

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

ASİT RESEPTÖRLERİ/KOLOREKTAL KANSER
BAĞLANTISININ VİRTUAL SCREENİNG YÖNTEMİYLE
BELİRLENEN YAMOGENİN VE ASİT STİMÜLASYONU
AKSINDA OTOPETRİN-1 PROTEİNİ ÜZERİNDEN İN
VİTRO VE İN SİLİCO DEĞERLENDİRİLMESİ

Altınay ALTINKAYNAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
DANIŞMAN
Prof. Dr. Ece ŞİMŞEK

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**ASİT RESEPTÖRLERİ/KOLOREKTAL KANSER
BAĞLANTISININ VİRTUAL SCREENİNG YÖNTEMİYLE
BELİRLENEN YAMOGENİN VE ASİT STİMÜLASYONU
AKSINDA OTOPETRİN-1 PROTEİNİ ÜZERİNDEN İN
VİTRO VE İN SİLİCO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Altınay ALTINKAYNAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ece ŞİMŞEK

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TYL-2025-6818 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Beslenme ve Diyetetik Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ece Şimşek, Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Nilgün SEREMET KÜRKLÜ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysel ŞAHİN KAYA
Antalya Bilim Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Altınay ALTINKAYNAK

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ece ŞİMŞEK

İmza

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanması sürecinde bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Ece ŞİMŞEK'e (Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü) olmak üzere değerli hocalarıma; her zaman yanımda olan, sevgisi ve sabrıyla beni motive eden AİLEME; çalışmam boyunca moral ve yardımlarıyla bana güç veren ARKADAŞLARIMA içtenlikle teşekkür ederim. Onların desteği olmasaydı bu tez çalışması mümkün olmazdı. Lisansüstü eğitimim süresince sağlanan burs desteği için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB), 2210-A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Tezin amacı, sanal tarama yöntemiyle belirlenen, bir steroidall saponin olan yamogeninin kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon kapasitelerini Otopetrin proteinleri üzerinden regüle edip etmediğinin belirlenmesidir. Bir diğler amacı da ortam asiditesinin yamogeninin Otopetrin-1 proteini üzerindeki potansiyel etkisini aydınlatmaktır.

Yöntem: Yamogenin'in tek başına ve laktik asitle uyarılmasıyla Caco-2 hücreleri üzerindeki etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Proliferasyon, migrasyon ve OTOP1 protein düzeyleri sırasıyla MTT, yara oluşumu ve ELISA testleriyle değerlendirilmiştir. Ayrıca yamogenin'in Otopetrin protein ailesiyle etkileşimi moleküler doking yöntemiyle analiz edilmiştir.

Bulgular: Yamogenin'in Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi düşük dozlarda dahi görölmüştür asidik ortam ise bu etkinliği arttırmıştır. Düşük doz laktik asitle stimüle edilen hücrelerde proliferasyonda artış gözlenirken yüksek doz laktik asit sitotoksik etki göstermiştir. Migrasyon analizlerinde, yamogenin ve yüksek doz laktik asitin Caco-2 hücre göçünü inhibe ettiğii gözlenmiştir. OTOP1 proteinin ekspresyonu proliferasyon düzeyleri ile ters ilişkili bulunmuştur. Moleküler doking sonuçları da bu bulguları destelemiştir. Yamogenin'in tüm Otopetrin proteinlerine yüksek affinite ile bağlanmış en yüksek bağlanma affinitesini Otopetrin2'nin merkezi cebinde sağlamıştır.

Sonuç: Elde edilen bulgular, yamogenin'in asidik mikroçevre koşullarında Caco-2 hücrelerinde antiproliferatif ve antimetastatik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Asidik ortamın, yamogenin'in hücre canlılığını azaltıcı etkisini güçlendirdiğii ve hücre migrasyonunu baskıladığı belirlenmiştir. Otopetrin1 proteininin kolorektal kanser hücrelerinde ekspresyonu ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca, yamogeninin laktik asit stimölasyonu sonrası Otopetrin1 proteini ile güçlü bir etkileşim gösterdiğii kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar, Otopetrin1'in KKK tedavisinde hedef bir protein olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Yamogenin, asit stimölasyonu, OTOP1, OTOP2, OTOP3, ekşi tat

ABSTRACT

Objective: The aim of this thesis is to investigate whether yamogenin, a steroidal saponin identified through virtual screening, regulates the proliferation and migration capacities of colorectal cancer cells via Otopetrin proteins. Another objective is to elucidate the potential effect of environmental acidity on yamogenin's interaction with the Otopetrin-1 protein.

Method: The effects of yamogenin, both alone and in combination with lactic acid stimulation, were examined in vitro on Caco-2 cells. Proliferation, migration, and OTOP1 protein levels were evaluated using MTT, wound-healing, and ELISA assays, respectively. Additionally, the interaction between yamogenin and the Otopetrin protein family was analyzed using molecular docking methods.

Results: The antiproliferative effect of yamogenin on Caco-2 cells was observed even at low concentrations, and acidic conditions further enhanced this effect. Low-dose lactic acid stimulation increased proliferation, whereas high-dose lactic acid exhibited cytotoxic effects. Migration analysis revealed that both yamogenin and high-dose lactic acid inhibited Caco-2 cell migration. The expression of the OTOP1 protein was found to be inversely correlated with proliferation levels. Molecular docking results supported these findings, showing that yamogenin binds to all Otopetrin proteins with high affinity, with the highest binding affinity observed in the central pocket of Otopetrin-2.

Conclusion: The findings demonstrate that yamogenin exhibits antiproliferative and antimetastatic effects on Caco-2 cells under acidic microenvironmental conditions. The acidic environment enhanced the cytotoxic effects of yamogenin and suppressed cell migration. The expression of the Otopetrin-1 protein in colorectal cancer cells was demonstrated for the first time in this study. Furthermore, it was confirmed that yamogenin interacts strongly with the Otopetrin-1 protein following lactic acid stimulation. These results suggest that Otopetrin-1 may serve as a potential target protein in colorectal cancer therapy.

Key words: Yamogenin, acid stimulation, OTOP1, OTOP2, OTOP3, sour taste

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Kolorektal Kanser	4
2.2. Tat Reseptörleri	5
2.2.1. Ekşi Tat Reseptörünün Tarihi	6
2.2.2. Ekşi Tadın Fizyolojisi	8
2.3. Otopetrin (OTOP) Protein Ailesi	10
2.3.1. OTOP Ailesi Hakkında Moleküler Bilgiler	11
2.3.2. OTOP Ailesi Hakkında Yapısal Bilgiler	13
2.3.3. OTOP 1	26
2.3.4. OTOP 2	37
2.3.5. OTOP 3	39

2.3.6. Laktik Asit ve Kolon	39
2.4. Steoridal Saponinler	43
2.5. Yamogenin(Neodiosgenin)	44
2.6. Yamogeninle İlgili Kanser Çalışmaları	48
3. GEREÇ ve YÖNTEM	51
3.1. In silico	51
3.1.1. Sanal Tarama ile Etken Madde Belirleme	51
3.1.2. Reseptör Proteinlerinin Hazırlanması	59
3.1.3. Ligand Yapısının Hazırlanması	60
3.1.4. Bağlanma Bölgesi (Cep) Analizi ve Grid Merkezlerinin Belirlenmesi	60
3.1.4. Moleküler Doking Çalışmaları	61
3.2. In vitro	63
3.2.1. Kullanılan Gereçler	63
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar	64
3.2.3. Kullanılan Cihazlar	64
3.2.4. Hücre Kültürü Uygulamaları	65
3.2.5. Besiyerlerinin Hazırlanması	66
3.2.6. Yamogeninin Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanması	66
3.2.7. Laktik Asit ile Stimülasyon	66

3.2.8. Sitotoksisite Testi	67
3.2.9. Migrasyon Deneyi	68
3.2.10. OTOP1 ELISA	69
3.2.11. İstatistiksel Analiz Çalışmaları	70
4. BULGULAR	71
4.1. Moleküler Doking Sonuçları	71
4.2. In Vitro Çalışma Sonuçları	75
4.2.1. Sitotoksisite Sonuçları	75
4.2.2. Migrasyon Testi	77
4.2.3. OTOP1 ekspresyonunun ELISA ile gösterilmesi	79
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	97

