace2 Tahmini Mutasyon Noktalarının ve Etkilerinin *In Silico* Olarak Belirlenmesi İçin Kullanılacak Akış Şeması



Şekil 3.1 Ace2'nin veri tabanından alınarak gen-gen etkileşimi ve tahmini mutasyon noktalarının ve etkilerinin *in silico* olarak belirlenmesinde izlenecek yolları gösteren akış şeması

3.2 Ace2 Genin Etkileşim İçinde Olabileceği Genlerin Tespiti

Gen Çoklu İlişki Ağı Entegrasyon Algoritması (Gene Multiple Association Network Integration Algorithm (GeneMANIA)) veri tabanı kullanılarak Ace2 genin etkileşim içinde olabileceği genler gösterildi [53].

3.3 Ace2'nin FASTA'sının Alınması ve Gösterilmesi

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi(National Center for Biotechnology; NCBI) veri tabanı kullanılarak Ace2 amino asit düzeyinde FASTA'sı indirilmiştir(Ace-2:NP_001358344.1) [54], bu FASTA yapılacak diğer çalışmaların hepsinde material olarak kullanılmıştır [55-68].

3.4 Ace2 Reseptörünün Transmembran Topolojisinin ve Sinyal Peptitlerin Yerlerinin Gösterimi

Phobius, bir proteinin amino asit dizisinden transmembran topolojisinin ve sinyal peptitlerinin tahmini için bir programdır ve bu program kullanılarak Ace2'nin transmembran topolojisinin ve sinyal peptitlerinin yerleri belirlenmiştir [55].

3.5 Ace2 Reseptörüne Yönelik Düzensizlik ve Yapılanmamış Yerlerin Tespiti

DisEMBL biyoinformatik aracı Ace2 reseptörüne yönelik düzenlenmemiş ve yapılandırılmamış bölgeleri tespit etmek için kullanılmıştır [56].

3.6 Ace2 Reseptöründeki Olası Nokta Mutasyonların veya Silinmelerin Ace2'nin Biyolojik Fonksiyonuna Nasıl Etki Edebileceğinin Tahminlerinin Yapılması

Protein Varyasyon Etkisi Analiz (PROVEAN) aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin (ACE-2:NP_068576.1) tahmin edilmesi için kullanılmıştır [57].

3.7 Ace2 Reseptörünün Olası Mutasyonlara Karşı Stabilitesinin Tahmini Değişikliklerinin Tespiti

I-Mutant2.0 aracı kullanılarak olası mutasyon sonuçlarına göre protein stabilitesi değişikliklerinin tahmini yapıldı. Güvenilirlik İndeksine(RI) göre sonuçlar alınmıştır. [58]. Bu araçta amino asit düzeyinde FASTA kullanılmıştır.

3.8 Ace2 Reseptörünün Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonlarla ile Doğal yapısının Boyut, Yük, Hidrofobiklik Bakımından Karşılaştırılması

Hope aracı hem doğal hem de olası mutasyon sonuçlarında oluşabilecek değişimlerin karşılaştırılmasını yapmak için kullanılmıştır ve diğer araçlarda olduğu gibi Ace2'nin amino asit düzeyinde FASTA'sı baz alınmıştır [59].

3.9 Ace2 Reseptörünün Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonların Tahmin Edilen Fiziko-Kimyasal Parametre Sonuçları

Ace2'nin amino asit FASTA'sında oluşabileck olası mutasyonların ve doğal yapısının fiziko-kimyasal parametre sonuçları ExPASyProtParam aracı kullanılarak elde edilmiştir [60]. Olası tüm olası tek nokta mutasyon ve delesyonların sonuçları tek tek bulunmuştur.

3.10 Olası Mutasyonlar Sonucu Ace2 Reseptörü ve Spike Proteinin Kenetlenme(Docking) Tahmini Skorlarının Bulunması ve Gösterilmesi

Ace2 için tahmin edilen ve olası mutasyonlara yatkın, fiziksel ve kimyasal olarak Ace2'nin biyolojik aktivitelerini etkilediği tahmin edilen yerlerin spike ile etkileşimi de HDOCK server kullanılarak elde edilmiştir [61]. 3Dpro kullanılarak küçük ligandların üç boyutlu yapısı elde edilmiş [62]ve Chimera 1.15 kullanılarak da tüm görüntülemeler yapılmıştır [63].

3.11 Ace2 Reseptörünün Korunmuş Bölgelerinin Tespitinin Yapılması

Ace2'nin amino asit düzeyinde FASTA'sı baz alınarak bu proteinin evrimsel süreçte korunmuş bölgelerin olası skorlarını tespit etmek için ConSurf Server kullanılmıştır [64].

3.12 Ace2 Reseptörünün Bazı Proteinlerle Etkileşiminin Gösterilmesi

Ace2'nin amino asit düzeyinde FASTA'sı alınarak olası protein –protein etkileşimleri STRING aracı kullanılarak elde edilmiş ve ekran görüntüsü alınmıştır. Bu araç kullanılırken çoklu FASTA eklemesi ile çalışılmıştır [65,66].

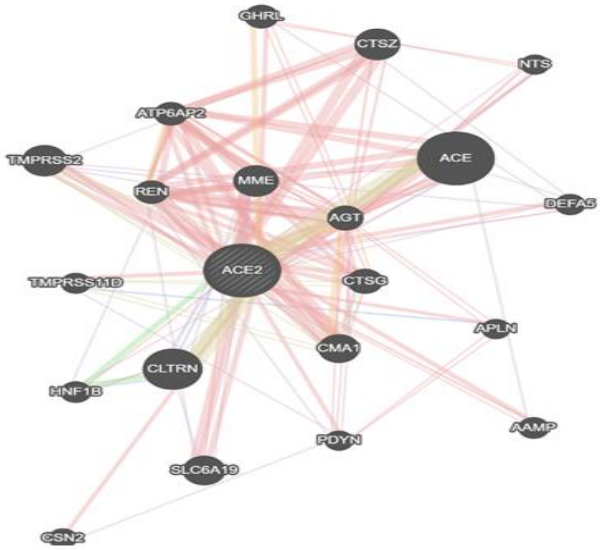
3.13 Aday Rekombinant Ace2'ler için Transmembran Sarmal Sayısı ve Alerjinitesinin İncelenmesi

Transmembran sarmal sayısının tahmini için TMHMM Server v. 2.0 kullanıldı. Ayrıca oluşturulan bu rekombinant aday Ace2'lerin alerjenitesinin tahmini içinde AllerTOPv.2.0 aracı kullanıldı [67,68].

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Ace2 Genin Etkileşim İçinde Olabileceği Genlerin Tespiti

GeneMANIA, zengin genomik verileri kullanarak işlevsel olarak benzer genleri bulmasının yanı sıra gen fonksiyonlarının tahminini de yapan algoritmaya sahiptir. Ace2'nin olası etkileşim içinde olabileceği genler bu aracın kullanımı sonucu Şekil 6'da gösterilmiştir. Tahmin edilen etkileşimlerde renkler farklı anlamlar içermektedir. Buradaki etkileşimleri gösteren renkler; fiziksel etkileşim (açık pembe), tahmini etkileşimleri(sarı), birlikte eksprese edilen genlerin olası etkileşimleri (mor), genetik olarak etkileşimleri(yeşil), yolaklar(pathway) üzerinde etkileşimler ve ortak domain bulunan etkileşimlere göre Şekil 4.1 oluşturulmuştur, olası çalışmalarda bu etkileşimler dikkate alınabilir [52,53]. Genemania'ya göre Ace2 geni 21 farklı gen ile yüksek düzeyde birbiriyle etkileşim içinde olabileceği Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Genemania, Ace2'nin olası etkileşimlerini bulurken tüm gen baz alındığı için Ace2'nin eksprese edildiği yerlerle sınırlı değildir, bu yüzden protein-protein etkileşiminde tercih edilmemiştir [52].



Şekil 4.1 ACE2'nin etkileşim içinde olduğu genlerin etkileşimin gösterimi. Tüm veriler Genemania veri tabanından alınmıştır.(TMPRSS2 Transmembran proteaz, serin 2, ATP6AP2 ATPase H taşıyan lizozomal aksesuar protein 2,MME; Membran Metalloendopeptidaz)

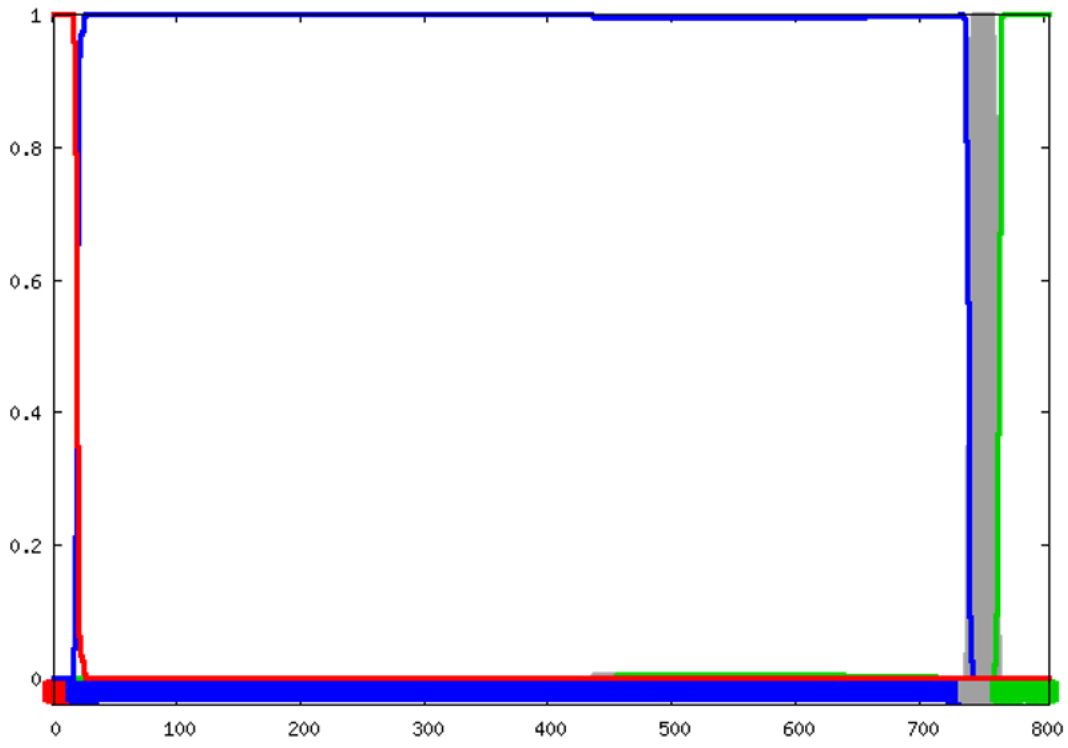
4.2 Ace2'nin FASTA'sının Alınması ve Gösterilmesi

FASTA formatı nükleotit yada protein sekansı (dizisi) içeren bir metin dosyasıdır [54]. Ace2'in protein sekansını içeren FASTA'sı oldukça önem arz etmektedir çünkü kullanılacak tüm biyoinformatik araçlarda bu protein sekansını içeren FASTA kullanılacaktır. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi ,National Center for Biotechnology Information(NCBI), veri tabanı kullanılarak Ace2'nin protein sekansını içeren FASTA'sı alınmıştır ve şu şekildedir [54];

>NP_001358344.1 angiotensin-converting enzyme 2 [Homo sapiens]
MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEEN
VQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKS
KRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRS
EVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIED
VEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLT
VPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPG
NVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLL
RNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLP
FTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFH
VSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGK
SEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSI
KVRISLKSALGDKAYEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVAN
LKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPP
NQPPVSIWLIVFGVVMGVIVVGIVILIFTGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPG
FQNTDDVQTSF

4.3 Ace2 Reseptörünün Transmembran Topolojisinin ve Sinyal Peptitlerin Yerlerinin Gösterimi

Phobius, bir proteinin amino asit dizisinden transmembran topolojisinin ve sinyal peptitlerinin tahmini için bir programdır ve bu program kullanılarak Ace2'nin transmembran topolojisinin ve sinyal peptitlerinin yerleri belirlenmiştir ve Şekil4.2'de gösterilmiştir. Sonuca göre özellikle sitoplazmaya dahil olan Ace2'ye ait amino asitler 700. amino asitten sonrasında tahmin edilmiştir [55], bu yüzden bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar sitoplazmaya dahil olmaması(Şekil 4.2) çalışmamızın güvenirliğini artırmaktadır. Bir transmembran proteinin topolojisi, protein tarafından işgal edilen biyolojik zarın iç veya dış taraflarına göre membranı kapsayan polipeptit zincirinin N- ve C-terminallerinin konumlarını ifade eder [55,58].



Şekil 4.2 ACE2'nin amino asit dizileri kullanılarak transmembran topolojisinin ve sinyal peptitlerinin tahmini.(Gri renk: transmembranı, yeşil renk: sitoplazmik kısmı, sakx mavisi: sitoplazmik olmayan kısmı ve kırmızı renk: sinyal veren peptitleri göstermektedir

4.4 Ace2 Reseptörüne Yönelik Düzensizlik ve yapılanmamış Yerlerin Tespiti

Ace2'nin FASTA'sı (NCBI Referans Sırası: NP_068576.1) alınarak ve DisEMBL hesaplama aracında kullanılarak Ace2'yi oluşturan amino asitlerin pozisyonların, bu proteinin yapısının düzenlenmesinde ve yapılanmasında etkin olup olmadığının (düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgelerini) tahmini yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.1 de gösterilmiştir. DisEMBL aracı ilgili düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgelerin tahminini yaparken birden çok algoritmayı baz alır çünkü düzensizliğin net bir tanımı yoktur. Bunlar; Döngüler/bobinler algoritmasına göre düzensizlik tanımı , Sıcak Döngüler algoritmasına göre düzensiz tanımı ve Remark-465'e göre Düzensizlik tanımıdır [57]. Tüm bu algoritmalar tanımına göre ortak tespit edilen düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgeler tespit edildi ve koyu renk ile vurgulandı(Tablo 4.1). Bu ortak yerler GSSVLSE(NP_068576.1 üzerinde 104-110) ve DRKKKNKARS(NP_068576.1 üzerinde 767-777) şeklindedir (Tablo 4.1) . Buradaki amaç algoritmalara bağlı ortak bölgeler bularak, bulunan bölgeleri bir temele dayandırmak ve diğer tüm pozisyonlara neden bakılmadığının da tahmin dayanağının olduğunu göstermektir. Yani tahmin edilen(Tablo 4.1) ve kullanılacak olan GSSVLSE(NP_068576.1 üzerinde 104-110) ve DRKKKNKARS(NP_068576.1 üzerinde 767-777) biyoinformatik temellendirmeyle tespit edilmiş oldu.