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1	Tez Çalışmasının Amaçları ve Hipotezleri	3
Tablo 1.1	OTOP1'in potansiyel ligandları	37
Tablo 2.2.	Yamogenin ve türevlerinin en yüksek bağlanma skorlarına sahip hedef proteinleri	46
Tablo 2.3.	Yamogeninin antikanser etkisini araştıran çalışmalar	50
Tablo 3.4.	Sanal tarama sonuçları	52
Tablo 3.5.	Caco2 hücre hattının genel özellikleri	66
Tablo 4.6.	Şekil 4.17'de gösterilen bağlanma pozisyonuna ait moleküler etkileşimlerin tablo formatı	72
Tablo 4.7.	Şekil 4.18'de gösterilen bağlanma pozisyonuna ait moleküler etkileşimlerin tablo formatı	74
Tablo 4.8.	Şekil 4.19'da gösterilen OTOP3 merkezi cep pozisyonuna ait moleküler etkileşimlerin tablo formatı	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Ekşi tat algısında proton akışı ve iyon kanalları	8
Şekil 2.2.	OTOP proteinlerinin yapısal organizasyonu	14
Şekil 2.3.	OTOP kanallarının üç boyutlu yapısı ve vestibül bölgeleri	15
Şekil 2.4.	Otop1 proteininde L5–6 ve L11–12 loop bölgelerinin konumu	17
Şekil 2.5.	OTOP’ların olası proton iletim yolları	17
Şekil 2.6.	OTOP kanalında proton iletiminden sorumlu kalıntılar ve yapısal motifler	22
Şekil 2.7.	OTOP kanalında pH’ya bağlı konformasyonel değişimler ve tuz köprüsü oluşumu	23
Şekil 2.8.	OTOP1’in tahmini kapılanma mekanizması	24
Şekil 2.9.	OTOP1’i oluşturan aminoasitler	26
Şekil 2.10.	OTOP1’in beyaz yağ dokusunda inflamasyon ve insülin direnci üzerindeki etkisi	29
Şekil 2.11.	Yamogenin (Neodiosgenin) molekülünün üç boyutlu yapısı	45
Şekil 2.12.	SwissADME üzerinden yamogeninin özellikleri	46
Şekil 2.13.	Yamogenin’in doğal olarak bulunduğu bitki türleri	47
Şekil 3.14.	RPBS içinde MTiOpenScreen Sayfası	52
Şekil 3.15.	Yamogeninin 3 boyutlu yapısı	62
Şekil 4.16.	Yamogeninin OTOP1 reseptörünün merkezi cep bölgesindeki bağlanma pozisyonu	72
Şekil 4.17.	Yamogeninin OTOP2 reseptörünün merkezi cep bölgesindeki bağlanma pozisyonu	73

Şekil 4.18.	Yamogeninin OTOP3 reseptörünün merkezi cep bölgesindeki bağlanma pozisyonu	76
Şekil 4.19.	Yamogenin'in Caco-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda hücre canlılığı üzerine etkisi	76
Şekil 4.20.	Laktik asitin Caco-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda hücre canlılığı üzerine etkisi	76
Şekil 4.21.	Laktik asit konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak ortam pH'sındaki değişim	77
Şekil 4.22.	Laktik asit ile ön muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinde Yamogenin uygulaması sonrası hücre canlılığı (24 ve 48 saat)	78
Şekil 4.23.	Laktik asitin Caco-2 hücre migrasyonu üzerindeki etkisi	78
Şekil 4.24.	Yamogeninin Caco-2 hücre migrasyonu üzerindeki etkisi	79
Şekil 4.25.	Çözücü Kontrolün Caco-2 hücre migrasyonu üzerine etkisi	79
Şekil 4.26.	50 mM laktik asit stimülasyonu sonrası IC ₅₀ dozunda yamogenin uygulanan hücrelerde 6. saatte migrasyon alanındaki değişim	80
Şekil 4.27.	Yamogenin, laktik asit ve stimülasyon sonrası yamogenin uygulamasının sürelerinde OTOP1 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

Ala: Alanin aminoasiti

ASIC: Asit algılayan iyon kanalı

BCL2A1: BCL2 related protein A1

CASP5: Kaspaz-5

CeOTOP8: *Caenorhabditis elegans* OTOP8

DEDD2: Death effector domain containing 2

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EMT: epitel-mezenkimal geçiş

ER: Endoplazmik retikulum

Glu: Glutamin aminoasiti

GLUT1: Glukoz Transporter 1

GPCR'ler: G-proteinine bağlı reseptörler

HCl: Hidroklorik asit

HDAC: Histon deasetilaz

His: Histidin aminoasiti

KRK: Kolorektal Kanser

LPS: Lipopolisakkarit

MCL1: MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member

NFKBIA: NF-kappa-B inhibitör alfa

NH₃: Amonyak

INF- γ : Interferon- γ

PLC β 2: Fosfolipaz C β 2

ODP: Otopettrin domain protein

OTOP: Otopettrin proteini

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

KZYA: Kısa zincirli yağ asitleri

LDH: Laktat dehidrogenaz

MCT1: Monocarboxylate Transporter 1

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

MTSET: 2-(trimetilamonyum)etil metanotiyosülfonat bromür

RELB: RELB proto-onkogen, NF-kB subunit

ROS: Reaktif oksijen türleri

TAG: Triasilgliserol

TBSD: Tumor break-prone segmental duplication

TM: Transmembran

TMC-1: Transmembran kanal benzeri protein 1

TNFRSF25: TNF receptor superfamily member 25

TRPA1: Transient receptor potential A

TRPV-1: Transient receptor potential vanilloid 1

USH1G: Usher sendromu

QNY triadı: Glutamin–asparajin– tirozin

- : Tire

% : Yüzde

() : Parantez

/ : Bölü

[] : Köşeli Parantez

$\sim$: Yaklaşık

$+$: Artı

$<$: Küçüktür

$=$: Eşittir

$>$: Büyüktür

$\pm$: Artı Eksi

$\approx$: Yaklaşık Eşittir

$\leq$: Küçük eşit

$^{\circ}$: Derece

μ : Mikro

μg : Mikrogram

μg : Mikrogram

μM : Mikromolar

$\text{\AA}$: Angstrom

C° : Santigrat Derece

C : Karbon

Ca : Kalsiyum

Ca^{2+} : Kalsiyum İyonu

CH_3 : Metil

Cl : Klor

Fe : Demir

gr : Gram

H : Hidrojen

Cu^{2+} : Bakır

Ni^{2+} : nikel

Cd^{2+} : Kadmiyum

Zn^{2+} : Çinko

K : Potasyum

kJ : Kilojul

L : Litre

log : Logaritma

Mg : Magnezyum

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimolar

mol :mol

N : Azot

Na : Sodyum

NH : Amino

nm : Nanometre

O : Oksijen

OH : Hidroksil

pH : Hidrojen Potansiyeli

pKa : Asidik İyonlaşma Sabiti

Rg : Dönme Yarıçapı

rpm : Dakikadaki Devir Sayısı

T : Sıcaklık

V : Hacim

x : Çarpı

Zn : Çinko

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

θ : Teta

Π : Pi

Φ, φ : Phi

ψ : Psi

ω : Omega

1. GİRİŞ

Hücre zarları boyunca gerçekleşen proton iletimi, intrasellüler ve ekstrasellüler pH'nın düzenlenmesinden, elektrik sinyallerinin oluşturulmasına kadar birçok biyolojik işlevde rol oynamaktadır. Otopetrinler (OTOP), ökaryotlarda türler arasında korunan ve proton seçici iyon kanalları olarak görev yapan bir protein ailesidir. Otopetrin ailesinin fonksiyonel özellikleri ve yapıları son yıllarda aydınlatılmaya başlanmıştır (Burendei ve ark., 2025).

Otopetrin-1, OTOP ailesine ait membran proteini olarak tanımlanan bir iyon kanalıdır. Memelilerde özellikle iç kulak, mide, beyin, testis ve gastrointestinal sistemde ifade edilmektedir. Temel olarak hücresel pH homeostazının korunmasında ve proton taşınımının düzenlenmesinde görev almaktadır (Sladkov ve ark., 2024). Son yıllarda özellikle tat reseptör hücrelerinde “ekşi tat algısı” ve “amonyum klorür” algısı ile ilişkilendirilmiş olup, aynı zamanda metabolik strese verilen yanıtlarda da rol oynadığı gösterilmiştir (Burendei ve ark., 2025; Ramsey ve ark., 2018)

Güncel çalışmaların bulgularına dayanarak bu kanalın moleküler işleyiş mekanizmasının hala tam olarak anlaşılmadığı görülmektedir. Özellikle de kanalın kapalı, açık ya da duyarsızlaşmış durumda olup olmadığı gibi önemli konular belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca, OTOPI1'in fizyolojik rolleri ve çeşitli patogenez süreçlerindeki olası rolleri de henüz tam olarak ortaya konulamamıştır (Hu ve ark., 2024). Kryo-elektron mikroskopisi ve moleküler modelleme çalışmaları, OTOPI1'in yapısal organizasyonu hakkında önemli bilgiler sunmuştur. Bununla beraber insan OTOPI1 proteininin üç boyutlu yapısı kryo-elektron mikroskopisi yöntemi ile henüz oluşturulmamıştır. Proteinin üç boyutlu yapısı AlphaFold tarafından tahmin edilmektedir (Saotome ve ark., 2019). Özellikle C-domainin hidrofilik kalıntılarla çevrili bir vestibül içerdiği ve bu yapının proton geçişi için kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, domain içi vestibül bölgelerinin de proton taşınımına katkıda bulunabileceği ve iyon geçirgenliğinin dinamik olarak bu iki yapısal alan arasında paylaşıldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, yapılan en güncel çalışmada ilginç bir şekilde moleküllerin merkezi tüneldeki kolesterolü çıkararak kapılanma mekanizmasına dahil oldukları bulunmuştur (Kong ve ark., 2025; Burendei ve ark., 2025).

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde en sık görülen malignitelerden biridir ve metastaz eğilimi oldukça yüksek bir tümör tipidir. Hastalığın uzun yıllar boyunca asemptomik seyretmesi ve ileri dönemlerde meydana bu tehlikeli metastazlardan dolayı KRK, ölüm oranı oldukça yüksek bir kanser türüdür. Bu kanser türünde diğer kanserlere benzer bir şekilde hücreler asidik mikroçevre koşullarına adaptasyon yeteneği kazanmaktadır (Wang ve ark, 2020). Bu adaptasyon, proton taşınımını düzenleyen iyon kanalları üzerinden gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle, OTOPI'in KRK'deki olası rolünün aydınlatılması, asidik stres yanıtı ve tümör hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarının anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

Gastrointestinal kanserlerin tedavisinde çeşitli yöntemler olmasına rağmen, kemoterapi hâlâ tedavinin temelini oluşturmaktadır. Ancak, geleneksel kemoterapi ilaçlarının yan etkileri, bu ilaçların uzun süreli kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, yüksek etkinlik ve düşük toksisiteye sahip yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle, bitkisel bileşenler bu özelliklere sahip olduklarından dolayı uzun yıllar boyunca araştırma konusu olmuştur. Bitkisel bileşenler arasından yamogenin ((25S)-spirost-5-en-3beta-ol, neodiosgenin) antikanser tedavide umut verici bir bileşik olma potansiyeline sahiptir (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2024). Yamogenin, *Dioscorea* türü bitkilerde (yam kökü) doğal olarak bulunan bir steroidal saponin bileşiğidir. Yamogenin ve türevleri, literatürde antiproliferatif, antimetastatik, antiinflamatuvar ve proapoptotik etkileriyle tanımlanmıştır (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2022). Tez çalışmasında yapılan sanal tarama sonucunda, yamogenin'in OTOPI proteinine yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu doğrultuda, literatürdeki sınırlı sayıdaki çalışmalarda bildirilen yamogenin'in bilinen antikanser özellikleri de göz önünde bulundurularak, OTOPI aracılı proton taşınımı veya asit duyarlılığı üzerinden KRK hücrelerinin OTOPI proteini eksprese ettiği; bu ekspresyonun yamogenin uygulaması ve asit stimülasyonu ile değişebileceği, böylece KRK hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon özelliklerinin modüle edilebileceği hipotezi ortaya konmuştur. Tüm bu bilgiler ışığında, asidik mikroçevre koşullarında, virtual screening sonucu belirlenen yamogenin bileşiğinin OTOPI proteini aracılığıyla KRK hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon yeteneği üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, bu tez çalışmasının temel amacını oluşturmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Tez Çalışmasının Amaçları ve Hipotezleri

Tezin Amaçları	Tezin Hipotezi
1. Virtual screening yöntemi ile belirlenen ve bir steroid saponin olan yamogeninin KRK hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon kapasiteleri üzerine etkinliğini değerlendirmek.	1. Yamogenin KRK hücrelerinin proliferasyon yeteneğini azaltır.
2. Belirlenen etkilerin OTOP1 proteini üzerinden olup olmadığını <i>in vitro</i> ve <i>in silico</i> yöntemlerle araştırmak.	2. Yamogenin KRK hücrelerinin migrasyon yeteneğini azaltır.
3. Virtual screening ile seçilen bileşiğin OTOP kanal ailesinin diğer üyeleriyle olan etkileşimini <i>in silico</i> yöntemlerle araştırmak.	3. Kolorektal kanser hücrelerinde OTOP1 proteini eksprese olur.
4. Ortam asiditesinin yamogeninin OTOP1 proteini üzerindeki potansiyel etkisini aydınlatmak.	4. Yamogenin bu etkileri OTOP1 proteinini regüle ederek sağlar.
	5. Bu regülasyon asidozla değişebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde en fazla görülen üçüncü kanser türü ve kanser kaynaklı mortalitenin ikinci en yaygın sebebi olarak kabul edilmektedir. Her yıl dünya genelinde KRK'ya bağlı yaklaşık 1,9 milyon yeni vaka ve 900.000'den fazla ölüm bildirilmektedir (Brenner ve ark., 2023). Üstelik KRK hastalarının beş yıllık sağkalım oranı yalnızca %50 civarındadır. Bu ölümlerin önemli bir kısmı, uzak metastazların neden olduğu komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Karaciğer, KRK metastazlarının en yaygın hedef organıdır ve ölüm riskini belirgin bir şekilde arttırmaktadır (Zhou ve ark. 2019). Buna rağmen KRK vakalarının %20-30'u metastaz sürecinde tanı almaktadır (Svec ve ark., 2024). Hastalığın temel tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyondur. Evre III/IV ve yüksek riskli evre II kolon kanseri hastalarına ise cerrahi rezeksiyonla birlikte adjuvan kemoterapi önerilmektedir (Guo ve Sun, 2022). Bu hastalar için mevcut standart adjuvan tedavi protokolü, fluoropirimidin türevi bir ajanın (5-fluorourasil veya kapesitabin) tek başına ya da oksaliptatin ile kombinasyonu şeklinde 3 -6 ay süreyle uygulanmasından oluşmaktadır (Yang ve ark., 2024).

Kolorektal kanser gelişiminde rol oynayan risk faktörler etiyolojik kökenlerine göre değiştirilemeyen ve değiştirilebilir risk faktörleri olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında etnik köken, erkek cinsiyeti, yaşlılık, kalıtsal mutasyonlar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kistik fibrozis ve akromegali yer almaktadır. Değiştirilebilir risk faktörleri ise hareketsiz yaşam tarzı, obezite, sağlıklı beslenme alışkanlıkları, tütün ve alkol tüketimi, diyabet, insülin direnci ve disbiyozis olarak sıralanmaktadır (Ionescu ve ark., 2023). Değiştirilebilir faktörler arasında beslenme hem hastalığın önlenmesinde hem de prognozunda özellikle önemli bir yer tutmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), KRK özelinde alkollü içecekleri ve işlenmiş etleri insanlar için Grup 1 kanserojen, kırmızı eti ise Grup 2A muhtemelen kanserojen olarak sınıflandırmıştır. Ayrıca, süt ve süt ürünleri, kalsiyum, D vitamini, tam tahıllar ve diyet lifi içeren besinlerin daha diyetle daha fazla yer almasının de KRK riskini azaltılabileceği bildirilmektedir (Papier ve ark., 2025). Enerji kısıtlaması ve aralıklı açlık hem insanlarda hem de hayvan modellerinde KRK riskini azaltmaktadır. Yüksek yağlı

diyet ise hem artan enerji alımına bağlı obezite nedeniyle hem de kendi başına KKK riskini artırmaktadır. Bu durum, artmış hücre proliferasyonu ve tümörijenite ile ilişkilidir. Karbonhidrat açısından zengin diyetlerin ise KKK riski üzerindeki etkisi henüz net değildir. Ketojenik diyet ve keton cisimcikleri, insanlarda yeterince araştırılmamış olsa da hayvan modellerinde KKK riskini azalttığı ve bağırsak kök hücrelerinde NOTCH aktivitesini, kendini yenileme kapasitesini arttırırken sekretuar hücre farklılaşmasını ve proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir. Son olarak, vücut ağırlığında azalma, çeşitli çalışmalarda KKK riskinde anlamlı bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (Sedlak ve ark., 2023).

2.2. Tat Reseptörleri

Tat sistemi, organizmaların çevredeki çözünmüş kimyasalları algılayarak besinlerden en fazla oranda yararlanmasını ve toksik/zararlı bileşiklerden kaçınmasını sağlayan evrimsel bir adaptasyondur (Teng ve ark., 2019). İnsanların algılayabildiği beş temel tat duyusu bulunmaktadır. Bunlar ekşi, tatlı, acı, tuzlu ve umamidir. Canlılar, yüksek enerjili besinler, şekerler ve aminoasitler tarafından oluşturulan tatlı ve umami tatları tercih etmektedir. Acı ve ekşi tatlar ise genellikle potansiyel olarak toksik veya bozulmuş maddelerin göstergesidir ve bu nedenle içgüdüsel bir kaçınma tepkisine yol açmaktadır. Ancak, özellikle insanlarda, bu tatlar bazı durumlarda tam tersine çekici dahi olmaktadır. Buna örnek olarak kahvenin acılığı ya da limonun ekşiliğinin birçok insan tarafından tercih edilmesi verilebilmektedir. Sodyum klorürün (NaCl) tadı da benzer şekilde konsantrasyona bağlı olarak vücut elektrolit dengesinin hassas biçimde düzenlenebilmesi için, konsantrasyonuna bağlı olarak çekici veya itici olabilmektedir (Taruno ve ark., 2021). İlginç bir şekilde, diğer memelilerin bu tatları algılama yetenekleri arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, kediler tatlı tadı algılama yeteneklerini kaybetmiştir (Ganguly ve ark., 2021). Diğer tat türlerinin aksine, ekşi tat hiçbir büyük omurgalı grubunda kaybolmamıştır. Ayrıca gıdalardaki asitliği algılama ve buna tepki verme yeteneğini kaybetmiş bir tür de bulunmamaktadır (Frank ve ark., 2022).

Erken dönem çalışmalarda, dilin farklı bölgelerinin belirli temel tatların algılanmasından sorumlu olduğu ve bu şekilde bir “tat haritası” oluşturduğu klasik bir bilgi olarak yer almaktadır. Ancak sonraki araştırmalar bu modelin doğru olmadığını göstermiştir.