Tablo 4.1 disEMBL aracı tarafından ACE2 reseptörüne yönelik bulunan ve ortak olan düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgelerin gösterimi. Bu ortak bölgeler, hem konum hem de diziler siyah renkle vurgulanmıştır

Kullanılan Biyoinformatik Araç	**Tahmin Edilen Aralıklar**	**Tüm Aralıklarda Ortak Bölge**
DisEMBL 1. Döngüler/bobinler tanımına göre düzensizlik 2. Hot-lops tanımına göre düzensizlik 3. Remark-465 tanımına göre düzensizlik	1. **103-111,** 128-151, 194-223, 250-267, 280-295, 317-357, 387-400, 410-432, 464-472, 487-511, 533-547, 559-567, 575-588, 594-615, 627-640, 668-698, 714-740, **766-805** 2. **104-113,** 683-700, **762-805** 3. **101-110, 767-777**	**GSSVLSE(104-110)** **DRKK KNKARS(767-777)**

4.5 Ace2 Reseptöründeki Olası Mutasyon veya Silinmelerin Ace2'nin Biyolojik Fonksiyonuna Nasıl Etki Edebileceğinin Tahminlerinin Yapılması

Tablo 4.1'de elde edilen ve DisEMBL aracının tüm lagoritmalarının sonucunda ortak elde edilen düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgeler G104-L108, 767-777 arasındaki bölgelerin olabileceği tespit edilmişti. Tespit edilen bu bölgelerdeki amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin o proteinin olası mutasyonlarının etkisi açısından bilinmesi gerekir. Bu amaçla PROVEAN Programı kullanıldı çünkü bu programın avantajı sahip olduğu algoritmayla amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu nasıl etkilediğinin tahmini sonuçlarını vermesidir [58]. PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) aracındaki bir amino asidin değişiminin olması ya da mutasyonun olması durumunda proteinin biyolojik işlevini etkileyip etkilemediğini tahmin etmek için kullanıldı [58] ve Ace2'nin protein düzeyinde FASTA'sı kullanılmıştır. Olası mutasyonlar GSSVLSE (NP_068576.1 üzerinde 104-110 aralığındaki amino asitler) ve DRKKKNKARS (NP_068576.1 üzerinde 767-777 aralığındaki amino asitler) bölgelerindeki amino asitlerin tümü tek tek nokta mutasyona uğratıldı ve

sonuçlar Tablo4.2'de gösterilmektedir. PROVEAN aracının sonucuna göre eğer çıkan skor -2.5'e eşit veya daha düşük çıkarsa varyantlar “zararlı” olarak kabul edilir. Diğer taraftan elde edilen skor -2.5'in üzerinde puan alan varyantlar “nötr” olarak kabul edilir [58] Sonuçlara göre G104X (X:G hariç tüm amino asitleri temsil eder) ve L108X (X:L hariç tüm amino asitleri temsil eder) noktalarının Ace2 proteininin biyolojik fonksiyonunun üzerinde zararlı sonuçlara yol açacağı tahmin edilmiştir. Tüm bu zararlı sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmektedir.. Hem G104X (X:G hariç tüm amino asitleri temsil eder) hem de L108X (X:L hariç tüm amino asitleri temsil eder) noktalarının tüm sonuçları -2.5'ten daha az tahmin edildi (Tablo 2). En düşük G104L sonucu -6.606, maksimum G104D sonucu -2.955'tir. Ayrıca, L108 için minör sonuç -6.815(L108G), maksimum sonuç ise -2.955 (L108V) (Tablo4. 2). Muhtemel mutasyonların sonuçlarına ek olarak, hem G104 hem de L108 noktalarındaki olası bir delesyonun Ace2 proteininin biyolojik fonksiyonu üzerinde zararlı olacağı öngörülmüştür. L108del'in sonuçları -9.391, G104del'in sonucu -9.872'dir. K769del, K770del, K771del, N772del, K773del, A774del, R775del, S776del, G777del olası delesyonlarda sonuçları zararlı olmadığı, kalan diğer tüm delesyonların ise zararlı olduğu tahmin edildi (Tablo 4.2). En zararsız sonuç G777del (skor:-0,343) iken, en zararlı sonuç G104del (skor:-9,872) olarak tahmin edildi. Diğer pozisyona ait tahmin edilen tüm zararlı sonuçlar Tablo 4.2'de siyah renkle vurgulanmıştır. Bu sonuçlar ile hem disEMBL hem de PROVEAN aracına göre G104 ve L108 bölgeleri üzerinde devam edilmesi gereken bölgeler olarak tespit edilmiş oldu.

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin (ACE-2:NP_068576.1) tahmin edilmesi. GSSVLSE(NP_068576.1 üzerinde 104-110) ve DRKKKNKARS(NP_068576.1 üzerinde 767-777) Tablo4.1'deki veriler baz alınmıştır. Tahmin edilen tüm zararlı sonuçlar ve silme sonuçları siyah renkle vurgulanmıştır

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	**G104S**	**-3.368**	**Zararlı**	**G104L**	**6.606**	**Zararlı**
Provean	V107S	-0.858	Doğal	**S105L**	**-3.076**	**Zararlı**
Provean	**L108S**	**-4.844**	**Zararlı**	**S106L**	**-2.707**	**Zararlı**
Provean	E110S	-0.646	Doğal	V107L	-1.311	Doğal
Provean	D767S	-1.682	Doğal	**S109L**	**-3.396**	**Zararlı**
Provean	R768S	-1.798	Doğal	E110L	-2.442	Doğal
Provean	K769S	-1.360	Doğal	**D767L**	**-3.017**	**Zararlı**
Provean	K770S	-1.672	Doğal	R768L	-2.135	Doğal
Provean	K771S	-1.239	Doğal	K769L	-2.254	Doğal
Provean	N772S	-0.337	Doğal	K770L	-2.350	Doğal
Provean	K773S	-0.632	Doğal	K771L	-1.654	Doğal
Provean	A774S	-0.227	Doğal	N772L	-1.151	Doğal
Provean	R775S	-0.207	Doğal	K773L	-1.225	Doğal
Provean	G777S	0.650	Doğal	A774L	-0.860	Doğal
Provean	G104K	**-4.643**	**Zararlı**	R775L	-0.589	Doğal
Provean	V107K	-2.206	Doğal	S776L	-0.671	Doğal
Provean	L108K	**-4.753**	**Zararlı**	G777L	-0.120	Doğal
Provean	S109K	-1.408	Doğal	S105G	-2.303	Doğal
Provean	E110K	-1.156	Doğal	S106G	-1.298	Doğal

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	D767K	1.923	Doğal	V107G	-2.067	Doğal
Provean	R768K	-0.734	Doğal	**L108G**	**-6.815**	**Zararlı**
Provean	N772K	-0.272	Doğal	S109G	-2.148	Doğal
Provean	A774K	-0.655	Doğal	E110G	-2.198	Doğal
Provean	R775K	0.106	Doğal	D767G	-1.986	Doğal
Provean	G777K	0.515	Doğal	R768G	-2.322	Doğal
Provean	**G104E**	**-3.648**	**Zararlı**	K769G	-1.775	Doğal
Provean	S105E	-1.736	Doğal	K770G	-2.031	Doğal
Provean	S106E	-2.176	Doğal	K771G	-1.520	Doğal
Provean	V107E	-2.206	Doğal	N772G	-0.939	Doğal
Provean	**L108E**	**-5.434**	**Zararlı**	K773G	-0.948	Doğal
Provean	S109E	-1.237	Doğal	A774G	-0.539	Doğal
Provean	E110E	0.000	Doğal	R775G	-0.500	Doğal
Provean	D767E	-0.800	Doğal	S776G	-0.472	Doğal
Provean	R768E	-1.646	Doğal	**G104T**	**-4.636**	**Zararlı**
Provean	K769E	-1.066	Doğal	S105T	-0.873	Doğal
Provean	K770E	-1.350	Doğal	S106T	-1.366	Doğal
Provean	K771E	-0.950	Doğal	V107T	-0.977	Doğal
Provean	N772E	-0.247	Doğal	**L108T**	**-4.238**	**Zararlı**
Provean	K773E	-0.149	Doğal	S109T	-1.334	Doğal

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	A774E	-0.269	Doğal	E110T	-1.022	Doğal
Provean	R775E	-0.144	Doğal	D767T	-2.034	Doğal
Provean	G777E	0.862	Doğal	R768T	-1.822	Doğal
Provean	**G104P**	**-4.863**	**Zararlı**	K769T	-1.749	Doğal
Provean	S105P	-2.210	Doğal	K770T	-1.981	Doğal
Provean	**S106P**	**-2.505**	**Zararlı**	K771T	-1.513	Doğal
Provean	V107P	-2.424	Doğal	N772T	-0.627	Doğal
Provean	**L108P**	**-5.773**	**Zararlı**	K773T	-0.976	Doğal
Provean	S109P	0.677	Doğal	A774T	-0.491	Doğal
Provean	E110P	-0.727	Doğal	R775T	-0.365	Doğal
Provean	D767P	-2.277	Doğal	S776T	-0.415	Doğal
Provean	R768P	-2.367	Doğal	G777T	0.271	Doğal
Provean	K769P	-1.946	Doğal	**G104V**	**-5.781**	**Zararlı**
Provean	K770P	-2.203	Doğal	**S105V**	**-2.900**	**Zararlı**
Provean	K771P	-1.778	Doğal	S106V	-2.087	Doğal
Provean	N772P	-0.831	Doğal	V107V	0.000	Doğal
Provean	K773P	-1.255	Doğal	**L108V**	**-2.710**	**Zararlı**
Provean	A774P	-0.683	Doğal	**S109V**	**-3.106**	**Zararlı**
Provean	R775P	-0.779	Doğal	E110V	-2.104	Doğal
Provean	G777P	0.065	Doğal	**D767V**	**-2.639**	**Zararlı**

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	**G104I**	**-6.405**	**Zararlı**	R768V	-2.244	Doğal
Provean	**S105I**	**-3.229**	**Zararlı**	K769V	-2.252	Doğal
Provean	**S106I**	**-2.674**	**Zararlı**	K770V	-2.435	Doğal
Provean	V107I	-0.606	Doğal	K771V	-1.725	Doğal
Provean	L108I	-1.828	Doğal	N772V	-1.146	Doğal
Provean	**S109I**	**-3.495**	**Zararlı**	K773V	-1.243	Doğal
Provean	**E110I**	**-2.656**	**Zararlı**	A774V	-0.720	Doğal
Provean	**D767I**	**-2.782**	**Zararlı**	R775V	-0.491	Doğal
Provean	R768I	-2.362	Doğal	S776V	-0.798	Doğal
Provean	**K769I**	**-2.547**	**Zararlı**	G777V	0.123	Doğal
Provean	**K770I**	**-2.741**	**Zararlı**	**G104M**	**-5.882**	**Zararlı**
Provean	K771I	-1.877	Doğal	S105M	-2.366	Doğal
Provean	N772I	-1.264	Doğal	S106M	-2.408	Doğal
Provean	K773I	-1.387	Doğal	V107M	-1.267	Doğal
Provean	A774I	-0.924	Doğal	L108M	-1.795	Doğal
Provean	R775I	-0.585	Doğal	**S109M**	**-2.569**	**Zararlı**
Provean	G777I	-0.064	Doğal	E110M	-2.008	Doğal
Provean	**G104H**	**-4.797**	**Zararlı**	**D767M**	**-2.697**	**Zararlı**
Provean	S105H	-2.381	Doğal	R768M	-1.790	Doğal
Provean	**S106H**	**-3.091**	**Zararlı**	K769M	-1.817	Doğal

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	**V107H**	**-2.902**	**Zararlı**	K770M	-1.885	Doğal
Provean	**L108H**	**-5.866**	**Zararlı**	K771M	-1.363	Doğal
Provean	S109H	-2.408	Doğal	N772M	-0.699	Doğal
Provean	E110H	-1.894	Doğal	K773M	-0.919	Doğal
Provean	D767H	-1.866	Doğal	A774M	-0.765	Doğal
Provean	R768H	-1.793	Doğal	R775M	-0.410	Doğal
Provean	K769H	-1.430	Doğal	S776M	-0.462	Doğal
Provean	K770H	-1.945	Doğal	G777M	0.196	Doğal
Provean	K771H	-1.354	Doğal	**G104F**	**-6.098**	**Zararlı**
Provean	N772H	-0.563	Doğal	**S105F**	**-3.539**	**Zararlı**
Provean	K773H	-0.885	Doğal	**S106F**	**-3.327**	**Zararlı**
Provean	A774H	-0.955	Doğal	V107F	-2.467	Doğal
Provean	R775H	-0.618	Doğal	**L108F**	**-3.621**	**Zararlı**
Provean	G777H	0.311	Doğal	**S109F**	**-3.937**	**Zararlı**
Provean	**G104R**	**-4.900**	**Zararlı**	**E110F**	**-3.135**	**Zararlı**
Provean	S105R	-1.060	Doğal	**D767F**	**-2.986**	**Zararlı**
Provean	**S106R**	**-2.574**	**Zararlı**	**R768F**	**-2.687**	**Zararlı**
Provean	**V107R**	**-2.525**	**Zararlı**	**K769F**	**-2.614**	**Zararlı**
Provean	**L108R**	**-4.953**	**Zararlı**	**K770F**	**-2.771**	**Zararlı**
Provean	S109R	-2.281	Doğal	K771F	-1.673	Doğal

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	E110R	-1.694	Doğal	N772F	-1.214	Doğal
Provean	D767R	-2.320	Doğal	K773F	-1.447	Doğal
Provean	K769R	-0.360	Doğal	A774F	-1.122	Doğal
Provean	K770R	-0.669	Doğal	R775F	-0.978	Doğal
Provean	K771R	-0.638	Doğal	S776F	-0.740	Doğal
Provean	N772R	-0.410	Doğal	G777F	-0.095	Doğal
Provean	K773R	-0.398	Doğal	**G104W**	**-5.638**	**Zararlı**
Provean	A774R	-0.712	Doğal	**S105W**	**-4.037**	**Zararlı**
Provean	G777R	0.219	Doğal	**S106W**	**-4.204**	**Zararlı**
Provean	**G104Q**	**-4.358**	**Zararlı**	**V107W**	**-3.864**	**Zararlı**
Provean	S105Q	-1.503	Doğal	**L108W**	**-5.385**	**Zararlı**
Provean	S106Q	-2.210	Doğal	**S109W**	**-4.463**	**Zararlı**
Provean	V107Q	-2.206	Doğal	**E110W**	**-3.686**	**Zararlı**
Provean	**L108Q**	**-4.819**	**Zararlı**	**D767W**	**-2.935**	**Zararlı**
Provean	S109Q	-1.460	Doğal	**R768W**	**-2.822**	**Zararlı**
Provean	E110Q	-0.750	Doğal	K769W	-2.391	Doğal
Provean	D767Q	-1.632	Doğal	**K770W**	**-2.696**	**Zararlı**
Provean	K769Q	-1.029	Doğal	K771W	-1.887	Doğal
Provean	K770Q	-1.194	Doğal	N772W	-1.288	Doğal
Provean	K771Q	-1.026	Doğal	K773W	-1.393	Doğal