Günümüzde, tat reseptörlerinin büyük ölçüde dilin neredeyse tamamında benzer biçimde eksprese edildiği bilinmektedir. Bunun tek istisnası, amilorid duyarlı tuz tadıdır; bu tat yalnızca dilin anterior bölgesinde algılanmaktadır. Bununla birlikte, özellikle Tip III tat hücrelerinde, farklı dil bölgeleri arasında bazı sinyal moleküllerinin ekspresyon düzeylerinde farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Örneğin, PKD1L3 proteini dilin yalnızca posterior bölgesinde bulunmaktadır (Turner ve Liman, 2022). Dört tip tat hücresi bulunmaktadır. Bu dört hücre tipinden ikisi (Tip II ve Tip III) doğrudan tat sinyallerinin iletiminde görev alırken, Tip IV hücreler bazal kök hücre özellikleri göstermektedir. Tip I hücreler ise glial benzeri hücreler olarak işleve sahiptir (Turner ve Liman 2022). Tatlı, acı ve umami tatlar, T1R veya T2R ailesine ait G-proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler) tarafından algılanmaktadır. Bu reseptörler, fosfolipaz C β 2 (PLC β 2) aracılığıyla TRPM5 kanalını aktive ederek hücre zarında depolarizasyonu ve nörotransmitter salınımına yol açmaktadır. Ekşi ve tuzlu tat algısı bu klasik GPCR aracılı mekanizmadan tamamen farklı bir yol izlemektedir (Ramsey ve DeSimone 2018). Tuzlu tat, iki farklı mekanizma ile algılanmaktadır. Düşük tuz konsantrasyonları, amilorid-duyarlı ENaC kanalları aracılığıyla algılanırken yüksek tuz konsantrasyonları ise hem tuzlu hem de ekşi/acı tatlara duyarlı hücre popülasyonları tarafından algılanmaktadır (Teng ve ark., 2019). Ekşi tat algısından sorumlu özel iyon kanalı ise OTOPI'dir. OTOPI, protonların hücre zarından geçişine izin vererek, asidik uyarının doğrudan elektriksel bir sinyale dönüştürülmesini sağlamaktadır. OTOPI proteini, başlıca Tip III tat reseptör hücrelerinde eksprese edilmekle birlikte, güncel çalışmalar glia-benzeri Tip I tat reseptör hücrelerinde de OTOPI ekspresyonunun bulunduğunu göstermiştir. Bu durum, OTOPI'in yalnızca ekşi tat transdüksiyonunda değil, aynı zamanda tat tomurcuğu mikroçevresinin iyonik ve pH dengesinin korunmasında da rol oynayabileceğine işaret etmektedir (Kaplan ve ark., 2025; Ramsey ve DeSimone 2018).

2.2.1. Ekşi Tat Reseptörünün Tarihi

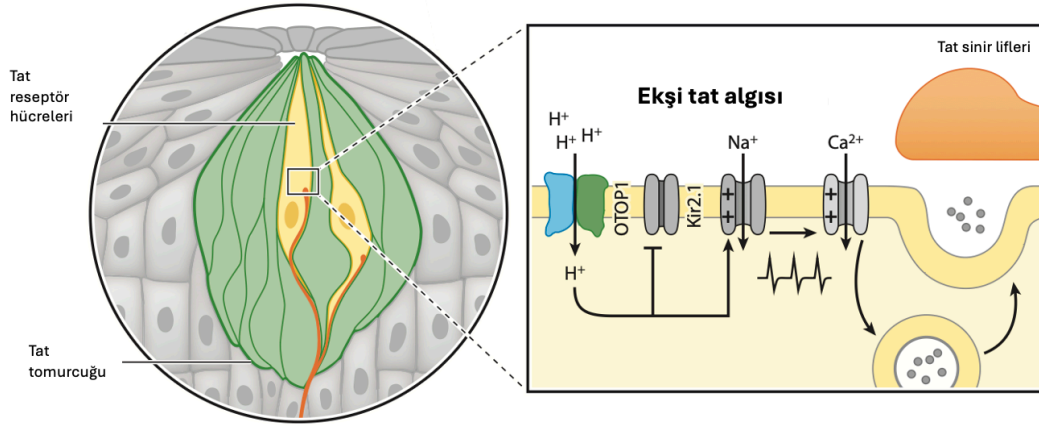
Ekşi tat algısının fizikokimyasal temelleri, 19. yüzyılın sonları ile 20. yüzyılın başlarında hidrojen iyonu (H^+) derişiminin ölçülmesine yönelik çalışmalarla aydınlatılmaya başlanmıştır. Sørensen'in 1909'da pH ölçeğini tanıtması ve Arnold Beckman'ın 1934'te pH metreyi geliştirmesi, bu araştırmaların hızı giderek artmıştır. Özellikle 1934'ten itibaren, tat sistemine ilişkin sinirsel yanıtlar, kraniyal sinirlerden yapılan elektrofizyolojik

kayıtlarla incelenmeye başlanmıştır. Bu yöntemle, dili tat sinirlerinin elektriksel aktivitesi ölçülmüş ve asit uyarılarına karşı sinirsel yanıtların doğası anlaşılmıştır. Saf kimyasallarla yapılan deneylerde hidroklorik asitin (HCl) ekşi tat verdiği, ayrıca sitrik, tartarik ve malik asit gibi organik asitlerin de pH'larına orantılı olarak ekşi algılandığı belirlenmiştir. Bu bulgular, ekşi tat algısında protonların temel belirleyici olduğunu gösteren ilk kanıtları oluşturmuştur (Turner ve Liman, 2022).

Tüm bu çalışmalara rağmen uzun yıllar boyunca tat reseptörleri arasında, ekşi tat en gizemli olanı olarak kabul edilmiştir. Evrimleşen ilk tat duyusu olmasına rağmen ekşi tadı algılayan reseptör uzun yıllar boyunca belirsizliğini korumuştur (Frank ve ark., 2022; Gan ve ark., 2024). Günümüzde moleküler mekanizması en az bilinen tat duyusu olan ekşi tadın asıl reseptörü olan OTOP1 yeni keşfedilmiştir (Li ve ark., 2022). Uyarıcının özgül olmayan doğası göz önüne alındığında, bir protein reseptörünün varlığı başta kesin kabul edilmemiştir. Yıllar içinde en az üç farklı zar proteininin ekşi tat reseptörü olarak işlev görebileceği öne sürülmüştür. Bunlardan ilki asit algılayan iyon (ASIC) kanallarıdır. Ancak yapılan çalışmalar ASIC2'nin genetik olarak devre dışı bırakılmasının, izole edilmiş TRC'lerin asidik uyarılara verdiği yanıtları etkilemediğini, tip III TRC'lerde yapılan patch-clamp kayıtlarında bunu destekler şekilde amiloride duyarlı ASIC kanallarının bulunmadığını göstermiştir. Ekşi tat için ikinci olası reseptör adayı, hiperpolarizasyonla aktive olan ve siklik nükleotidlerle kapılı kanallar (HCN1 ve HCN4) olmuştur. Hiperpolarizasyonla aktive olan kanalların ekşi tat iletimi için gerekli olduğuna dair bir kanıt bulunamamış ve bu kanalların muhtemelen asitlere verilen yanıtları düzenleyici bir rol oynadığı hipotezi öne sürülmüştür (Taruno ve ark., 2021; Turner ve Liman 2022). Son olarak asidik tadın algılandığı tip III tat hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilen bir TRP kanalı olan PKD2L1 kanalı, önerilen kanallar arasından ekşi tadın reseptörünün en güçlü adayı olarak öne çıkmıştır. Ancak, PKD2L1 geni susturulmuş farelerin ekşi tat algısının büyük ölçüde korunduğunun gösterilmesiyle, bu hipotez de geçerliliğini yitirmiştir (Chen ve ark., 2019). 2018 yılında ise Tu ve arkadaşları OTOP1 kanallarının ekşi tadın algılanmasında önemli bir rol üstlendiği keşfetmiş ve Teng ve arkadaşlarının bulguları da bu keşfi doğrulamıştır (Teng ve ark., 2019; YH Tu ve ark., 2018).

2.2.2. Ekşi Tatın Fizyolojisi

Ekşi tat iletiminin ilk basamağı, protonların hücre sitozolüne girişiyle başlamaktadır. Bu proton akışı hücre içi pH'nin düşmesine neden olmaktadır. pH'deki bu azalmayla beraber Kir2.1 dinlenim potasyum kanalı bloke olarak hücre zarında depolarizasyon meydana gelmektedir. Bu da voltajla kapılı Ca^{2+} kanallarını aktive eden aksiyon potansiyellerini tetikleyerek aksiyon potansiyelinin oluşumunu tetiklemektedir (Frank ve ark., 2022; Taruno ve ark., 2021; Teng ve ark., 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Ekşi tat algısında proton akışı ve iyon kanalları (Teng ve ark., 2020).

Ekşi tat, bilindiği üzere canlılarda hem çekici hem de kaçınma davranışı oluşturmaktadır. Örneğin Drosophilalar'da, bazı organik asitlerin düşük veya orta düzeydeki konsantrasyonları çekici etki göstererek beslenmeyi teşvik ederken, aynı asitlerin yüksek konsantrasyonları besin alımını baskılamaktadır. Bu kaçınma tepkisi, çevrede bulunan aşırı asidik besinlerin tüketilmesini engellemektedir (Ganguly ve ark., 2021). Bu davranışın temel nedeni, ekşi tat algısının genellikle gıdalardaki zararlı maddeler veya toksinlerden kaynaklanan asidik uyarılar tarafından tetiklenmesidir (Li ve ark., 2022). Bir diğer nedeni ise asitlerin yalnızca tip III tat hücrelerini değil, ağız boşluğundaki trigeminal nosiseptörleri de uyarmasıdır (Taruno ve ark., 2021). Asidik gıdaların tetiklediği ekşi tadı hoş bulan ve bundan keyif alan canlılar, insan dahil, istisnaidir. Özellikle insan yavruları daha anne karnında ekşi tadı algılayabilmektedir. Ekşi tadın sevilip sevilmemesi ise asit

yoğunluğuna, bağlama, türe ve diğer faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Çoğu asidi tercih eden omurgalı türlerde, asitliğin artmasıyla birlikte çekicilik düzeyi önce artmakta ancak belirli bir eşik konsantrasyondan sonra azalmaktadır. Bu durum genellikle “ters-U şeklinde” bir tercih–kaçınma eğrisi olarak tanımlanır. Örneğin tüm modern insan kültürleri, mikroorganizmaları kullanarak asitliği düşük gıdaları daha ekşi hale getiren yöntemler geliştirmiştir. Ancak mikroorganizmalar tarafından uzun süre fermente olan besinlerden ise ekşi tadından dolayı uzak durulur (Frank ve ark., 2022). Bununla birlikte bazı meyveler, laktik asit bakterileri ve mayalar tarafından fermente edildiğine, zararlı mikroorganizmalarla gerçekleşen tipik çürümeden farklı olarak fermentasyon sürecine girer. Bu süreçte, meyvede bulunan karbonhidratlar parçalanarak laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler oluşur. Bu asitler, hem pH’ı düşürerek zararlı mikroorganizmaların çoğalmasını engeller, hem de besinin korunmasını sağlar. Ayrıca laktik asit bakterilerinin aktivitesi sonucunda meyvelerin enerji değeri, serbest amino asit ve vitamin içeriği artar. Bu biyokimyasal değişimler, besinlerin sindirilebilirliğini artırır ve bitkisel toksinlerin parçalanmasını kolaylaştırır. Dolayısıyla, laktik asit bakterileri tarafından fermente edilmiş meyveler, özellikle besin kısıtlı ortamlarda yaşayan türler için daha güvenli ve besleyici bir gıda kaynağı haline gelir. Bu durum, asidik veya fermente gıdalara yönelimin evrimsel olarak adaptif bir avantaj sağlayabileceğine dair bir hipotezdir (Frank ve ark., 2022).

Ekşi tat, hem organik asitler (laktik asit, sitrik asit, malik asit ve asetik asit) hem de inorganik asitler (hidroklorik asit, nitrik asit ve sülfürik asit) tarafından uyarılabilmektedir. Güçlü inorganik asitler söz konusu olduğunda, ekşi tadı tetikleyen uyarı protondur. Bu nedenle, tamamen iyonlaşan inorganik asitlerin ekşiliği, doğrudan pH ile ilişkilidir. Zayıf ve kısmen iyonlaşan organik asitlerde ise ekşi tat algısı hem serbest protonların derişimine hem de protonlanmış organik asitlerin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu durumun sonucu olarak, aynı pH değerinde test edildiklerinde organik asitler, inorganik asitlere kıyasla daha ekşi olarak algılanmaktadır (Frank ve ark., 2022). Zayıf organik asitler, protonlanmış formları sayesinde hücre zarını doğrudan geçebilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle, uzun süre boyunca ekşi tat algısının bu asitlerin hücre içine difüze olarak hücre içi pH’ı düşürmesiyle ortaya çıktığı düşünülmüştür (proton shuttle hipotezi). Ancak son çalışmalar, bu görüşün ekşi tat algısını tam olarak açıklayamadığını

ortaya koymuştur. Teng ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada, OTOPI proton kanalının fonksiyonel olmadığı koşullarda hem zayıf organik asitlere hem de güçlü asitlere karşı gustatuvar sinir yanıtlarının belirgin biçimde azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgu, hücre zarını geçebilen zayıf asitlerin tek başına ekşi tat algısını oluşturmakta yetersiz olduğunu ve esas proton girişinin OTOPI kanalı aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Dolayısıyla, zayıf asitlerin ekşi tat algısındaki etkisi doğrudan proton taşınımından çok, OTOPI kanalı üzerinden gerçekleşen proton akımına bağımlıdır. Bu sonuçlar, organik asitlerin hücre içine yalnızca proton kaynağı olarak katkı sağladığını, ancak tat hücrelerinde ekşi tat iletiminin temel belirleyicisinin OTOPI kanalı olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Teng ve ark., 2019). Sıçanlar ve farelerde, ekşi tada neden olan güçlü asitlerin algılanması elektrik potansiyeli tarafından modüle edilmektedir. Bu algı, çift değerli katyonlar, özellikle Zn^{2+} iyonları, tarafından bloklanabilmektedir. Ancak, zayıf bir organik asit kaynaklı ekşi tat yanıtları voltajdan ve Zn^{2+} iyonlarından etkilenmemektedir. Bu fark, inorganik ve organik asitlerin tat hücrelerinde farklı iyonik mekanizmalar yoluyla algılandığını göstermektedir. Zayıf asit uyarımı sonucunda hücre içi pH düşüşü serbest Ca^{2+} iyonu konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır. Bu artış, hem hücre içi Ca^{2+} depolarından salınım hem de bazolateral membranda bulunan iyon kanalları aracılığıyla Ca^{2+} girişi yoluyla gerçekleşir. Sonuçta, nörotransmitter salınımını tetiklenir ve tat hücrelerinin sinirsel yanıt oluşur. Bağışıklık hücrelerinde NADPH oksidaz ve voltaj kapılı proton kanalı Hv1, pH ve Ca^{2+} dengesini düzenleyerek hücrel yanıtı kontrol eder. Benzer bir mekanizmanın ekşi tat hücrelerinde de işlediği düşünülmektedir (Ramsey ve DeSimone 2018).

2.3. OTOPI (Otopetritin) Protein Ailesi

Organizmadaki tüm fizyolojik süreçler asit-baz dengesine bağlıdır (Tian ve ark., 2023). Asidik maddelerin algılanması, omurgalıların evrimi kadar eski bir süreçtir (Frank ve ark., 2022). Proton kanalları, hücre zarından proton taşınımını sağlayarak intraselüler ve ekstraselüler pH'ın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Tian ve ark., 2023). Protonlar, hücrel solunum sırasında sürekli üretilen ve vücutta yaygın olarak bulunan en küçük biyolojik ligandlardır. Ayrıca, iyon kanallarını doğrudan kapılayabilir veya diğer uyarıcılara verilen yanıtı modüle ederek kanalın kapanma dinamiklerini etkileyebilirler (Kong ve ark., 2025). Bu yüzden hücre içi proton homeostazının korunması ve hücre dışı

pH'ın izlenmesi, hücre fizyolojisinin en önemli görevleri arasında yer almaktadır (Sladkov ve Kolesnikov 2024). Tüm OTOP kanalları asidik pH'ya yanıt vermekte, ancak bazik pH koşullarında yalnızca OTOP1 ve OTOP2'nin aktive olduğu bilinmektedir (Tian ve ark., 2023). Bu gen ailesinin evrimsel olarak korunmuş olması ve dokular arasında geniş bir dağılıma sahip bulunması, proton kanallarının fizyoloji ve patofizyolojide geniş bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir (Tu ve ark., 2018) OTOP kanalları, normal dinlenme potansiyellerinde proton iletimini gerçekleştirir ve protonların hücre içine girişine aracılık edebilir. Çoğu hücre, proton girişine karşı koruma sağlar çünkü bu durum genellikle sitotoksiktir (Tu ve ark., 2018).

2011 yılına kadar OTOP2 ve OTOP3'ün işlevi anlaşılamamıştır (Hurle ve ark., 2011). Ancak OTOP ailesinin üyelerinin geniş bir doku ağında eksprese olması çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik rolleri olabileceğine işaret etmektedir (Saotome ve ark., 2019; Y. H. Tu ve ark., 2018). Daha yeni karakterize edildiklerinden dolayı günümüzde bile hala işlevleri çok az bilinmektedir. *OTOP2* ve *OTOP3* genleri, işitme kaybı (*DFNA20/26*) ve Usher sendromu (*USH1G*) ile ilişkili genom bölgelerinde yer almakta ve retina ile retinoblastoma veritabanlarında temsil edilmektedir. Bu nedenle söz konusu hastalıklarla ilişkili aday genler olabilirler (Hurle ve ark., 2003).

2.3.1. OTOP Ailesi Hakkında Moleküler Bilgiler

OTOP ailesi üyeleri kendi aralarında benzer gen yapısı göstermektedir. *OTOP2* ve *OTOP 3* genleri sırasıyla *OTOP1*'e %34 ve %30 oranında benzemektedir. Özellikle ekson-intron düzenleri benzemektedir. Ancak 5' UTR ve N-başında kodlayan eksonlarında çeşitlilik bulunmaktadır (Hurle ve ark., 2003). Bu gen ailesinde, *OTOP2* ve *OTOP 3*, *OTOP1*'e kıyasla daha yakın akrabadır. Bu durum, omurgalı genomlarında *OTOP* genlerinin genomik organizasyonu ile de paralellik göstermektedir (Hughes ve ark., 2008); Genomik olarak *OTOP1* tek başına bir lokusta bulunurken *OTOP2* ve *OTOP 3* genomda tandem şekilde aralıksız yan yana bulunmaktadır. *OTOP1* ve *OTOP2-OTOP 3* genlerinin sentenik dizilimi, bu genlerin evrimsel olarak birlikte korunmuş ve işlevsel olarak ilişkili olabileceğinin sinyali vermektedir (Hurle ve ark., 2011).