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	N772Q	-0.199	Doğal	A774W	-1.115	Doğal
Provean	K773Q	-0.209	Doğal	R775W	-1.060	Doğal
Provean	A774Q	-0.440	Doğal	S776W	-0.975	Doğal
Provean	R775Q	-0.002	Doğal	G777W	-0.368	Doğal
Provean	G777Q	0.499	Doğal	**G104A**	**-3.809**	**Zararlı**
Provean	**G104D**	**-2.955**	**Zararlı**	S105A	-1.180	Doğal
Provean	S105D	-2.124	Doğal	S106A	0.838	Doğal
Provean	**S106D**	**-2.559**	**Zararlı**	V107A	0.739	Doğal
Provean	**V107D**	**-2.833**	**Zararlı**	**L108A**	**-4.238**	**Zararlı**
Provean	**L108D**	**-6.508**	**Zararlı**	S109A	-1.448	Doğal
Provean	S109D	-0.953	Doğal	E110A	-0.903	Doğal
Provean	E110D	-0.659	Doğal	D767A	-2.293	Doğal
Provean	D767D	0.000	Doğal	R768A	-1.702	Doğal
Provean	K769D	-1.751	Doğal	K769A	-1.677	Doğal
Provean	K770D	-1.919	Doğal	K770A	-1.959	Doğal
Provean	K771D	-1.430	Doğal	K771A	-1.569	Doğal
Provean	N772D	-0.461	Doğal	N772A	-0.733	Doğal
Provean	K773D	-0.677	Doğal	K773A	-1.003	Doğal
Provean	A774D	-0.533	Doğal	A774A	0.000	Doğal
Provean	R775D	-0.624	Doğal	R775A	-0.345	Doğal

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	G777D	0.790	Doğal	S776A	-0.307	Doğal
Provean	**G104N**	**-3.275**	**Zararlı**	G777A	0.386	Doğal
Provean	S105N	-1.381	Doğal	**G104C**	**-6.287**	**Zararlı**
Provean	S106N	-2.369	Doğal	**S105C**	**-2.958**	**Zararlı**
Provean	V107N	-2.385	Doğal	S106C	-2.063	Doğal
Provean	**L108N**	**-5.767**	**Zararlı**	V107C	-1.597	Doğal
Provean	S109N	-1.249	Doğal	**L108C**	**-4.505**	**Zararlı**
Provean	E110N	-1.184	Doğal	**S109C**	**-3.216**	**Zararlı**
Provean	D767N	-1.180	Doğal	**E110C**	**-2.939**	**Zararlı**
Provean	R768N	-1.654	Doğal	**D767C**	**-2.974**	**Zararlı**
Provean	K769N	-1.337	Doğal	**R768C**	**-2.593**	**Zararlı**
Provean	K770N	-1.576	Doğal	**K769C**	**-2.584**	**Zararlı**
Provean	K771N	-0.935	Doğal	**K770C**	**-2.729**	**Zararlı**
Provean	N772N	0.000	Doğal	K771C	-2.101	Doğal
Provean	K773N	-0.551	Doğal	N772C	-1.364	Doğal
Provean	A774N	-0.759	Doğal	K773C	-1.536	Doğal
Provean	R775N	-0.460	Doğal	A774C	-0.845	Doğal
Provean	S776N	-0.189	Doğal	R775C	-0.795	Doğal
Provean	G777N	0.829	Doğal	S776C	-0.947	Doğal
Provean	**G104del**	**-9.872**	**Zararlı**	G777C	-0.249	Doğal

Tablo 4.2 PROVEAN aracı ile bir amino asidin ikamesinin veya silinmesinin proteinin biyolojik fonksiyonunu etkileyip etkilemediğinin tahmin edilmesinin gösterimi(devamı)

Biyoinformatik Araç	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**	**Varyant**	**Skor**	**Sonuç**
Provean	**S105del**	**-8.259**	**Zararlı**	**G104Y**	**-5.964**	**Zararlı**
Provean	**S106del**	**-8.259**	**Zararlı**	S105Y	-3.177	**Zararlı**
Provean	**V107del**	**-7.841**	**Zararlı**	**S106Y**	**-3.356**	**Zararlı**
Provean	**L108del**	**-9.391**	**Zararlı**	V107Y	-2.491	Doğal
Provean	**S109del**	**-8.394**	**Zararlı**	L108Y	-4.436	**Zararlı**
Provean	**E110del**	**-8.128**	**Zararlı**	**S109Y**	**-3.516**	**Zararlı**
Provean	**D767del**	**-4.631**	**Zararlı**	**E110Y**	**-2.727**	**Zararlı**
Provean	**R768del**	**-3.193**	**Zararlı**	**D767Y**	**-2.763**	**Zararlı**
Provean	K769del	-2.450	Doğal	R768Y	-2.280	Doğal
Provean	K770del	-2.450	Doğal	K769Y	-2.172	Doğal
Provean	K771del	-2.450	Doğal	K770Y	-2.379	Doğal
Provean	N772del	-2.018	Doğal	K771Y	-1.409	Doğal
Provean	K773del	-1.691	Doğal	N772Y	-1.038	Doğal
Provean	A774del	-1.436	Doğal	K773Y	-1.011	Doğal
Provean	R775del	-1.089	Doğal	A774Y	-0.928	Doğal
Provean	S776del	-0.829	Doğal	R775Y	-0.797	Doğal
Provean	G777del	-0.343	Doğal	S776Y	-0.308	Doğal
				G777Y	0.093	Doğal

4.6 Ace2 Reseptörünün Olası G104 ve L108 Mutasyonlara Karşı Stabilitesinin Tahmini Değişimlerinin Tespiti

Hem Tablo 4.1 DisEMBL aracının algoritmalarında ortak bulunan noktların olması hem de Tablo 4.2'deki PROVEAN tahmini sonuçlara göre G104 ve L108 noktalarında oluşabilecek tüm olası mutasyon/delesyonlarda sonuçların Ace2 proteinin biyolojik işlevini etkilediği tespit edilmiştir. Bu yüzden bu sınırlı bölgelerle devam edilmiştir. Ayrıca bu iki tablonun ortak sonuçlarının kullanılması Tablo4.3 ve Tablo4.4'te daha yüksek olasılıkta geçerli değerlerin çıkması muhtemeldir. Çünkü sonuçta biyoinformatik algoritmalara dayalı bir bilim dalı ve ne kadar tutarlı sonuçlar çıkarsa güvenirliği de o derece kuvvetli olacaktır.. Bu bölgelerdeki olası mutasyon/delesyonların Ace2 proetinin stabilitesi üzerinde etkili olup olmadığı da önemlidir. Bu yüzden, bu bölgelere ait olası mutasyon sonuçlarına dayalı protein stabilite değişikliklerinin izlenmesi ve tahminin yapılması için I-Mutant2.0 aracı kullanıldı.Bu araç tek nokta mutasyonları üzerine protein stabilite değişikliklerinin otomatik tahmini için destek vektör makinesi (SVM) tabanlı bir araçtır. I-Mutant2.0 tahminleri, ya protein yapısından ya da daha da önemlisi protein dizisinden başlayarak gerçekleştirilir [59]. Bu araçta Ace2'nin protein düzeyinde FASTA'sı kullanılmıştır. Tüm sonuçlar Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Sonuçlara göre G104 bölgesinde olası mutasyonlar proteinin stabiltesini hem olumlu hem de olumsuz etkileyebilmektedir (Tablo4.3). G104I, G104A, G104P, G104M, G104Y, G104I, G104N, G104L, G104E tahmini sonuçlar stabilteyi artırmaya yönelik iken G104S, G104D, G104R, G104W, G104T, G104F, G104H, G104Q, G104K, G104C sonuçları stabiliteyi azaltmaya yönelik skorlar öngörülmüştür(Tablo4.3).Bunun tam aksine L108 pozisyonundaki Lösin için durum böyle değildi çünkü öngörülen tüm sonuçlar proteinin stabilitesini olumusuz yönde etkileyebileceği öngörüldü. G104 bölgesinde hem stabilte değerlerinin güvenirlik indeksleri düşük ve değişkenlik varken L108 bölgesinde bu değerler oldukça net ve yüksek çıkmıştır (Tablo4.3).

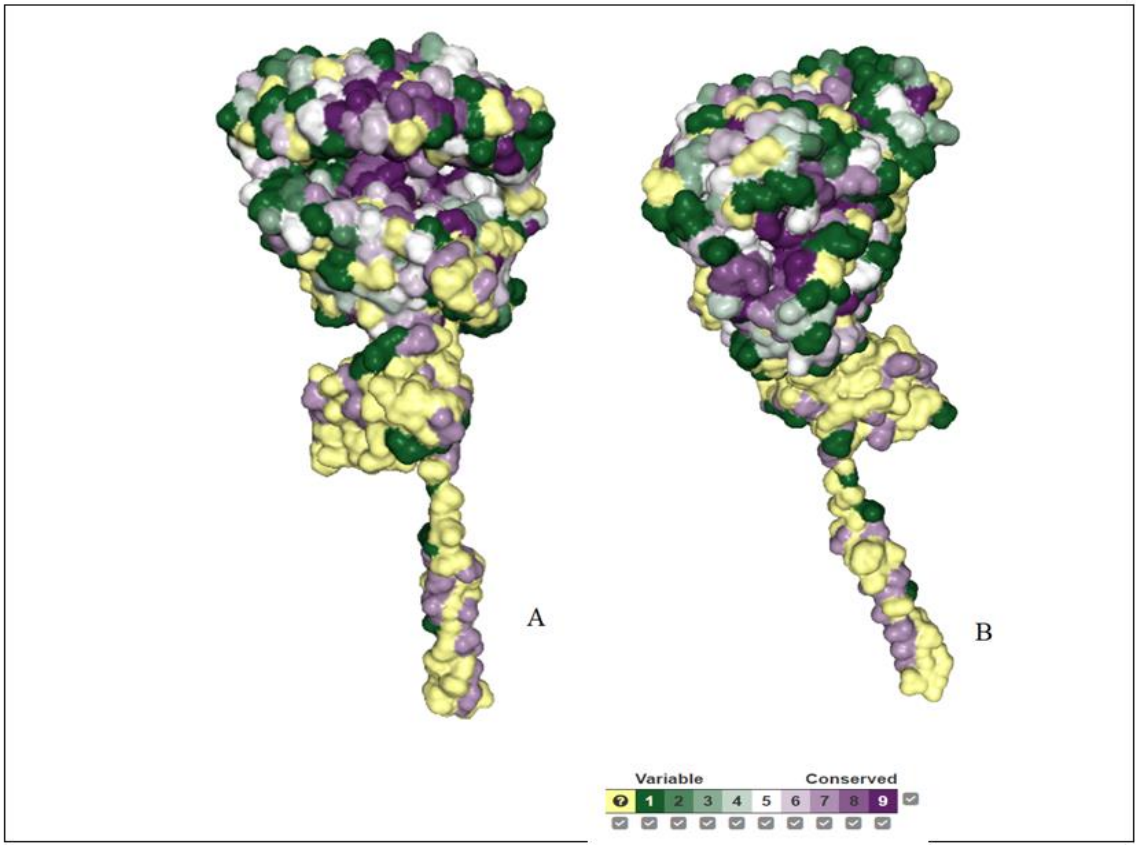
Tablo 4.3 I-Mutant2.0 tarafından tahmin edilen tek bölgeli mutasyon sonuçlarına göre protein stabilitesi değişikliklerinin tahmini. (RI: Güvenilirlik İndeksi) I-Mutant2'de Santigrat derece cinsinden sıcaklık 25 ve pH(-log[H+]) 7 olarak ayarlandı

Kullanılan araç	Variant	Stabilitesi	Güvenilirlik İndeksi	Variant	Stabilitesi	Güvenilirlik İndeksi
I-Mutant2.0	G104S	Azaldı	5	G104C	Azaldı	0
	G104A	Arttı	3	G104P	Arttı	1
	G104D	Azaldı	1	G104M	Arttı	1
	G104R	Azaldı	3	G104Y	Arttı	1
	G104W	Azaldı	2	G104L	Arttı	0
	G104I	Arttı	4	G104K	Azaldı	4
	G104N	Arttı	0	G104Q	Azaldı	2
	G104T	Azaldı	5	G104V	Arttı	2
	G104F	Azaldı	1	G104H	Azaldı	5
	G104E	Arttı	5	L108A	Azaldı	8
	L108F	Azaldı	6	L108C	Azaldı	7
	L108D	Azaldı	7	L108M	Azaldı	6
	L108S	Azaldı	9	L108P	Azaldı	5
	L108R	Azaldı	8	L108W	Azaldı	4
	L108G	Azaldı	9	L108Y	Azaldı	4
	L108I	Azaldı	6	L108T	Azaldı	8
	L108V	Azaldı	8	L108H	Azaldı	8
	L108K	Azaldı	9	L108Q	Azaldı	8
	L108N	Azaldı	7	L108E	Azaldı	6

4.7 Ace2 Reseptörünün Korunmuş Bölgelerinin Tespitinin Yapılması

ConSurf, homolog diziler arasında amino/nükleik asit ikamelerinin evrimsel dinamiklerini analiz ederek makromoleküllerdeki fonksiyonel bölgeleri ortaya çıkarmak için yaygın olarak kullanılan bir araçtır. ConSurf, amino/nükleik asitlerin evrimsel oranlarını tahmin eder ve bunları sorgu makromolekülünün dizisi ve/veya yapısı ile eşleştirir. Bu araç kullanılarak Ace2'nin olası tüm bölgelerine bakıldı ve sonuç Şekil 4.3'te gösterilmiştir [60]. G104 ve L108 bölgeleri, Ace2 (NP_068576.1) proteininin herhangi bir korunmuş amino asidine

ait olmadığı ConSurf Server kullanılarak tahmin edildi (Şekil 9). G104 ve L108 arasındaki korunmuş bölge skorları sonuçları G(skor:1),S(skor:9),L(skor:3), V(skor:8),N(skor:7), Q(skor:7). ConSurf Server'a göre maksimum puan 9 iken ve skor artıkça korunmuş bölge olma ihtimalide yükselmektedir [60]. Ayrıca, G104 (skor:1) en değişime açık amino asittir ve L108 amino asidi (3-4 arası puana sahip) de korunan bölgeden uzak bir skora sahiptir(Şekil 4.3). Ace-2'nin hem de ön(A) hem de hem arka yüzü(B) gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Ace2 proteinin korunmuş bölgelerin tespitinin ConSurf Server kullanılarak tahmin edilmesi. (A) Ace2'nin üç boyutlu yapısı üzerinde yerlerin tespiti iken (B) Ace2'nin 180 derece döndülmüş halini temsil etmektedir. Skor tablosu verilmiş ve bu sonuçlara göre G104-L108 arasında G104 (1), L108(3)

4.8 Ace2 Reseptörünün G104 ve L108 Noktalarındaki Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonlarla ile Doğal yapısının Boyut, Yük, Hidrofobiklik Bakımından Karşılaştırılması

HOPE, bir protein dizisindeki nokta mutasyonunun yapısal etkilerini analiz eden, kullanımı kolay bir web hizmetidir. Protein dizisini ve mutasyonu girildiğinde, HOPE bir dizi web hizmetinden ve veri tabanından mevcut bilgileri toplayıp, birleştirip, bize sonuçları verecektir [61]. Tüm sonuçlar Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Her amino asidin kendine özgü boyutu, yükü ve hidrofobiklik değeri vardır. Doğal ve olası mutasyonlarda genellikle bu özellikler farklılık gösterir [61]. disEMBL aracıyla tahmin edilen ortak noktada bulunan, PROVEAN aracıyla Ace2'nin biyolojik aktivitesinde rol oynayan ve I-Mutant 2.0 ile de Ace2'nin stabilitesinde rol oynayan G104 ve L108 noktalarındaki olası mutasyonlar HOPE aracıylada değişimdeki amino asidin kendine özgü boyutu, yükü ve hidrofobiklik gibi özelliklerin değişimine bakıldı. G104 ve L108 bölgelerine ait 20 farklı amino asit değişim sonuçlarının olası etki tahminleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4 Hope aracından elde edilen doğal tip ve mutant tip amino asit (ACE-2: NP_068576.1)) özelliklerinin sonuçları. [a]HOPE aracına göre sonuç elde edilemedi.(0:Nötr, +:Pozitif, -, Negatif)