OTOP1, bilinen kanal, taşıyıcı veya reseptörlerle herhangi bir homolojisi bulunmayan, 12 transmembran (TM) domaini içeren, nemotadlardan insanlara yüksek derecede korunmuş

bir proteini kodlamaktadır (Hughes ve ark., 2008; Hurle ve ark., 2003). Fare *Otop1* geni, sıçan (%95), insan (%77), fugu balığı (*Fugu rubripes*, %44) ve zebra balığı (*Danio rerio*, %41) ile amino asit düzeyinde benzerlik göstermektedir. Bu oranlar, özellikle insan *OTOP1* geninin yüksek oranda korunduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca bu genler evrimsel olarak sentezik kromozom bölgelerinde korunmuştur (Hurle ve ark., 2003). İnsan *OTOP1* geninin kromozomal konumu 4p16.2 olarak tanımlanmıştır (Hurle ve ark., 2003).

Sınır gen bölgesi, bir genin 5' ve 3' uçlarında yer alan, promotör ve diğer düzenleyici dizileri içeren ve genin ifade düzeyini, desenini ve hormonlara ve çevresel sinyallere yanıtını belirlemede kritik rol oynayan DNA bölgeleridir. Bu bölgeler aynı zamanda genetik haritalamada komşu genlerin tanımlanmasında da önemlidir (Bignold 2004; Wallis 1993). *OTOP1*'in genetik durumu ile ilgili bir diğer önemli konu ise insan *OTOP1* lokusunun diğer omurgalıların karşılık gelen bölgelerine göre çok fazla evrimsel değişiklik geçirmiş olmasıdır. Genomik olarak yüksek oranda değişime uğrayan bölgeler, yani mutasyon hotspot'ları, birçok hastalıkla doğrudan ilişkilendirilmiştir. Örneğin kanserde "hotspot"lar, tümörlerde tekrar tekrar ortaya çıkan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar, tümöre avantaj sağladıkları için genellikle korunur, bu da onların işlevsel olma olasılığını artırmaktadır (Gonzalez-Cárdenas ve Treviño 2024).

4p16 bölgesi de yapılan çalışmalarda kolon kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Liu ve arkadaşlarının çalışmasında hastalıkla ilişkili yeni genleri belirleyebilmek amacıyla, adenomlara sahip bireylerin de etkilenen olarak tanımlandığı 121 aileden (toplam 600 birey) oluşan bir grup üzerinde hem bağlantı analizleri hem de genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS) gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, 4p16.3, 6p24.3 ve 10p14 kromozom bölgelerinde hastalıkla ilişkili olabilecek üç potansiyel genetik bölge tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2022). 20/25 omurgalı genomunda *OTOP1* *TMEM 128* ve *DRD15* komşularına sahiptir. Ancak insanlarda *OTOP1*'in arkasındaki kırktan dolayı *OTOP1* ve *DRD15* arasındaki kromozom ters dönmüş ve aralarına 5 milyon bp mesafe oluşmuştur. Üstelik aradaki genler de ters dizilmiştir. Bu tarz yüksek miktardaki inversiyonlar oldukça nadirdir. Popülasyonun %12.5'unda bu bölgede polimorfizm bulunmaktadır. Bu inversiyonla ilgili bir diğer önemli nokta da *OTOP1*'in bulunduğu ters dönmüş segmentin iki tarafın yaklaşık 260 kblik segmental duplikasyonlarla çevrili olmasıdır (Kim ve ark., 2010). *OTOP1* gen bölgesinin çevresinde yer alan bu segmental

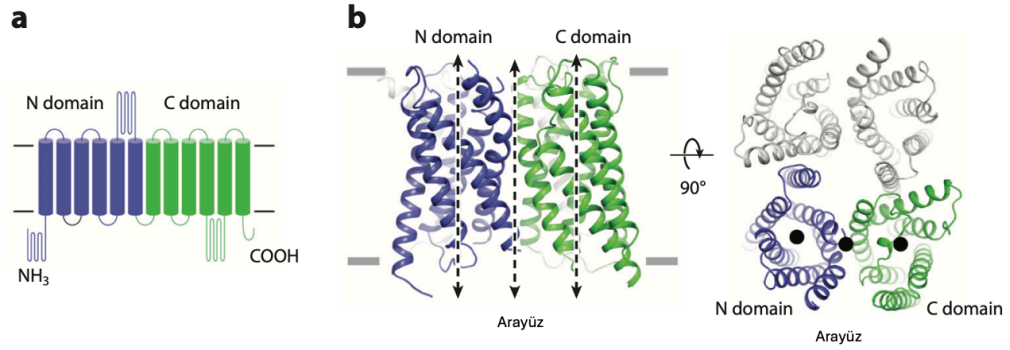
duplikasyonlar, daha özel olarak adlandırılan tümör kırılğan segmental duplikasyon (Tumor Break-Prone Segmental Duplication; TBSD) ailesine aittir. Bu TBSD bölgeleri, DNA kırılmaları ve yapısal yeniden düzenlenmelere eğilimli kromozomal alanları temsil etmektedir. Bu nedenle, *OTOP1* geninin bu tür kırılğan bir bölgeye yerleşmiş olması, genin çevresindeki inversiyon ve yeniden düzenlenme olaylarının evrimsel kökenini açıklayabilir. Nitekim bu TBSD ailesinin yalnızca büyük insansı maymunlarda (insan, şempanze, orangutan) bulunması ve yaklaşık 12–16 milyon yıl önce hominid soyunda ortaya çıkmış olması, *OTOP1* gen bölgesinin hominidlere özgü evrimsel yeniden yapılanmalarla şekillendiğini düşündürmektedir (Hurle ve ark., 2011).

2.3.2. OTOP Ailesi Hakkında Yapısal Bilgiler

Hücreler, ekstraselüler pH'deki değişimleri izlemek için çeşitli integral membran proteinlerini kullanmaktadır. Bu değişimleri, intraselüler pH'deki farklılıkları algılayarak ve ilgili sinyal yollarını aktive ederek değerlendirirler. Bu proteinler arasında proton geçirgen iyon kanalları, ATP ile çalışan H^+ pompaları, ikincil aktif taşıyıcılar ve pH duyarlı reseptörler görev almaktadır (Ramsey ve DeSimone 2018). İyon kanalları hücre sinyalizasyonu ve homeostazının temel yapıtaşısıdır (Y.H. Tu ve ark., 2018). Proton kanalları ise, protonların hücre zarından geçişini sağlayarak hücre içi ve hücre dışı pH'ın yanı sıra zar potansiyelini düzenlemede görev alan iyon kanallarının bir çeşididir (Saotome ve ark., 2019). Günümüze yakın bir zamana kadar ökaryotik hücrelerde yalnızca bir adet proton-seçici iyon kanalı (bağıışıklık hücrelerinde) voltaj-kapılı Hv-1 bulunmuştur (Y. H. Tu ve ark., 2018). Bununla birlikte yakın zaman OTOP ailesi yeni ökaryotik proton ailesi olarak tanımlanmışlardır. Bu ailenin üyeleri M2 ve Hv1 gibi klasik iyon kanallarından oldukça farklı benzersiz bir yapısı vardır ve diğer iyon kanallarından belirgin şekilde ayırmaktadırlar. OTOP 1–3 kanalları hem proton tarafından kapılanan hem de proton iletimi gerçekleştiren özgün iyon kanallardır (Kong ve ark., 2025; Saotome ve ark., 2019). Ayrıca günümüze çok yakın bir zamanda memelilerde yeni proton kanalı daha keşfedilmiştir. TMEM175, protonlarla aktive olur ve lizozomal zarlar üzerinde eksprese edilmektedir. Bu kanal, lizozom içi proton akışını düzenleyerek pH homeostazını korumada görev almaktadır (Li ve ark., 2023). OTOP'ların keşfi, proton taşınımının alternatif mekanizmalarını ve buna bağlı biyolojik süreçleri araştırmak için yeni kapılar açmıştır (Sağsöz ve ark., 2024).

OTOP ailesi proton kanalı ailesi olarak isimlendirilse de OTOP1'in aksine, OTOP2 ve OTOP3'teki akım tersinme potansiyelleri, H^+ iyonları için Nernst potansiyeline tam olarak uymamaktadır. Bu durum, bu kanalların yalnızca protonlara değil, başka iyonlara da geçirgen olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, zaman ve voltaja bağlı kapılanma kinetikleri OTOP1 ve OTOP3'te OTOP2'ye kıyasla daha belirgin görünmektedir; bu da henüz tam olarak aydınlatılamamış farklı kapılanma mekanizmaları olabileceğini göstermektedir (Ramsey ve DeSimone 2018). OTOP kanallarının, dış ortamda bulunan protonları algılayarak kapılanma sürecini başlatma ve bu kanallar aktive olduktan sonra protonları iletme mekanizmaları günümüzde büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır (Li ve ark., 2022).

OTOP proteinleri hücre zarında yer almaktadır (Hurle ve ark., 2003), boyutları yaklaşık $70 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ olan bu kanallar kübik homodimer yapıda bulunmaktadır (Saotome ve ark., 2019). Her bir alt birimleri yapısal olarak benzer amino (N) ve karboksil (C) uçlu alanlara bölünmüştür. Bu birimler, intraselüler alanda bulunan 12 transmembran heliks oluşturduğu dimerik bir mimariyi oluşturmuştur. N-amino-baş alanı bu helikslerden ilk altısını temsil ederken (TM1–TM6) geri kalan altısı (TM7–TM12) ise C-karboksi-kuyruk alanı oluşturur (Şekil 2.2.) (Hughes ve ark., 2008; Saotome ve ark., 2019).