Varyant	Doğal Amino Asit			Varyant Değişimi Sonucu Oluşmuş Amino Asit				
	Boyut	Yük	Hidrofobiklik	Boyut	Yük	Hidrofobiklik	Mutant Kalıntı Çarpmalara neden olu mu?	Protein korunmasında etkili mi
G104S	<	a	a	>	a	a	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104A	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104D	<	0	>	>	-	<	Muhtemel evet	**Muhtemel hayır**
G104R	<	0	>	>	+	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104W	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104I	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104N	<	a	>	>	a	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104T	<	a	a	>	a	a	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104F	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104E	<	0	>	>	-	<	Muhtemel evet	**Muhtemel hayır**
G104C	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104P	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104M	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104Y	<	a	a	>	a	a	Muhtemel evet	**Muhtemel hayır**
G104L	<	a	<	>	a	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104L	<	a	<	>	a	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104K	<	0	>	>	+	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104Q	<	a	>	>	a	<	Muhtemel evet	**Muhtemel hayır**
G104V	<	a	<	>	a	>	Muhtemel evet	Muhtemel evet
G104H	<	a	>	>	a	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108F	<	a	a	>	a	a	Olası Etkileşim Kaybı	**Muhtemel hayır**
L108D	<	0	>	>	+	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108S	>	a	>	<		<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108R	<	0	>	>	+	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108G	>	a	>	<	a	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108I	=	a	a	=	a	a	**Sonuç çıkmadı**	Muhtemel evet
L108V	>	a	a	<	a	a	Olası Etkileşim Kaybı	Muhtemel evet
L108K	<	0	>	>	+	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108N	<		>	>	a	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108A	>	a	a	<	a	a	Olası Etkileşim Kaybı	Muhtemel evet
L108C	>	a	a	<	a	a	Olası Etkileşim Kaybı	Muhtemel evet

Tablo 4.4 Hope aracından elde edilen doğal tip ve mutant tip amino asit (ACE-2: NP_068576.1)) özelliklerinin sonuçlarının devamı. [a]HOPE aracına göre sonuç elde edilemedi(0:Nötr, +:Pozitif, -, Negatif).(devamı)

Varyant	Doğal Amino Asit			Varyant Değişimi Sonucu Oluşmuş Amino Asit				
	Boyut	Yük	Hidrofobiklik	Boyut	Yük	Hidrofobiklik	Mutant Kalıntı Çarpmalara neden olu mu?	Protein korunmasında etkili mi
L108M	<	[a]		>	[a]	[a]	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108P	>	[a]	[a]	<	[a]	[a]	Olası Etkileşim Kaybı	Muhtemel evet
L108W	<	[a]	[a]	>	[a]	[a]	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108Y	<	[a]	>	>	[a]	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108T	>	[a]	>	<	[a]	<	Olası Etkileşim Kaybı	Muhtemel evet
L108H	<	[a]	>	>	[a]	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108Q	<	[a]	>	>	[a]	<	Muhtemel evet	Muhtemel evet
L108E	<	0	>	>	-	<	Muhtemel evet	**Muhtemel hayır**

Genelde sonuçlara göre olası mutant form protein yapısının korunmasında etkili olduğu yönünde çıkmıştır. Boyut (hacimsel olarak) ve sahip olduğu yüklerde değişime uğramış ya da sabit kalmıştır(Tablo4.4). L108S,L108G,L108I,L108V,L108A,L108C hariç, diğer tüm varyant kalıntıları, mutant tip kalıntıdan hacimsel olarak daha büyüktür (Tablo4.4). Hem mutant olan kalıntı hem de doğal olan kalıntı, L108I için birbirine eşittir, dolayısıyla sonucunda olası değişiklikler program tarafından gösterilemedi (Tablo4.4). L108S,L108G, L108V,L108A,L108C için mutant kalıntıları daha küçüktür, bu yüzden Ace2 proteini için etkileşim kaybına neden olabilir. Hidrofobikliğin özellikleri de bu araç tarafından tahmin edilmektedir [61] ve örneğimizin tüm hidrofobikliğin özellikleri Tablo4.4'te gösterilmiştir. Sonuçlar; mutant kalıntılarının doğal tip kalıntıdan daha fazla veya daha az hidrofobik olabileceği yorumlanamayacağı şeklinde sınıflandırılır (Tablo4.4). G104R, G104K, L108D, L108R, L108K doğal kalıntı yükü Nötr ve mutant tip kalıntı yükü Pozitif iken G104D, G104E, L108E doğal tip kalıntı yükü Nötr, mutant tip kalıntı yükü Negatif idi(Tablo4.4). Yabani tip kalıntı, tüm kalıntılar arasında en esnek olan glisin olduğunda, bu esneklik proteinin işlevi için gerekli olabilir. Bu özellik L108

konumu için bulunamadı. Bu glisinin mutasyonu, Hope aracının sonucuna göre proteinin işlevini ortadan kaldırabilir [60]. G104D, G104E, G104Y, G104Q, L108F, L108E dışında G104'e ait diğer varyantların tümü Ace2 protein korunmasına zarar vermez(Tablo4). G104D, G104E, G104Y, G104Q'nun ACE-2'ye zarar vermemesinin bulma nedeni, mutant kalıntının homolog dizilerde bu pozisyonda gözlenen diğer kalıntı türleri arasında olmasıdır. L108F, L108E, ACE-2 protein korumasına zarar vermez çünkü homolog proteinler, mutantımızla aynı kalıntı tipine sahiptir. Her ikisi de, bu mutasyonun bu pozisyonda meydana gelebileceği anlamına gelir, bu yüzden sonuç muhtemelen proteine zarar vermez yönünde tahmin edilmiştir [61].

4.9 Ace2 Reseptörünün G104 ve L108 Bölgelerindeki Olası Mutasyonlar Sonucu Oluşabilecek Kombinasyonların Tahmin Edilen Fiziko-Kimyasal Parametre Sonuçları

ProtParam, Swiss-Prot veya TrEMBL'de bulunan belirli bir protein veya kullanıcı tarafından girilen bir protein dizisi için çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelerin hesaplanmasına izin veren bir araçtır . Hesaplanan parametreler arasında moleküler ağırlık, teorik pI, amino asit kompozisyonu, atomik kompozisyon, tahmini yarı ömür, kararsızlık indeksi, alifatik indeks ve büyük hidropatisite (GRAVY) bulunmaktadır [62]. G108del, L108del olan iki protein dışında tüm Ace2'ler 805 amino asit sayısına sahiptir, bu iki amino asitte delesyon olduğu için 804 amino asit bulunmaktadır.

Tablo 4.5 Ace2'nin oluşturulan olası mutasyonların ExPASyProtParam tarafından tahmin edilen fiziko-kimyasal parametre sonuçları. [a]Normal, NP_068576.1'dir

Varyant	Molekül Ağırlığı	Teorik PI	Toplam negatif yüklü rezidü sayısı (Asp+ Glu)	Toplam pozitif yüklü rezidü sayısı (Arg+ Lys)	Tahmini yarı ömür (saat)			Kararsızlık indeksi (II)	Alipha tic index	GRAVY
					Memeli kırmızı kan hücreleri (in vitro)	Mantar (in vivo)	E.coli (in vivo)			
[a]Normal	92463.04	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.55	-0.375
G104S	92493.06	5.36	99	78	30	>20	>10	40.52/ stabil değil	80.55	-0.376
G104A	92477.06	5.36	99	78	30	>20	>10	40.28/ stabil değil	80.67	-0.372
G104D	92521.07	5.32	100	78	30	>20	>10	40.52/ stabil değil	80.55	-0.379
G104R	92562.17	5.41	99	79	30	>20	>10	40.82/ stabil değil	80.55	-0.380
G104W	92592.067	5.36	99	78	30	>20	>10	40.15 stabil değil	80.55	-0.376
G104I	92519.15	5.36	99	78	30	>20	>10	40.82/ stabil değil	81.03	-0.369
G104N	92520.09	5.36	99	78	30	>20	>10	40.28/ stabil değil	80.55	-0.379
G104T	92507.09	5.36	99	78	30	>20	>10	40.17/ stabil değil	80.55	-0.375
G104F	92553.16	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.55	-0.371
G104E	92535.10	5.32	100	78	30	>20	>10	40.52/ stabil değil	80.55	-0.379
G104C	92509.12	5.36	99	78	30	>20	>10	40.24/ stabil değil	80.55	-0.371
G104P	92503.10	5.36	99	78	30	>20	>10	40.48/ stabil değil	80.55	-0.377
G104M	92537.18	5.36	99	78	30	>20	>10	40.82/ stabil değil	80.55	-0.372
G104Y	92569.16	5.36	99	78	30	>20	>10	40.28/ stabil değil	80.55	-0.376
G104L	92519.15	5.36	99	78	30	>20	>10	40.28/ stabil değil	81.03	-0.370
G104K	92534.16	5.41	99	78	30	>20	>10	40.57/ stabil değil	80.55	-0.379
G104Q	92534.12	5.36	99	78	30	>20	>10	40.73/stabil değil	80.55	-0.379
G104V	92505.12	5.36	99	78	30	>20	>10	40.28/ stabil değil	80.91	-0.369
G104H	92543.13	5.40	99	78	30	>20	>10	40.28/ stabil değil	80.55	-0.379

Tablo 4.5 Ace2'nin oluşturulan olası mutasyonların ExPASyProtParam tarafından tahmin edilen fiziko-kimyasal parametre sonuçlarını (devamı)

Varyant	Molekül Ağırlığı	Teorik PI	Toplam negatif yüklü rezidü sayısı (Asp+ Glu)	Toplam pozitif yüklü rezidü sayısı (Arg+ Lys)	Tahmini yarı ömür (saat)			Kararsızlık indeksi (II)	Alip hatic index	GRAVY
					Memeli kırmızı kan hücreleri (in vitro)	Mantar (in vivo)	E.coli (in vivo)			
L108D	92464.08	5.32	100	78	30	>20	>10	40.14/ stabil değil	80.06	-0.384
L108S	92436.96	5.36	99	78	30	>20	>10	40.33/ stabil değil	80.06	-0.381
L108R	92506.07	5.41	99	79	30	>20	>10	40.64/stabil değil	80.06	-0.385
L108G	92406.93	5.36	99	78	30	>20	>10	**39.98/ stabil**	80.06	-0.380
L108I	92463.04	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.55	-0.374
L108V	92449.01	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.42	-0.375
L108K	92478.05	5.41	99	79	30	>20	>10	40.05/ stabil değil	80.06	-0.385
L108N	92463.98	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.06	-0.384
L108A	92420.96	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.19	-0.378
L108C	92453.02	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.06	-0.377
L108M	92481.07	5.36	99	78	30	>20	>10	40.64/ stabil değil	80.06	-0.377
L108P	92447.0	5.36	99	78	30	>20	>10	40.57/ stabil değil	80.06	-0.382

Tablo 4.5 Ace2'nin oluşturulan olası mutasyonların ExPASyProtParam tarafından tahmin edilen fiziko-kimyasal parametre sonuçlarını(devamı)

Varyant	Molekül Ağırlığı	Teorik PI	Toplam negatif yüklü rezidü sayısı (Asp+ Glu)	Toplam pozitif yüklü rezidü sayısı (Arg + Lys)	Tahmini yarı ömür (saat)			Kararsızlık indeksi (II)	Aliphatic index	GRAVY
					Memeli kırmızı kan hücreleri (in vitro)	Mantar (in vivo)	E.coli (in vivo)			
L108Y	92513.05	5.36	99	78	30	>20	>10	**40.0/stabil**	80.06	-0.381
L108T	92450.98	5.36	99	78	30	>20	>10	**39.98/stabil**	80.06	-0.381
L108H	92487.02	5.40	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.06	-0.384
L108Q	92478.01	5.36	99	78	30	>20	>10	40.64/ stabil değil	80.06	-0.384
L108E	92478.99	5.36	100	78	30	>20	>10	40.33/ stabil değil	80.06	-0.384
G104del	92405.99	5.36	99	78	30	>20	>10	40.31/ stabil değil	80.65	-0.375
L108del	92349.88	5.36	99	78	30	>20	>10	40.13/ stabil değil	80.16	-0.380
L108F	92497.05	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.09	-0.376
L108W	92536.09	5.36	99	78	30	>20	>10	40.09/ stabil değil	80.06	-0.381

Normal Ace2 proteini (NP_068576.1) molekül ağırlığı 92463.04kDa bulundu. Olası tüm senaryolar içinde en büyük molekül ağırlığına ~92592 kDa ile G104W sahip iken , tüm mutant ve normal içinde en düşük molekül ağırlığına ~92350 kDa ile L108del sahip olduğu tahmin edildi. Tüm sonuçlar Tablo 4.5'te

gösterilmektedir. Normal Ace2'nin teorik PI'si 5.36 olarak tahmin edildi. Diğer tüm Ace2'nin varyantları, delesyonları arsında da teorik PI değeri 5,32 ile 5,41 arasında olabileceği tespit edildi(Tablo 5). Normal ve varyant Ace2'lerin hepsi negatif yüklüydü (Tablo 4.5). Tahmini yarı ömürleri, Memeli retikülositindeki (in vitro) tüm proteinler için 30 saat, mayada > 20 saat (in vivo), E.coli'de >10 saat (in vivo) olarak ön gürüldü. L108G(39.98), L108Y(40.0) ve L108T(39.98) sonuçlarında kararsızlık indeksine göre kararlı çıkmış(Tablo4.5'te koyu renk ile vurgulanmıştır), diğer tüm sonuçlar karasızlık indeksine göre kararsız olarak belirlenmiştir. Protein için kararlı olmak ve karasız olmak proteinin stabil olasıyla ilgilidir [55,60]. Tablo 4.5'te olası değişimlerin(mutasyon ya da delesyon) Ace2'nin stabilitesin de oluşturabileceği sonuçlar gösterilmiştir. Alifatik indeks, amino asitlere radikal grubuna bağlanan değişken grupların düz/dallanmış yapıların bağlı olmasıdır [63]. Alifatik indeks, tüm varyant proteinler arasında 80.06 ile 81.03 arasında değişen önemli bir varyasyon gösterirken, normal olanın alifatik indeksi 80.55'te bulundu. Bununla birlikte, alifatik indeks 80.55 ve 80.06'nın genel ağırlıklı sonuçları bulundu (Tablo 4.5). Büyük ortalama hidropati (GRAVY) amino asitlerin hidrofobik olma eğilimini gösteren indekstir [63,64]. Ace2 için bu büyük ortalama hidropati değeri tüm varyantlarda negatif, normal olanın değeri -0.375 olarak bulundu. Diğer tüm GRAVY değerlerinin sonuçları -0.369 ile -0.384 arasındaydı (Tablo4.5). Bu tahmin edilen fiziko-kimyasal parametre sonuçları bize G104 ve L108 noktalarındaki olası mutasyon/delesyon sonuçlarında; Ace2'nin stabilitesinde etkili olabileceği, Ace2'nin alifatik indeksinde değişimleri etkileyebileceği, Ace2 üzerine olası in vitro ve in vivo çalışmalarında yarınlanma süresinde etkin olabileceği ve Ace2'nin hidropatisinde de rol oynayabilirliği açısından oldukça önem arz etmektedir.

4.10 G104 ve L108'deki Olası Mutasyonların Ace2 Reseptörü ve Spike Proteinin Kenetlenme(Docking) Tahmini Skorlarınına Etkisinin Bulunması ve Gösterilmesi

HDOCK, protein-protein etkileşiminde kullanılan ve geniş bir kullanım yelpazesine sahip bir modellemeye sahiptir [63]. Bu modelleme kullanılarak doğal ve olası varyantlı Ace2(NP_068576.1)'lerin spike protein(6VXX) ile etkileşimlerin olası sonuçları da ayrı ayrı incelenmiştir. İncelenme sonucunda en az on farklı kenetlenme(docking) sonucu elde edilmiş ve bu sonuçlar içinde ekzotermik enerjisi en iyi iki model seçilmiştir(Tablo 4.6). En iyi ve düşük skora sahip olan etkileşimin kenetlenme skoru -261,75 iken en düşük skora sahip olansa - 235.25 olarak tahmin edildi. Kenetleme de en düşük (ekzotermik değere) bakılır. Çünkü tepkimenin ekzotermik olaması kendiliğinden gerçekleşen bir tepkime olsuğunu gösterir. Bu yüzden düşük ekzotermik sonuçlar yüksek docking(kenetlenme) anlamına gelmektedir. Bu durum kenetlenmenin kendiliğinden gerçekleşme ihtimali olduğunu belirtir. Olası mutasyonlar/delesyonlar Ace2'nin stabilitesini, biyolojik aktivitesini, fiziksel ve kimyasal özellikleri değiştirdiği için(Tablo4.1-4.5) spike-Ace2(mutasyon ve delesyon olan) etkilşim skorların farklı çıkması muhtemeldir. Tüm olası sonuçlar Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

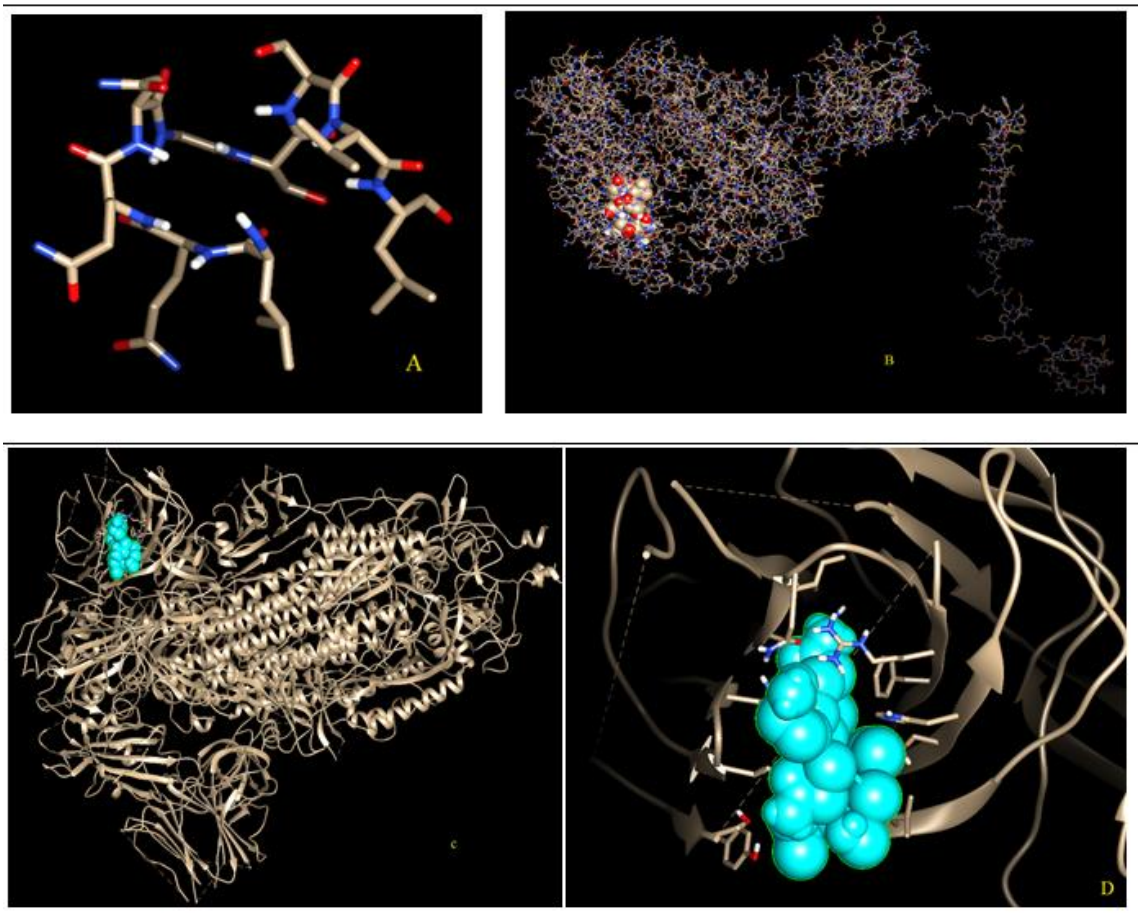
Tablo 4.6 Tahmin edilen modeller içinde en yüksek iki yerleştirme skoru (ACE-2 reseptörü ile spike protein arasında). HDOCK sunucusu tarafından elde edilmiştir. En düşük yerleştirme sonuçlarına sahip olanlar siyah ile vurgulanmıştır

Varyant	**Tahmin edilenler içinde en yüksek skora sahip iki tahmini yerleştirme puanarı**		**Varyant**	**Tahmin edilenler içinde en yüksek skora sahip iki tahmini yerleştirme puanarı**	
	İlk model sonucu	**İkinci model sonucu**		**İlk model sonucu**	**İkinci model sonucu**
Normal	-261.75	-247.04	Normal	-261.75	-247.04
G104S	-258.21	-253.13	L108F	-279.14	-248.37
G104A	**-234.30**	**-231.27**	L108D	-252.92	-245.59
G104D	-246.23	-245.81	L108S	-253.92	-253.01
G104R	-249.56	-231.95	L108R	-274.68	-242.54
G104W	-250.24	-239.80	L108G	-269.34	-237.52
G104I	-247.65	-246.44	L108I	-241.86	-239.13
G104N	-251.46	-245.32	L108V	-263.55	-245.52
G104T	-252.48	-243.87	L108K	-246.54	-245.02
G104F	-250.53	-241.69	L108N	-261.75	-247.04
G104E	-247.59	-243.56	L108A	-244.93	-234.17
G104C	-248.39	-245.50	L108C	-256.33	-229.17
G104P	-249.40	-247.01	L108M	-252.04	-251.34
G104M	-258.29	-244.11	L108P	-255.39	-240.77
G104Y	-258.41	-250.82	L108W	-260.16	-246.76
G104L	**-234.64**	**-232.41**	L108Y	-287.06	-227.04
G104K	-256.61	-244.67	L108T	-249.22	-247.40

Tablo 4.6 Tahmin edilen modeller içinde en yüksek iki yerleştirme skoru (ACE-2 reseptörü ile spike protein arasında). HDOCK sunucusu tarafından elde edilmiştir. En düşük yerleştirme sonuçlarına sahip olanlar siyah ile vurgulanmıştır(devamı)

Varyant	Tahmin edilenler içinde en yüksek skora sahip iki tahmini yerleştirme puanarı		Varyant	Tahmin edilenler içinde en yüksek skora sahip iki tahmini yerleştirme puanarı	
	İlk model sonucu	İkinci model sonucu		İlk model sonucu	İkinci model sonucu
G104V	-261.75	-247.04	L108Q	-246.83	-243.59
G104Q	-266.53	-240.84	L108H	-259.13	-251.41
G104H	-261.75	-247.04	L108E	-245.08	-239.35
G104del	-241.10	-240.87	L108del	-248.11	- 235.25

Ace2'ye ait G104-L108(GSSVLSE) arasındaki amino asitler kullanılarak ilgili bölümden oluşan peptidin üç boyutlu yapısı Şekil 8'de gösterilmiş, bu küçük peptidin(GSSVLSE) üç boyutlu yapısı 3Dpro tarafından elde edilmiştir [64]. Bu peptidin Ace2 üzerinde yer aldığı bölge de Şekil 4.4'te(B) gösterilmiştir. Chimera 1.15 uygulaması kullanılarak docking yapıldı ve gösterildi [62-64] ve sonuç Şekil 4.4'te(C) gösterilmiştir. Bu kenetlenme Şekil 4.4'te (D) daha da yakınlaştırılmıştır. GSSVLSE bölgelerindeki olası değişimlerin spike üzerinde reseptör bağlanma yerleriyle (RBD) kenetlenme skorların değişimi olasıdır ve Tablo 4.6'daki sonuçlar buna bir örnektir.

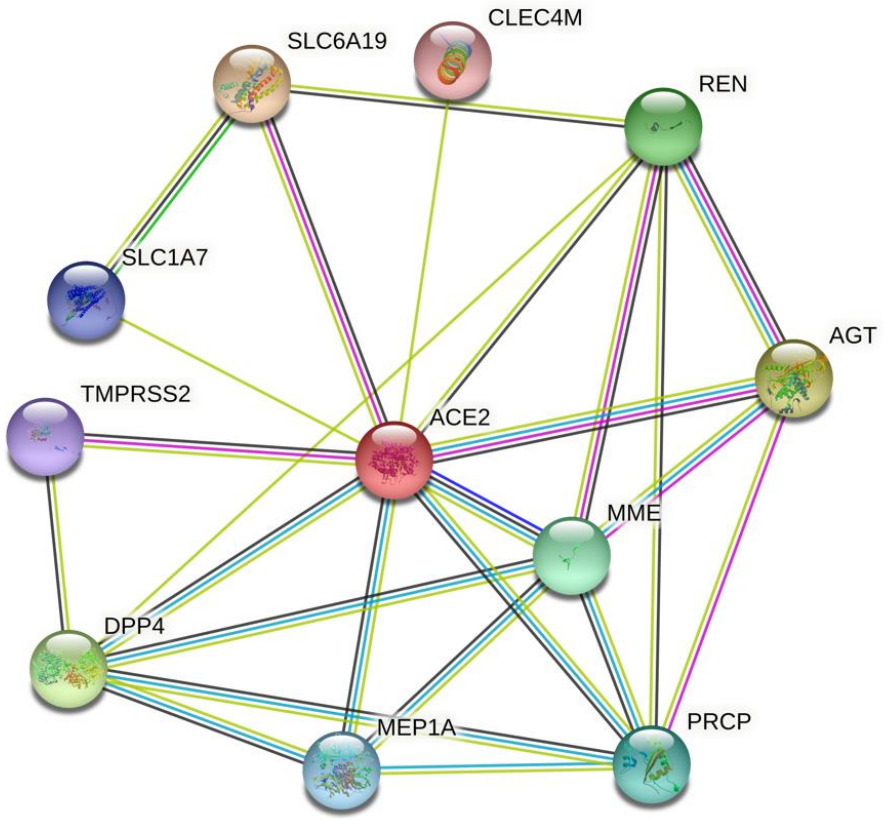


Şekil 4.4 (A) G104-L108 arasındaki bölgenin olası üç boyutlu yapısının tahmini ve 3Dpro kullanılarak elde edildi.**(B)** ilgili bölgenin Ace2 proteinin üzerindeki konumu **(C)** Bu bölgenin SARS CoV ile(pdb:6VXX) olası etkilşimin olabileceği yer. **(D)** Ace2-spike(pdb:6VXX)) yerleştirmenin yapılmış hali, tüm görüntülemeler Chimera 1.15 kullanılarak elde edilmiştir

4.11 Ace2 Reseptörünün Bazı Proteinlerle Etkileşiminin Gösterilmesi.

Ace2 her ne kadar SARS CoV-2 salgınında çokça çalışılmış olsa da çok önemli bazı işlevlerinin olduğunu literatür özetinde bahsetmiştik. Bu yüzden Ace2'nin etkileşim içinde olduğu proteinleri ve bu proteinlerin rol oynadığı kritik rolleri bilmek Ace2 için önem arz etmektedir. STRING arama aracı, bilinen ve tahmin edilen protein-protein etkileşimlerinin biyolojik bir veri tabanı ve web kaynağıdır . STRING veritabanı, deneysel veriler, hesaplamalı tahmin yöntemleri ve genel metin koleksiyonları dahil olmak üzere çok sayıda kaynaktan gelen bilgileri

içerir. Ücretsiz olarak erişilebilir ve düzenli olarak güncellendiği belirtilmektedir [65,66]. Ayrıca GeneMANİA'dan farklı olarak tüm gene ait tüm proteinleri değil FASTA'sı bilinen amino asite bağlı sonuçlar getirir. Bu yüzden çıkacak sonuçlar güncel olandır.STRING aracı kullanılarak Ace2-olası proteinler laboratuvar etkileşimlerine erişilebilir ve olası sonuç Şekil4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Ace2'nin FASTA'sı alınarak STRING aracında kullanılması sonucu elde edilen Ace2 ve diğer olası proteinlerin etkileşimin gösterimidir. Litereatürde referenası olan çalışmaların etkileşimleridir

Bu amino asiteler Ace2 ile etkileşim skorlarına göre sıralanmış ve literatürde ispat edilmiş ve bu araçla da valide edilen bazı örnekler şunlardır: SLC6A19(Sodyum bağımlı nötr amino asit taşıyıcı),nötr amino asitlerin böbrek ve bağırsak epitel hücrelerinin apikal zarı boyunca emilmesine aracılık eden taşıyıcıdır [61]. Bu alımlar sodyuma bağımlıyken klorürden bağımsızdır. AGT(Angiotensinogen); kan basıncı, vücut sıvısı ve elektrolit homeostazının güçlü bir düzenleyicisi olan renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) temel bileşenidir [60,61]. DPP4(Dipeptidyl peptidase 4) T-hücresi reseptörü (TCR) aracılı T-

hücresi aktivasyonu için gerekli olan sinyalde yer alan hücre yüzeyi glikoprotein reseptörüdür. REN(Renin) ;plazmadaki anjiyotensinojenden anjiyotensin I üretmede , kan basıncının yükselmesinde ve böbrek tarafından sodyum tutulmasının artmasına neden olan bir dizi reaksiyonu başlatmak olan oldukça spesifik bir endopeptidazdır [62-64]. MME(Membran metalloendopeptidaz);Anjiyotensin-1, anjiyotensin-2 ve anjiyotensin 1-9'u parçalayabilme kabiliyetine sahiptir [65]. MEP1A (Meprin A alt birimi alfa); Peptidaz M12A ailesine aittir(https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112818-MEP1A). SLC1A7 bir amino asit taşıyıcısıdır. TMPRSS2(Transmembran proteaz serin 2); virüs-hücre zarı füzyonlarını kolaylaştıran, viral glikoproteinleri proteolitik olarak bölen ve aktive eden serin proteazdır. CLEC4M(C-tipi lektin alan ailesi 4); karaciğerde periferik immün sürveyansta yer alan olası patojen tanıma reseptörüdür ve lizozomal bölmelerde parçalanan patojenlerin endositozuna aracılık edebilmektedir [1-7,65].