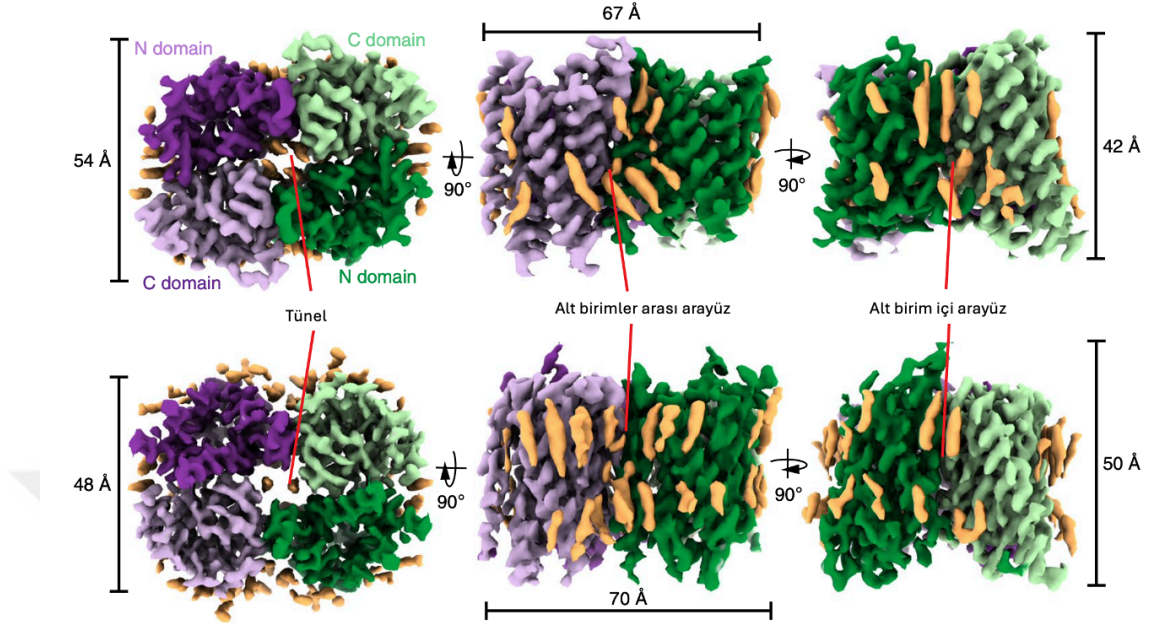
Şekil 2.2. Otop proteinlerinin yapısal organizasyonu (Saotome ve ark., 2019). A) Otopların transmembran görüntüsü B) Otop proteinlerinin yandan ve üstten arayüz görüntüleri

Bu yapıda iki alt birimin N ve C domainleri merkezi bir eksenin etrafında dört kadranı kaplamaktadır ve bu da psödötetramerik bir yapıyı oluşturmaktadır. N ve C domainlerinin

düşük sekans benzerliğine rağmen yüksek yapısal benzerlik OTOP'ların yapısının ilginç bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Li ve ark., 2022). N ve C domainleri arasındaki alt birimler arası ve alt birim içi etkileşimler, yapısal bütünlüğü stabilize etmektedir (Saotome ve ark., 2019). OTOP1 proteininin TM6 ve TM12 transmembran bölgeleri arasındaki altbirimler arası arayüz, yani dimerizasyon bölgesi, TM1 ve TM9 tarafından oluşturulur. Bu bölge OTOP1 ile OTOP3 arasında daha az korunmuştur. Özellikle TM9 bölgesindeki iki triptofan (W394 ve W398) kalıntısı, dimerleşmeyi sağlayan hidrofobik etkileşimler açısından temel öneme sahiptir. Bu amino asitlerin alanin (Ala) ile yer değiştirdiği mutantlarda, proteinler monomerik halde bulunmuş ve proton kanal aktivitesi kaybolmuştur. Bu durum, dimerleşmenin OTOP1'in hücre yüzeyine taşınması ve proton kanalı fonksiyonunun sürdürülmesi için zorunlu olduğunu göstermektedir (Saotome ve ark., 2019).

Moleküler dinamik simülasyonlarında, N ve C domainleri tarafından oluşturulan hidrofilik vestibüller, N- ve C-domainlerinin ara yüzeyinde bulunan alt birim arayüz vestibülleri ve son olarak bu iki domain arasındaki alt birim içi arayüzünde suyun zarın çekirdeğine girmesine olanak tanıyan merkezi vestibül olduğu görülmüştür. Bu gözlem, üç olası proton iletim yolunu etmektedir (Saotome ve ark., 2019; (Kong ve ark., 2025) (Şekil 2.3.):

1. C domainin kendi merkezindeki varsayımsal vestibül
2. N domainin kendi merkezindeki varsayımsal vestibül
3. N ile C domainleri arasındaki ara yüzde bulunan alt birim içi boşluk



Şekil 2.3. OTOX kanallarının üç boyutlu yapısı ve vestibül bölgeleri (Saotome ve ark., 2019).

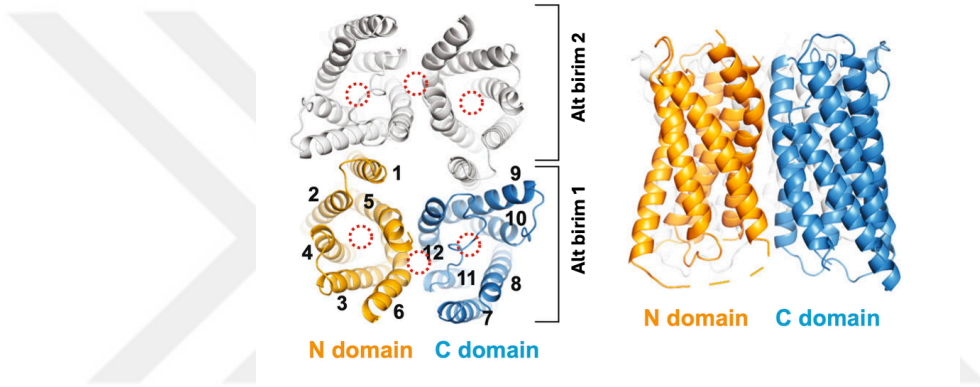
N-domain'deki TM3 ve TM6 ile C-domain'deki TM11 ve TM12'den oluşan hidrofobik arayüz, zarın hücre dışı kısmında iki vestibülün sıkı şekilde paketlenmesini sağlayarak kanalın yapısal bütünlüğünü korumaktadır (Chen ve ark., 2019). Bu vestibüller, birçok polar ve yüklü amino asit kalıntısı içerir ve bunların önemli bir kısmı evrimsel olarak korunmuştur (Saotome ve ark., 2019). Örneğin bu hidrofobik bölgenin merkezinde yer alan yüksek derecede korunmuş asidik kalıntı Glu321, mutagenез analizleriyle de desteklendiği üzere, OTOX kanalının fonksiyonel bütünlüğü için kritik bir rol oynamaktadır (Chen ve ark., 2019).

Üç vestibülden her birinin protonları ayrı ayrı mı ilettiği, yoksa hepsinin birlikte tek bir proton iletim yolu oluşturmak için mi iş birliği yaptığı bilinmemektedir. Bu varsayımsal vestibüllerdeki mutasyonların kanal işlevini ortadan kaldırdığı bulguları literatürde mevcut olsa da protonların bu vestibüller boyunca nasıl iletiliği dair çalışmalara devam edilmektedir (Li ve ark., 2022). OTOX1'in kanal fonksiyonunun hangi mekanizma ile gerçekleştiğini açıklamak amacıyla iki olası mekanizmaya dayanan hipotez öne sürülmüştür (Şekil 2.4.).

1. Kooperatif model: Proton taşıma kanalı, iki domain veya alt birim arasındaki bölgede oluşur ve kanal verimliliği bu domainlerin etkileşimine bağlıdır.

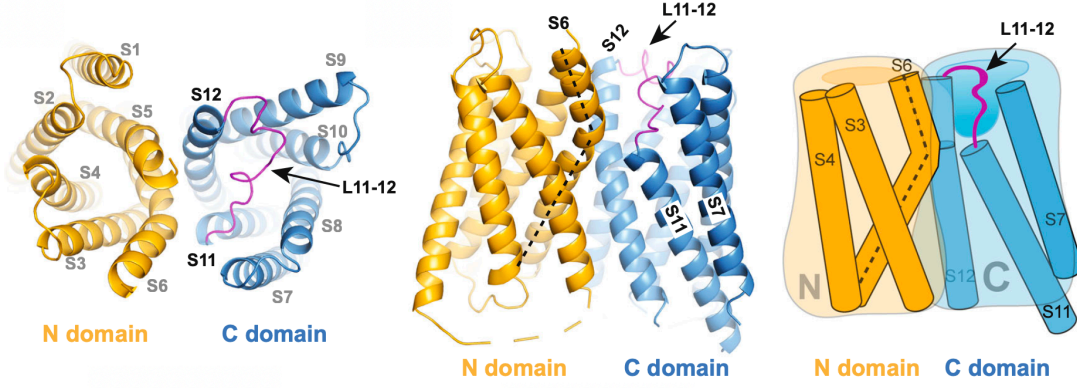
2. Bağımsız model: Her bir domain, kendi içinde ayrı bir proton taşıma yoluna sahiptir. Bu durumda OTOPI, nötr pH'tan sapmalara karşı bağımsız şekilde aktive olan iki proton kanalı gibi davranır.