4.12 Aday Rekombinant Ace2'lerin Alerjinitesi ve Sarmal Sayılarının Tahminin Yapılması

Alerji, bağışıklık sistemi tarafından daha önce karşılaşılan, normalde zararsız bir maddeye (tipik olarak proteinler) karşı deri döküntüsü, mukoza zarının şişmesi, hapşırma veya hırıltılı solunum veya diğer anormal durumlarla sonuçlanan aşırı reaksiyonudur [67]. Olası aday Ace2 rekombinant adayların alerjen olmaması oldukça önemlidir. Çünkü alergen olmamaları halinde deri döküntüsü, mukoza zarının şişmesi, hapşırma, hırıltılı ,solunum veya diğer anormal durumlarla sonuçlanan aşırı reaksiyonların olması olasıdır. Bu yüzden *in silico* ortamında AllerTOPv.2.0 programı alerjen durumu için kullanıldı [67]. Olası tüm aday Ace2'lerin alerjen olmadığı tahmin edildi (Tablo 4.7). Bir transmembran proteini (TP), hücre zarının tümünü kapsayan bir tür zar proteinidir. Maddenin zar boyunca taşınmalarında görev alırlar. Transmembran sarmal sayısı bize Ace2'nin madde taşınmasında etkinliği hakkında bilgi verir ve Ace2'nin transmembrane sayısıda TMHMM server ile tahmin edilmiştir [68].

Zaten ilgili sonuç Şekil 4.2'de doğrular niteliktedir. G104 ve L108 bölgelerin sarmal yerinde olmadığı bu sonuçla da valide edildi.

Tablo 4.7 Olası aday Ace2'lerin alerjen olup olmadığı AllerTOPv.2.0 aracıyla ve transmembran sarmal sayısının TMHMM Server v. 2.0 aracıyla tahmini sonuçlarının gösterimi

Varyant	TMHMM	Alerjinitesi
[a]Normal	1	Alerjen Değil
G104S	1	Alerjen Değil
G104A	1	Alerjen Değil
G104D	1	Alerjen Değil
G104R	1	Alerjen Değil
G104W	1	Alerjen Değil
G104I	1	Alerjen Değil
G104N	1	Alerjen Değil
G104T	1	Alerjen Değil
G104F	1	Alerjen Değil
G104E	1	Alerjen Değil
G104C	1	Alerjen Değil
G104P	1	Alerjen Değil
G104M	1	Alerjen Değil
G104Y	1	Alerjen Değil
G104L	1	Alerjen Değil
G104K	1	Alerjen Değil
G104Q	1	Alerjen Değil
G104V	1	Alerjen Değil
G104H	1	Alerjen Değil
G104del	1	Alerjen Değil
L108F	1	Alerjen Değil
L108D	1	Alerjen Değil
L108S	1	Alerjen Değil
L108R	1	Alerjen Değil
L108G	1	Alerjen Değil
L108I	1	Alerjen Değil
L108V	1	Alerjen Değil
L108K	1	Alerjen Değil
L108N	1	Alerjen Değil
L108A	1	Alerjen Değil
L108C	1	Alerjen Değil
L108M	1	Alerjen Değil
L108P	1	Alerjen Değil
L108W	1	Alerjen Değil
L108Y	1	Alerjen Değil
L108T	1	Alerjen Değil

Tablo 4.7 Olası aday Ace2'lerin alerjen olup olmadığı AllerTOPv.2.0 aracıyla ve transmembran sarmal sayısının TMHMM Server v. 2.0 aracıyla tahmini sonuçlarının gösterimi (devamı)

Varyant	TMHMM	Alerjinitesi
L108H	1	Alerjen Değil
L108Q	1	Alerjen Değil
L108E	1	Alerjen Değil
L108del	1	Alerjen Değil

Tablo 4.7'de görüldüğü gibi tüm olası rekombinant Ace2 adayların alergen olmadığı ve transmembran sarmal sayısısının da bir olduğu belirlenmiştir [67,68], bu durum hem G104 için olası adaylar hem de L108 için olası adaylar için geçerlidir (Tablo 4.7).

4.13 Ace2 Reseptörünün İn Sliko Ortamında Bulunan Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması

SARS CoV-2'nin neden olduğu salgınla birlikte literatüre ACE2 ile ilgili çok sayıda çalışma girmiştir. Ama ACE2 reseptörü sadece salgında virüs konak hücreye girişinde değil bir çok önemli ve kritik fonksiyonlarda da görev almaktadır. Bu yüzden bu teziizde ACE-2 reseptörünün(NP_068576.1) detaylı bir biyoinformatik analizinin yapılması düşünülmüştür, çünkü literatür taramalarında Ace2'yi oluşturan amino asitlerin pozisyonalarını belirten ve bu amino asitlerin Ace2'de oynayabileceği rollere yapısına yönelik kısıtlı çalışmalar yapıldığı belirlendi. Ace2'nin yapısını oluşturan bu amino asitlerin olası mutasyon/ delesyonlarda Ace2'nin biyolojik fonksiyonlarında, Ace2'nin fiziksel-kimyasal özelliklerinde nasıl roller üstleneceğini anlamak için oldukça önemlidir ve bu yapıyı oluşturan amino asitlerin detaylandırılması hayati roller oynayabilir. Çünkü üst solunum rahatsızlıklarında, akciğer rahatsızlıklarında, kardiyovasküler rahatsızlıklarda, tansiyon, diyabet hastalıklarında, böbrek yetmezliklerinde literatürde ACE2'ye çok önemli roller üstlendirilmiştir [7-35]. Bu nedenle biyoinformatik araçlar kullanılırken izlenecek yol/yöntemler belli bir mantıkla olmalıdır. Hedeflenen amino asitlerin özelliklerine ulaşmak için izlenecek yol Şekil 3'teki akışta özetlenerek gösterilmiştir ve tüm sonuçlar birbirlerini valide etmiştir (Tablo 4.1-4.7). Ace2'nin amino asit düzeyinde

FASTA'sı (NCBI Referans Sırası: NP_068576.1) alınarak ve DisEMBL hesaplama aracında kullanılarak Ace2'yi oluşturan amino asitlerin pozisyonların, bu proteinin yapısının düzenlenmesinde ve yapılanmasında etkin olup olmadığının (düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgelerini) tahmini yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.1 de gösterilmiştir. DisEMBL aracı ilgili düzenlenmemiş/yapılandırılmamış bölgelerin tahminini yaparken birden çok bu aracın sahip olduğu üç algoritmanında [57] ortak sonucu olan 104-110 (GSSVLSE) ve 767-777 (DRKK KNKARSG) bölgeler alındı(Tablo 4.1). Bu durum oldukça önemlidir çünkü yapılan ve bundan sonra devam eden süreçteki işlemlerde bu bölgeler kullanılarak bakılacak bölgeler sınırlandırılmış oldu. Kısıtlanan bu bölgelerdeki olası amino asit değişimleri ya da delesyonların Ace2 proteinin biyolojik işlevi üzerinde etkisinin olup olmadığını tahmin etmek için PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) araç kullanılmıştır. Bu aralıkta tüm amino asitler tek tek mutasyona/silinmelere uğratılmış, 300'ün üzerinde sonuç elde edilmiştir (Tablo 4.2). PROVEAN aracının sonucuna göre eğer çıkan skor -2.5'e eşit veya daha düşük çıkarsa varyantlar "zararlı" olarak kabul edilmiştir. Diğer taraftan elde edilen skor -2.5'in üzerinde puan alan varyantlar "nötr" olarak kabul edilmiştir [58] Sonuçlara göre G104X (X:G hariç tüm amino asitleri temsil eder) ve L108X (X:L hariç tüm amino asitleri temsil eder) noktalarının Ace2 proteininin biyolojik fonksiyonunun üzerinde zararlı sonuçlara yol açacağı tahmin edilmiştir. Tüm bu zararlı sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmektedir. Hem G104X (X:G hariç tüm amino asitleri temsil eder) hem de L108X (X:L hariç tüm amino asitleri temsil eder) noktalarının tüm sonuçları -2.5'ten daha az tahmin edildi (Tablo 4.2). En düşük G104L sonucu -6.606, maksimum G104D sonucu -2.955'tir. Ayrıca, L108 için minör sonuç -6.815(L108G), maksimum sonuç ise -2.955 (L108V) (Tablo 4. 2). Muhtemel mutasyonların sonuçlarına ek olarak, hem G104 hem de L108 noktalarındaki olası bir delesyonun Ace2 proteininin biyolojik fonksiyonu üzerinde zararlı olacağı öngörülmüştür. L108del'in sonuçları -9.391, G104del'in sonucu -9.872'dir. K769del, K770del, K771del, N772del, K773del, A774del, R775del, S776del, G777del olası delesyonlarda sonuçları zararlı olmadığı, kalan diğer tüm

delesyonların ise zararlı olduğu tahmin edildi (Tablo 4.2). Hem disEMBL hem de PROVEAN aracına göre G104 ve L108 bölgeleri üzerinde devam edilmesi gereken bölgeler olarak tespit edilmiş oldu ve bakılacak bölge G104 ve L108 olarak belirlenmiş oldu. Bu durum çalışmamızın özgünlüğünü artırmıştır.

I-Mutant2.0 aracıyla G104 ve L108 bölgelerin Ace2'nin stabilitesine olan etkilerini incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, 104 amino asit pozisyonundaki Glycine(G)'nin diğer amino asitlere nokta mutasyonunda ACE2'nin protein stabilitesinde hem azalmaya hem de artışa neden olduğu tahmin edildi. Sonuçlara göre;G104I, G104A, G104P, G104M, G104Y, G104I, G104N, G104L, G104E öngörülen stabilite artarken G104S, G104D, G104R, G104W, G104T, G104F, G104H, G104Q, G104K, G104C kararlılık (stabilite) azaldı. Diğer taraftan, 108. pozisyonda Lösin için durum böyle değildi çünkü protein stabilitesi değişikliklerinde tüm sonuçlar azalmayla sonuçlandı (Tablo 4.3). Bu durumda L108'in ilgili proteinin stabilitesinde G104'ten daha etkili olduğu düşünülebilir. Çünkü L108 bölgesindeki tüm olası mutasyon ve delesyonların stabilitenin azalmasına neden olduğu görüldü. Stabilitenin biyomoleküllerin fonksiyon, aktivite ve düzenlenmesini etkileyen temel bir özellik olduğu bilinmektedir. Kararlılık(stabilite) değişiklikleri hastalıklarda ya da mutasyona uğramış proteinler için önemli bir belirteç olabilmektedir [69].Bu çalışmaya dayanarak [81] bu nedenle Tablo 4.3'teki sonuçlar bazı hastalıkları tetikleyebilir.

Protein toksisitesinde ve makroskopik özelliklerde yük ve hidrofobikliğin hayati bir rol oynadığı belirtilmektedir [82,83]. Her amino asidin kendine özgü boyutu, yükü ve hidrofobiklik değeri vardır [59].Bu yüzden bu özeliliklerin G104 ve L108'de nasıl değiştiğinin ön görülerini elde etmek oldukça önemlidir. HOPE, bir protein dizisindeki nokta mutasyonunun yapısal etkilerini analiz eden, kullanımı kolay bir web hizmetidir. Protein dizimizi ve istenilen olası durumlar girildiğinde bu araç ;bir dizi web hizmetinden ve veri tabanından mevcut bilgileri toplayacak ,birleştirecektir, ayrıca sonuçlar, şekiller ve animasyonla eksiksiz bir rapor üretecektir. İnsan hücrelerinde bulunan proteinler için kullanılan bu araç sonuçları oldukça önem arz etmektedir. G104 ve L108 bölgelerindeki olası mutasyonel değişikliklerin amino asitlerin yükü, boyutu ve

hidrofobikliğinde değişikliklere neden olabileceği ön verileri elde edildi(Tablo 4.4). Yapılan çalışmaya [82] dayanarak, bu değişikliklerin protein toksisitesini etkileyebileceği düşünülmelidir. Ayrıca Hope aracı ile G104 bölgesindeki değişimin ACE-2 proteininin esnekliğini etkilediği belirlenmiştir [59].Çünkü glisin tüm residüler(kalıntılar) içinde arasında en esnek olanıdır. Bu esneklik proteinin işlevi için önemli olabilir, ancak bu özellik L108 pozisyonu tahmin edilmedi(Tablo4.4). Ayrıca, mutant hacimsel boyutu doğal olandan daha büyük olduğunda, bu süreç çarpmalara yol açabilir. Öte yandan, doğal olan formun mutant olandan daha büyük olduğunda, bu işlemin etkileşim kaybına yol açabileceği tahmin edilmiştir (Tablo4.4) [59]. Son olarak, bazı mutasyonlarının proteinlerin korunmasına zarar verdiği belirlendi. Bu nedenlerle hem G104 hem de L108 bölgelerinin ACE-2 proteini için çok önemli olduğu düşünülebilir[79-83].

ACE2 ile ilgili tüm alternatif durumlarda sonuçların hidrofilik olduğunu ve çevreleyen su molekülleri ile iyi bir etkileşime sahip olduğunu gösteren negatif bir GRAVY değerine sahip olduğunu gösterdi[84]. Yarılanma sürelerin proteinler için oldukça önemli olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle tüm olası durumların yarılanma ömürleri de belirlendi. Tahmini yarı ömür, memeli retikülositindeki (in vitro) tüm proteinler için 30 saat, mayada (in vivo) > 20 saat, E.coli'de (in vivo) >10 saattir(Tablo 5). Bu sonuçlar ACE2 için olası bir rekombinant çalışmada ya da Ace2'nin in vitroda çalışma süresi için önemli olacaktır [84,85]. Bu önemli yarılanma süreleri, olası Ace2 rekombinant adayların in vivo ya da in vitro alanda yapılacak çalışmalara ön kaynak olması olasıdır. ACE-2 proteinindeki residüler eşit derecede önemli değildir. Bazıları proteinin evrimsel süreçte korunmasında etkili ve sürekli aynı iken diğerleri ise olası mutasyon yada murtagenezlerde değişim gösterebiliyor [86].HOPE aracıyla tüm bu sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4.5).

Proteini oluşturan bazı amino asitler evrimsel süreçte konumunu ve işlevini korumaktadır. Bu yüzden ACE2'nin korunmuş bölgelerin tespitin yapılması G104 ve L108 noktaları için oldukça önemlidir. Eğer bu iki nokta(G104 ve L108) korunmuş bölgeye ait olursa bulduğumuz işlemlerin önemli olmaması gerekir

çünkü evrimsel süreçte amino asitleri oluşturan proteinler konumunu korumaya meğilli oldukları bilinmektedir[79]. ConSurf aracı kullanılarak Ace2'nin olası tüm bölgelerine bakıldı ve sonuç Şekil 4.3'te gösterilmiştir [60]. G104 ve L108 bölgeleri, Ace2 (NP_068576.1) proteininin herhangi bir korunmuş amino asidine ait olmadığı tahmin edildi (Şekil4.3). G104 ve L108 arasındaki korunmuş bölge skorları sonuçları G(skor:1),S(skor:9),L(skor:3), V(skor:8),N(skor:7), Q(skor:7). ConSurf Server'a göre maksimum puan 9 iken ve skor artıkça korunmuş bölge olma ihtimalide yükselmektedir [60]. Ayrıca, G104 (skor:1) en değişime açık amino asittir ve L108 amino asidi (3-4 arası puana sahip) de korunan bölgeden uzak bir skora sahiptir(Şekil 4.3). Bu durum oldukça önemli çünkü disEMBL, PROVEAN,HOPE ve ExPASyProtParam araçlarıyla da elde edilen sonuçlarda G104 ve L108 ön plana çıkmıştı. Bu araçlada tüm sonuçlar daha güçlü olacak şekilde birbirlerini valide ettiler.

Anjiyotensin dönüştürücü enzimi 2; kalp, böbrek, bağırsak ve endotel hücreleri dahil olmak üzere birçok pulmoner ve ekstra pulmoner hücre tipinin yüzeyinde eksprese edildiği literatürde belirtilmiş [87] Şekil 2.1'de literatürde olan ve kanıtlanan yerler gösterilmiştir. Ace2 proteinini oluşturan amino asitlerin olası korunmuş bölgeleri bilmek ve bu tahmini korunmuş bölgelere ait algoritmik çözümler sonucu skorları bilmek tüm bu alandaki yapılmış çalışmalara ya da yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır. [88,89].Literatürde Ace2'ye yönelik rekombinant çalışmalar yapılmıştır. Ama bu tezimizde olduğu gibi farklı Ace2'ye yönelik olası rekombinant adaylar üzerine çalışılmamıştır ve sadece normal Ace2'nin rekombinantları kullanılmıştır [40-50]. Doğal yapısında olduğu gibi kullanılan Ace2 rekombinantları oldukça önemli görevlerde kullanılmış ve sonuçlar çok umut vaad etmiştir [40-50]. Bu tez çalışmamızla en az 10 olası Ace2 rekombinant adayları çeşitlenmiştir. Dolasıyla üst solunum saturasyonunda, kardiyovasküler hastalıklarda, diyabet hastalara çok sayıda aday rekombinant Ace2'ler ön görüldü. Oluşturulacak aday rekombinnat Ace2'lerin alerjen olmaması tüm bu organ ve dokular için önemlidir [67]. Çünkü alergen olmamaları halinde vücutta farklı ve olumsuz sonuçlar doğuracak sonuçlara neden olabilir. AllerTOPv.2.0 programıyla Ace2'nin alerjen durumuna

bakıldı [67] ve tüm olası aday Ace2'lerin alerjen olmadığı tahmin edildi (Tablo 4.7). Bu yüzden kullanılacak olan rekombinant adaylar insan vücudu için yan etki oluşturmayacağı ön görüsüde elde edilmiş oldu. Ayrıca, G104 ve L108 bölgelerin hücre zarına bağlı olmadıkları ve sinyal taşıyan alanlar olduğuda Şekil 4.2'de elde edilmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar doğrultusunda normal Ace2'ye göre stabilte, biyolojik aktivite, fiziksel ve kimyasal olayları etkileyen G104 ve L108 noktalarının değişimiyle elde edilen olası rekombinant aday Ace2'ler kalp, böbrek, bağırsak ve endotel hücreleri dahil olmak üzere birçok hayati fonksiyonlara olumlu katkı sağlayabilir ve herhangi bir alerjen durumu oluşturmayacaklardır.

Elde edilen farklı Ace2 formların spike ile etkileşimi incelendiğinde, beklentimiz tüm sonuçların farklı olması ya da nomal Ace2 (herhangi bir mutagenezin olmadığı)'den farklı olmasıydı. Sonuçlar beklentimiz gibi çıkmış ve Tablo4.6'da gösterilmiştir. Bu da bize G104 ve L108 bölgelerdeki olası değişimlerin Ace2'nin diğer proteinlerle etkileşimlerini etkileyebilceğini gösterdi. Protein- spike proteinin etkileşim için HDOCK aracı kullanıldı ve elde edilen ekzotermik enerjinin skorlarına göre en iyi iki tahmini skor alınmıştır [89]. Tablo 6'da görüldüğü gibi G104 ve L108 bölgelerindeki amino asit değişiminin Ace-2 protein-spike protein etkileşimini de etkilediği belirlendi. Tablo 4.6'daki sonuçlara göre G104 bölgesindeki değişikliklerin genel olarak ACE-2'nin spike protein ile etkileşimini azalttığı, L108 bölgesindeki değişikliklerin ise çoğunlukla arttığı düşünülebilir. Kenetleme de en düşük (ekzotermik değere) bakılır. Bunun nedeni ekzotermik tepkimelerin kendiliğinden gerçekleşmesidir. Bu nedenle en iyi ekzotermik sonuçlar en iyi docking(kenetlenme) anlamına gelmektedir. İncelenme sonucunda en az on farklı kenetlenme(docking) sonucu elde edilmiş ve bu sonuçlar içinde ekzotermik enerjisi en iyi iki model seçilmiştir(Tablo 4.6). En iyi ve düşük skora sahip olan etkileşimin kenetlenme skoru -261,75 iken en düşük skora sahip olansa - 235.25 olarak tahmin edildi. G104 noktasında tahmin edilen en düşük iki yerleştirme puanı G104A ve G104L değişikliklerine aitken, L108 bölgesindeki en yüksek tahmin edilen yerleştirme puanları L108Y ve L108F değişikliklerine aittir [90-100]. Bu yüzden Ace2 üzerine yapılacak

rekombinant aday araştırmalarında, bu enzimin kimyasal-fiziksel özelliklerine yönelik çalışmalarında, bu enzimin etkileşim içinde olduğu proteinler kenetlenme skor değişimlerinde, biyolojik aktivite etkilenmelerine yönelik tüm çalışmalarda bakılacak G104 ve L108 en önemli iki pozisyondur. Sonuç olarak G104 ve L108 noktaları; Ace2'nin yapısının düzensizliğinde/yapılanmasında,Ace2'nin biyolojik aktivite fonksiyonunlarında, Ace2'nin stabilitesinin değişiminde, Ace2'nin fiziksel (boyut, yük ve hidrofobiklik) değişimlerinde, Ace2'nin- korona virüsün yüzey proteiniyle(spike) kenetlenme(docking) skorların değişimlerinde , Ace2'nin fiziko-kimyasal parametreleri etkilemesi gibi tüm özellikleri birden etkileyerek hipotezimizin sonucu olarak kayda değer noktalar olmuşturlar. Ayrıca, bu iki noktadaki olası değişimlerde alerjen olmaması aday rekombinant Ace2'lerin kullanımınıda güvenli olacağını desteklemiştir.

.

KAYNAKÇA

1. Wu, J. T., Leung, K. & Leung, G. M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*, **395**, 689–697,2020.
2. Chan-Yeung M &Yu WC Outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Special Administrative Region: a case report. British Medical Journal,32: 850–852,2003.
3. Belouzard, S., Chu, V. C and Whittaker, G. R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 5871-5876,2009.
4. Hui, D. S. et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Intl. J. Infect. Dis.,* **91**, 264–266,2020.
5. Aktas E.Korcan E., Ozdemir Ozgenturk N , Erismis UC . Bioinformatic analysis reveals that some bacteria may aid SARS–COV-2 spread and entry into host cells sıgma journal of engıneerıng and natural scıences- cilt.39, sa.3, ss.248-259, 2021.
6. Aktas E. Bioinformatics Analysis Unveils Certain Mutations Implicated in Spike Structure Damage and Ligand-Binding Site of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. Bioinformatics and Biology Insights. 2021.
7. Xiaocong Pang, Yimin Cui & Yizhun Zhu Recombinant human ACE2: potential therapeutics of SARS-CoV-2 infection and its complication, *Acta Pharmacologica Sinica* ,**volume 41**, pages1255–1257,2020.
8. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitör Cell.,Volume 181, Issue 2, Pages 271-280.e8, 2020.

9. Zou Z, Yan Y, Shu Y, Gao R, Sun Y, Li X, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from lethal avian influenza A H5N1 infections. Nat Commun;,5:3594, 2014.

10. Yang P, Gu H, Zhao Z, Wang W, Cao B, Lai C, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) mediates influenza H7N9 virus-induced acute lung injury. Sci Rep;, 4:7027, 2014.

11. Qaradakhi T, Gadanec LK, McSweeney KR, Tacey A, Apostolopoulos V, Levinger I, Rimarova K, Egom EE, Rodrigo L, Kruzliak P, Kubatka P, Zulli A. The potential actions of angiotensin-converting enzyme II (ACE2) activator diminazene aceturate (DIZE) in various diseases. Clin Exp Pharmacol Physiol. May;47(5):751-758. doi: 10.1111/1440-1681.13251. Epub 2020 Jan 28. PMID: 31901211, 2020.

12. Li X, Molina-Molina M, Abdul-Hafez A, Uhal V, Xaubet A, Uhal BD. Angiotensin converting enzyme-2 is protective but downregulated in human and experimental lung fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 295:L178–85, 2008.

13. Zhang H, Baker A. Recombinant human ACE2: acing out angiotensin II in ARDS therapy. Crit Care.,21:305, 2017.

14. I. Hamming, W. Timens, M. Bulthuis, A. Lely, G. Navis, H. van Goor Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. The first step in understanding SARS pathogenesis J. Pathol, 203 (2), pp. 631-637, 10.1002/path.1570,2004

15. Sonja Kowalczuk,Angelika Bröer,Nadine Tietze,Jessica M. Vanslambrouck,John E. J. Rasko,Stefan Bröer,A protein complex in the brush-border membrane explains a Hartnup disorder allele.The FASEB Journal, https://doi.org/10.1096/fj.08-107300,2008.

16. Gabrielle C. Douglas, Moira K. O'Bryan, Mark P. Hedger, David K. L. Lee, Michael A. Yarski, A. Ian Smith, Rebecca A. Lew, The Novel Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Homolog, ACE2, Is Selectively Expressed by Adult

Leydig Cells of the Testis, Endocrinology, Volume 145, Issue 10, , Pages 4703–4711, https://doi.org/10.1210/en.2004-0443,2004.

17. Louise M. Burrell, John Risvanis, Eiji Kubota, Rachael G. Dean, Peter S. MacDonald, Sai Lu, Christos Tikellis, Sharon L. Grant, Rebecca A. Lew, A. Ian Smith, Mark E. Cooper, Colin I. Johnston, Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans, European Heart Journal, Volume 26, Issue 4, , Pages 369–375, https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi114. 2005.
18. Feria Hikmet,Loren Méar,Åsa Edvinsson,Patrick Micke, Mathias Uhlén, Cecilia Lindskog., The protein expression profile of ACE2 in human tissues.,Molecular Systems Biology 16:e9610,https://doi.org/10.15252/msb.20209610, 2020.
19. Zou, X., Chen, K., Zou, J. et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. Front. Med. 14, 185–192 (2020). https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0. 2020.
20. Carly G.K. Ziegler, Samuel J. Allon, Sarah K. Nyquist, *et al*.SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues,Cell,Volume 181, Issue 5,Pages 1016-1035.e19,ISSN 0092-8674,https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035.2020.
21. Blume, C., Jackson, C.L., Spalluto, C.M. et al. A novel ACE2 isoform is expressed in human respiratory epithelia and is upregulated in response to interferons and RNA respiratory virus infection. Nat Genet 53, 205–214, 2021.
22. Daniel J. Jackson, William W. Busse, Leonard B. Bacharier, Meyer Kattan, George T. O'Connor, Robert A. Wood, Cynthia M. Visness, Stephen R. Durham, David Larson, Stephane Esnault, Carole Ober, Peter J. Gergen, Patrice Becker, Alkis Togias, James E. Gern, Mathew C. Altman, Association

of respiratory allergy, asthma, and expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2, Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 146, Issue 1, Pages 203-206.e3,ISSN 0091-6749, 2020.

23. Natalija Glibetic,Femke J. Aan,Vanessa Montoya-Uribe,Michelle L. Matter,The Role of Microbiota in Gut Inflammation and Sepsis, Reference Module in Food Science, (2022). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00023-1. 2022.

24. Zhang H, Baker A. Recombinant human ACE2: acing out angiotensin II in ARDS therapy. Crit Care. 2017;21(1):305. Published . doi:10.1186/s13054-017-1882-z, 2017.

25. Katrina M. Mirabito Colafella, Estrellita Uijl, A.H. Jan Danser, Interference With the Renin–Angiotensin System (RAS): Classical Inhibitors and Novel Approaches, Editor(s): Ilpo Huhtaniemi, Luciano Martini, Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition),Academic Press,Pages 523-530, 2019.

26. Ipekci A, Biberoglu S, Ikizceli I, Cakmak F, Akdeniz YS, Kanbakan A, Konukoglu D, Bolayirli IM, Borekci S, Urkmez S, Ozkan S. ACE2 and ANGII levels in patients with COVID-19 based on thoracic tomography findings and PCR test results. J Infect Dev Ctries 16:427-434, 2022.

27. van Kimmenade, R.R.J., Belfroid, E., Hoogervorst-Schilp, J. et al. The effects of ACE2 expression mediating pharmacotherapy in COVID-19 patients. Neth Heart J 29, 20–34 , 2021.

28. Kabbani N, Olds JL. Does COVID19 Infect the Brain? If So, Smokers Might Be at a Higher Risk. Mol Pharmacol. ;97(5):351-353. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32238438; PMCID: PMC7237865, 2020.

29. Aasef G. Shaikh, Mario Manto, Hiroshi Mitoma, 2 Years into the Pandemic: What Did We Learn About the COVID-19 and Cerebellum?, The Cerebellum, 10.1007/s12311-021-01351-7, 21, 1, (19-22), 2022.

30. María Belén Luis, Nora Fernández Liguori, Pablo Adrián López, Ricardo Alonso, SARS-CoV-2 RNA detection in cerebrospinal fluid: Presentation of two cases and review of literature, Brain, Behavior, & Immunity - Health, Volume 15,100282,2021.

31. Ross W Paterson, Laura A Benjamin, Puja R Mehta, Rachel L ,et all, Serum and cerebrospinal fluid biomarker profiles in acute SARS-CoV-2-associated neurological syndromes, Brain Communications, Volume 3, Issue 3, 2021.

32. Araújo, Naiana Mota ; Ferreira, Lis Campos; Dantas, Débora Paraíso MS; Silva, Denison Santos , dos Santos, Cliomar Alves ; Cipolotti, Rosana ; Martins-Filho, Paulo Ricardo .First Report of SARS-CoV-2 Detection in Cerebrospinal Fluid in a Child With Guillain-Barré Syndrome, The Pediatric Infectious Disease Journal: July 2021 - Volume 40 - Issue 7 - p e274-e27, 2021.

33. Kabbani N, Olds JL. Does COVID19 Infect the Brain? If So, Smokers Might Be at a Higher Risk. Mol Pharmacol. ;97(5):351-353. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32238438; PMCID: PMC7237865, 2020.

34. Turner AJ . "Chapter 25: ACE2 Cell Biology, Regulation, and Physiological Functions". Unger T, Ulrike M, Steckelings UM, dos Santos RA (Edl.). The Protective Arm of the Renin-Angiotensin System (RAS): Functional Aspects and Therapeutic Implications. Academic Press. ss. 185-189, 2015.

35. Atıcı Y, Elbaş Y, Bakır F, Yıldırımkaya MM. COVID-19 enfeksiyonunda ACE ve ACE2 reseptörlerinin potansiyel rolü. Yücel D, editör. COVID-19 Pandemisinde Tıbbi Biyokimyanın Artan Rolü. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; . p.57-62,2021.

36. Topal ve ark. COVID-19: ACE2, RAAS ve Kronik Hastalıklar KTO Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi , Cilt 2, Sayı 2, 61-72. 2021

37. Yanar, Sevinç; Kasap, Murat. Ace2 ve TMRSS2'nin farklı doku ve hücrelerde ifadesinin COVID-19 patogenezindeki rolü. *covid-19 ve Sağlık araştırmaları-5*, 145.,33.2021

38. Thomas Perlot, Josef M. Penninger, ACE2 – From the renin–angiotensin system to gut microbiota and malnutrition, Microbes and Infection, Volume 15, Issue 13, Pages 866-873, ISSN 1286-4579, 2013

39. Zhang H, Baker A. Recombinant human ACE2: acing out angiotensin II in ARDS therapy. Crit Care. 2017;21(1):305. Published . doi:10.1186/s13054-017-1882-z, 2017.

40. Tsuchiya H . Oral Symptoms Associated with COVID-19 and Their Pathogenic Mechanisms: A Literature Review. Dentistry Journal 9(3):32, 2021

41. Zhang, H., Baker, A. Recombinant human ACE2: acing out angiotensin II in ARDS therapy. Crit Care 21, 305, . Gu, H., Xie, Z., Li, T. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits lung injury induced by respiratory syncytial virus. Sci Rep 6, 19840, 2017.
42. Khan, A., Benthin, C., Zeno, B.et al.A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. Crit Care 21,234 , 2017.
43. Marquez, Alonso, et al. "An update on ACE2 amplification and its therapeutic potential." Acta Physiologica 231.1 : e13513, 2021.
44. Ratnadeep Basu, Marko Poglitsch, Haran Yogasundaram, Jissy Thomas, Brian H. Rowe, Gavin Y. Oudit, Roles of Angiotensin Peptides and Recombinant Human ACE2 in Heart Failure, Journal of the American College of Cardiology, Volume 69, Issue 7, Pages 805-819,ISSN 0735-1097, 2017.
45. Jan Wysocki, Minghao Ye, Luise Hassler, Ashwani Kumar Gupta, Yuguo Wang, Vlad Nicoleascu, Glenn Randall, Jason A. Wertheim, Daniel Batlle, A Novel Soluble ACE2 Variant with Prolonged Duration of Action Neutralizes

SARS-CoV-2 Infection in Human Kidney Organoids, Journal of the American Society of Nephrology, 10.1681/ASN.2020101537, 32, 4, (795-803), 2021.

46. E. H. Bae, F. Fang, V. R. Williams, A. Konvalinka, X. Zhou, V. B. Patel, X. Song, R. John, G. Y. Oudit, Y. Pei and J. W. Scholey, Murine recombinant angiotensin-converting enzyme 2 attenuates kidney injury in experimental Alport syndrome. Kidney Int., 91,1347–136,2017.
47. Oudit, Gavin Y., et al. "Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy." Diabetes 59.2 : 529-538, 2010.
48. Katrina M. Mirabito Colafella, Estrellita Uijl, A.H. Jan Danser, Interference With the Renin–Angiotensin System (RAS): Classical Inhibitors and Novel Approaches, Editor(s): Ilpo Huhtaniemi, Luciano Martini, Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition),Academic Press,Pages 523-530,2019.
49. Pang, Xiaocong et al. “Recombinant human ACE2: potential therapeutics of SARS-CoV-2 infection and its complication.” Acta pharmacologica Sinica vol. 41,9 : 1255-1257, 2020.
50. Abd El-Aziz, T.M., Al-Sabi, A. & Stockand, J.D. Human recombinant soluble ACE2 (hrsACE2) shows promise for treating severe COVID-19. Sig Transduct Target Ther 5, 258, 2020.
51. M. Comas-Garcia,E.I. Rubio-Hernández,I. Lara-Hernández,M. Colunga-Saucedo,C.G. Castillo,A. Comas-Garcia,A. Monsivais-Urenda,R. Zandi,Basic virological aspects of SARS-CoV-2, Biomedical Innovations to Combat COVID-19, (1-30),https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90248-9.00006-1. 2022.
52. Max Franz, Harold Rodriguez, Christian Lopes, Khalid Zuberi, Jason Montojo, Gary D Bader, Quaid Morris, GeneMANIA update 2018, Nucleic Acids Research, Volume 46, Issue W1, 2 , Pages W60–W64, 2018.

53. Abdulkadir Yusif Maigoro, Dayoung An, and Soojin Lee.Journal of Medicinal Food.Feb 2022.130-137,Published in Volume: 25 Issue 2: February 11, 2022.

54. Sanjida H. Rangwala, Anatoliy Kuznetsov, et al.Accessing NCBI data using the NCBI Sequence Viewer and Genome Data Viewer (GDV) Genome Res. 31: 159-169, 2021.

55. Cecconi D., Di Carlo C., Brandi J. Protein Secretion Prediction Tools and Extracellular Vesicles Databases. In: Cecconi D. (eds) Proteomics Data Analysis. Methods in Molecular Biology, vol 2361. Humana, New York, NY. 2021.

56. R. Linding, L.J. Jensen, F. Diella, P. Bork, T.J. Gibson and R.B. Russell Protein disorder prediction: implications for structural proteomics Structure, Vol 11, Issue 11, 2003

57. Choi Y, Chan AP PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. Bioinformatics 31(16): 2745-2747,2015

58. Emidio Capriotti, Piero Fariselli, Rita Casadio I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure.Nucleic Acids Research, 2005, Volume 33, Issue suppl_2, W306–W310, 2005.

59. Hanka Venselaar , Tim A H Te Beek, Remko K P Kuipers, Maarten L Hekkelman, Gert Vriend Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. BMC Bioinformatics 2010, 11:548. doi: 10.1186/1471-2105-11-548.

60. Ben Chorin A, Masrati G, Kessel A, Narunsky A, Sprinzak J, Lahav S, Ashkenazy H, Ben-Tal N. ConSurf-DB: An accessible repository for the

evolutionary conservation patterns of the majority of PDB proteins. Protein Sci. Jan;29(1):258-267, 2020

61. Gasteiger, E. et al. Protein identifcation and analysis tools on the ExPASy server. In Te Proteomics Protocols Handbook,571–607, https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571, 2005.

62. Yan, Y., Tao, H., He, J. *et al.* The HDOCK server for integrated protein–protein docking. *Nat Protoc* **15,** 1829–1852, 2020.

63. Gaëlle Debret, Arnaud Martel, Philippe Cuniasse RASMOT-3D PRO: a 3D motif search webserver, *Nucleic Acids Research*, 2009 Volume 37, Issue suppl_2, 1 July 2009, Pages W459–W464, 2009.

64. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem ;25:1605–1612, 2004.

65. Szklarczyk, Damian; Gable, Annika L.; Lyon, David; Junge, Alexander; Wyder, Stefan; Huerta-Cepas, Jaime; Simonovic, Milan; Doncheva, Nadezhda T.; Morris, John H.; Bork, Peer; Jensen, Lars J. "STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets". Nucleic Acids Research. 47 (D1): D607–D613. doi:10.1093/nar/gky1131, 2019.

66. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Lin J, Minguez P, Bork P, von Mering C, Jensen LJ . "STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration". Nucleic Acids Res. 41 (Database issue): D808–15. doi:10.1093/nar/gks1094, 2013.

67. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. J. Mol. Biol. 305(3), 567–580, 2001.

68. Ivan Dimitrov , Ivan Bangov, Darren R Flower, Irini Doytchinova AllerTOP v.2--a server for *In Silico* prediction of allergens.PMID: 24878803 DOI: 10.1007/s00894-014-2278-52014

69. Polat M. , Karahan A. Multidisipliner Yeni Bir Bilim Dalı: Biyoinformatik ve Tıpta Uygulamaları. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi. ; 16(3): 41-50, 2009.

70. von Heijne, G. Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7,** 909–918 2006.

71. Kowalczuk S, Bröer A, Tietze N, Vanslambrouck JM, Rasko JE, Bröer S. A protein complex in the brush-border membrane explains a Hartnup disorder allele. FASEB J. (8):2880-7. doi: 10.1096/fj.08-107300, 2008.

72. Camargo SM, Singer D, Makrides V, Huggel K, Pos KM, Wagner CA, Kuba K, Danilczyk U, Skovby F, Kleta R, Penninger JM, Verrey F. Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations. Gastroenterology. 2009 Mar;136(3):872-82. 2008

73. Azmanov DN, Kowalczuk S, Rodgers H, Auray-Blais C, Giguère R, Rasko JE, Bröer S, Cavanaugh JA. Further evidence for allelic heterogeneity in Hartnup disorder. Hum Mutat. (10):1217-21. PMID: 18484095,2008

74. Ginés S, Mariño M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebaut C, Hovanessian A, Casadó V, Lluis C, Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. Biochem J. 15;361(Pt 2):203-9. doi: 10.1042/0264-6021:3610203, 2002.

75. Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, Scharpé S, De Meester I. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. Eur J Biochem. 267(17):5608-13. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01634.x, 2000.

76. Ikushima H, Munakata Y, Ishii T, Iwata S, Terashima M, Tanaka H, Schlossman SF, Morimoto C. Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell

activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 18;97(15):8439-44. doi: 10.1073/pnas.97.15.8439, 2000.

77. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. Biochem J. 1;383(Pt 1):45-51. doi: 10.1042/BJ20040634, 2004.

78. Yongwook Choi, Agnes P. Chan, PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels, *Bioinformatics*, Volume 31, Issue 16, Pages 2745–2747, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195 ,2015.

79. Hong Ji, Jianfa Wang, Jingru Guo, Yue Li, Shuai Lian, Wenjin Guo, Huanmin Yang, Fanzhi Kong, Li Zhen, Li Guo, Yanzhi Liu, Progress in the biological function of alpha-enolase, Animal Nutrition, Volume 2, Issue 1,Pages 12-17, 2016.

80. Linden R The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. Front. Mol. Neurosci. ,10:77, 2017.

81. Sofia Khan,Mauno Vihinen Performance of protein stability predictors.Volume31, Issue6,Pages 675-684 Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/humu.21242, 2010.

82. Kelsey N. Ryan Qixin Zhong Edward A. Foegeding Use of Whey Protein Soluble Aggregates for Thermal Stability—A Hypothesis Paper.CONCISE Reviews/hypotheses in food science;Volume78, Issue8 , R1105-R1115.https://doi.org/10.1111/1750-3841.12207, 2013.

83. Mannini, B., Mulvihill, E., Sgromo, C., Cascella, R., Khodarahmi, R., Ramazzotti, M., Dobson, C. M., Cecchi, C., and Chiti, F. Toxicity of Protein Oligomers Is Rationalized by a Function Combining Size and Surface Hydrophobicity. *ACS Chem. Biol.* *9* (10), 2309– 2317, DOI: 10.1021/cb500505m, 2014.

84. Droppa-Almeida, D., Franceschi, E. & Padilha, F. F. Immune-informatic analysis and design of peptide vaccine from multi-epitopes against Corynebacterium pseudotuberculosis. Bioinform. Biol. Insights, 12, 1177932218755337. https://doi.org/10.1177/1177932218 755337, 2018.

85. Can, H., Köseoğlu, A.E., Erkunt Alak, S. *et al. In Silico* discovery of antigenic proteins and epitopes of SARS-CoV-2 for the development of a vaccine or a diagnostic approach for COVID-19. *Sci Rep* ,**10,** 22387, 2020.

86. Capra JA, Singh M. Predicting functionally important residues from sequence conservation. Bioinformatics.;23(15):1875-82. doi: 10.1093/bioinformatics/btm270. Epub 2007 May 22. PMID: 17519246. 2007.

87. Albini, A., Di Guardo, G., Noonan, D.M. *et al.*The SARS-CoV-2 receptor, ACE-2, is expressed on many different cell types: implications for ACE-inhibitor- and angiotensin II receptor blocker-based cardiovascular therapies. *Intern Emerg Med.*, **15,** 759–766.https://doi.org/10.1007/s11739-020-02364-6, 2020.

88. Lensink, M. F. et al. Blind prediction of homo- and hetero-protein complexes: the CASP13-CAPRI experiment. *Proteins,* , **87**, 1200–1221. 2019.

89. Rashid MI, Rehman S, Ali A, Andleeb S.. Fishing for vaccines against Vibrio cholerae using *In Silico* pan-proteomic reverse vaccinology approach. PeerJ 7:e6223 https://doi.org/10.7717/peerj.6223,2019.

90. Sheng-You Huang Search strategies and evaluation in protein–protein docking: principles, advances and challenges, Drug Discovery Today, 2, Volume 19, Issue 8,Pages 1081-1096,ISSN 1359-6446, https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.005v, 2014

91. Dangi, M., Kumari, R., Singh, B. & Chhillar, A. K.Advanced *In Silico* tools for designing of antigenic epitope as potential vaccine candidates against coronavirus. In Bioinformatics: Sequences, Structures, Phylogeny (ed. Shanker, A.) 2018,329–357

92. Cheng, J., Randall, A. Z., Sweredoski, M. J. & Baldi, P. SCRATCH: A protein structure and structural feature prediction server. Nucleic Acids Res.2005, 33, 72–76. https://doi.org/10.1093/nar/gki396

93. Yan Y, Tao H, He J, Huang S-Y. The HDOCK server for integrated protein-protein docking. Nature Protocols, 2020; doi: https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x.

94. Ankita Barik Mutation Hotspot Prediction, Structural Analysis & Stability Changes of Prion Protein Involved in Causing CJD.Helix 2017, Vol. 8: 1479-1484 DOI 10.29042/2017-1479-1484

95. Shey, R. A. et al. In-silico design of a multi-epitope vaccine candidate against onchocerciasis and related flarial diseases. Sci. Rep. 9(1), 4409. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40833-x, 2019.

96. Meunier, M. et al. Identifcation of novel vaccine candidates against campylobacter through reverse vaccinology. J. Immunol. Res., 5715790. https://doi.org/10.1155/2016/5715790, 2016.

97. Hansson, M., Nygren, P. A. & Stahl, S. Design and production of recombinant subunit vaccines. Biotechnol. Appl. Biochem. 32(2), 95–107. https://doi.org/10.1042/ba20000034, 2000.

98. Benjamin R Dudenhoeffer, Hans Schneider, Kristian Schweimer, Stefan H Knauer SuhB is an integral part of the ribosomal antitermination complex and interacts with NusA, *Nucleic Acids Research*, ,Volume 47, Issue 12, Pages 6504–6518, https://doi.org/10.1093/nar/gkz442, 2019.

99. Amar Deep, Prabhakar Tiwari, Sakshi Agarwal, Soni Kaundal, Saqib Kidwai, Ramandeep Singh, Krishan G Thakur Structural, functional and biological insights into the role of *Mycobacterium tuberculosis* VapBC11 toxin–antitoxin system: targeting a tRNase to tackle mycobacterial adaptation, *Nucleic Acids Research*, , Volume 46, Issue 21, Pages 11639–11655, https://doi.org/10.1093/nar/gky924, 2018.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Aktaş E. , Özdemir Özgentürk N. Identity of Ace2 As a Result of Bioinformatıc Investigations. Cumhuriyet 6th International Conference on Applied Sciences Ankara, ss 2.Aprıl 23, 2022 (https://avesis.yildiz.edu.tr/yayin/c8a5d743-909d-40cd-b659-cf799abd0665/identity-of-Ace2-as-a-result-of-bioinformatic-investigations)