Bu iki modelin ayırt edilmesi için, OTOPI'nin her bir domaininin ayrı ayrı heterolog sistemlerde eksprese edilerek fonksiyonel analizlerinin yapılması gerekmektedir (Sladkov and Kolesnikov 2024). Bununla birlikte şidmiye kadar yapılan çalışmalar ilk hipotezi destekleyen bulgulara sahiptir.



Şekil 2.4. OTOPI'ların olası proton iletim yolları (Saotome ve ark., 2019).

Loop'lar, bir protein zincirinde bulunan ve belirgin bir ikincil yapıya sahip olmayan, protein yapısı içindeki en esnek ve hareketli bölgeler olarak tanımlanmaktadır. Genellikle protein yapısındaki α -heliks ve β -tabaka gibi düzenli yapıları birbirine bağlamakla görevlidirler. Ayrıca proteinlerin biyolojik işlevleri açısından da kritik roller üstlenmektedirler. Bu bölgeler, antikorların antijenlere bağlanmasında, toksinlerin hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunmasında ve metal iyonlarının proteinlere bağlanmasında aktif olarak görev almaktadır (Shehu ve Kavraki 2012). Bu nedenle, OTOPI'nin mekanizmasının anlaşılabilmesi için loop bölgeleri çalışılmıştır. Özellikle L5-6 ve L11-12 loopları OTOPI mekanizması için önemli bulunmuştur (Şekil 2.5) (Li ve ark., 2022).



Şekil 2.5. Otop1 proteininde L5–6 ve L11–12 loop bölgelerinin konumu (Li ve ark., 2022).

Loop bölgelerinin düşük sekans korunmuşluğuna rağmen, TM domainlerini ayıran 11 loopun 8'inde amino asit sayısı yüksek derecede korunmuştur (Hughes ve ark., 2008). TM3–TM5 (proteinin orta kısmı) ve TM9–TM10 (C-kuyruk bölgesi) ise en fazla korunan bölgeler olarak bulunmuştur. Bu korunan bölgeler, Pfam03189 motifini içermektedir. Otop ailesi yeni keşfedildiği zaman bu bölgedeki 404 aminoasit içeren motif, DUF270-I ve DUF270-II olarak isimlendirilmiştir (Hurle ve ark., 2003). Sonraki yıllarda yapılan çalışmada omurgalı OTOP proteini ile artropod ve nematod DUF270 proteinlerinin birincil dizileri ve ikincil yapılarının çoklu tür karşılaştırması, bu proteinleri kodlayan genlerin tek bir aile oluşturduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca DUF270'ten sonra gelen C-domainde 14 amino asitlik bir motif korunmuştur. FYR (Fenilalanin, Tirozin ve Arjinin) olarak isimlendirilen bu dizi OTOP ailesine özgü bir imza niteliği taşımakta olup tüm OTOP proteinlerinde bulunmaktadır (Hughes ve ark., 2008).

C domaininde yer alan L11–12 loopun benzersiz konumu (Şekil 2.5.), onu C vestibül yapısına giren proton akışını düzenleyebileceği hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur. S11'in daha alçakta konumlanması ve S6'nın bükülmesi nedeniyle, C domainin üst kısmında S7 ile S12 arasında açık bir boşluk oluşmaktadır ve bu boşluk L11–12 loopu tarafından kapatılmaktadır. Üstelik S11–S12 loopunda yer alan dört negatif yüklü kalıntı, C vestibül yapısının üst kısmındaki elektriksel yüzey potansiyelinin negatif olmasına büyük katkı sağlamaktadır. Bu negatif potansiyel sayesinde zıt kutuplar birbirini çekebilir yani protonlar vestibül içerisine çekilebilmektedir. Deneysel bulgular da bu durumu

desteklemektedir: D570 kalıntısının bu loop'un işlevinde önemli ancak elzem olmayan bir rolü bulunmuştur. Özellikle C domainin ekstraselüler alana bakan ve hemen üzerinde olan konumu onu adeta bir kapı bekçisi gibi konumlandığı göstermiştir. Çeşitli aminoasitler arasında, normalde negatif yüklü olan D570'in (aspartik asit) nötrleştirilmesi en belirgin (>%90) etkiyi yaratmış olsa da bu kalıntının (- yüklü) histidine mutasyonu (+ yüklü) kanal aktivitesinin korunmasını sağlamıştır. Bu durum, D570'in işlevinin sadece elektriksel yükü değil, aynı zamanda yapısal bağlamla da ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (Li ve ark., 2022). OTOP kanallarının işleyiş mekanizmasını inceleyen başka bir çalışmada, pH 5.0 ve 8.0 koşullarında belirlenen CeOTOP8 yapılarının, özellikle tamamen korunmuş bir kalıntı olan Glu325 çevresinde, barrellar arası ara yüzde belirgin yapısal farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca mOTOP2 yapıları üzerinden de benzer sonuçlar elde edilerek sonuçlar desteklenmiştir. Düşük pH koşullarında, Glu325 kalıntısının, OTOP1 ve OTOP3 yapılarında olduğu gibi hidrofobik ara yüzeyin merkezine gömüldüğü gözlenmiştir. Asidik bir kalıntının hidrofobik bir ortamda gömülü olduğunda pKa değerinin önemli ölçüde artabileceği dikkate alındığında, bu glutamatın düşük pH koşullarında protonlanmış halde bulunma olasılığı yüksek görülmüştür. Yüksek pH'da ise Glu325'in yan zinciri hücre içi tarafa doğru yönelmektedir. Bu bilgiler ışığında, söz konusu glutamatın OTOP fonksiyonu için kritik bir role sahip olabileceği bildirilmiştir (Gan ve ark., 2024).

Bazı proton taşıyan proteinlerde, su zincirleri bir amino asit kalıntısı tarafından kesintiye uğrar; bu amino asit, proton transferi süreci boyunca protonlanma ve deprotonlanma döngüsüne girmektedir. Proton taşıma yolunda su zinciri bulunmayan bilinen bir proton kanalı olmadığından, bir kanal yapısında su zincirlerini aramak, o kanaldaki potansiyel proton taşıma yollarını belirlemenin bir yolu olarak kabul edilmektedir (Sladkov ve Kolesnikov 2024). *Xenopus tropicalis* Otop3 (XtOtop3)'te QNY triadı (glutamin–asparajin– tirozin) olarak adlandırılan hem N hem de C domainlerinde yüksek oranda korunmuş bir kısıtlama bölgesi keşfedilmiştir. Bu kalıntılar yan zincirleri arasında H bağları kurabilmektedir. Bu bağlar, protonun su molekülleri üzerinden “zıplayarak” ilerlemesine yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda OTOP kanallarının protonlara karşı yüksek özgüllük göstermesi bu triad sayesinde olmaktadır. Bu durum şöyle açıklanabilir; su zincirleri, protonların hücre zarını geçerken kullandığı iletim yolu olarak görev yapar.

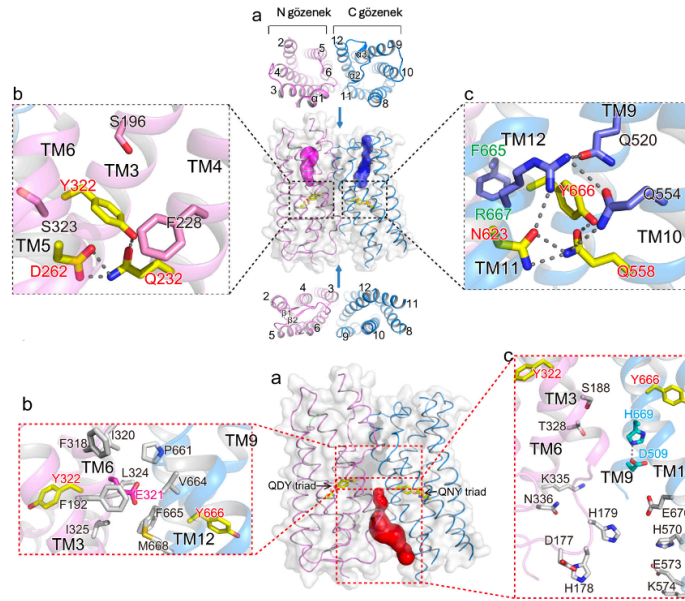
Ancak bu su zincirlerinin sürekliliği, özellikle QNY triadının hemen altındaki hidrofobik kalıntılar nedeniyle sitoplazmik bölgede kesintiye uğramıştır. QNY triadındaki hidrofilik yan zincirler (glutamin, asparajin, tirozin) su molekülleriyle temas ederek su penetrasyonunu kolaylaştırır ve protonların taşınmasını destekler. Bu süreçte proton iletimi, klasik iyon kanallarındaki serbest difüzyonla değil, “water-hopping” (su üzerinden zıplama) adı verilen bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada protonlar, ardışık su molekülleri arasında Grotthuss tipi proton transferi ile hareket etmektedir. Grotthuss tipi proton transferi, protonun su zincirinde bir molekülden diğerine “zıplayarak” ilerlediğini tanımlar (Saotome ve ark., 2019). OTOP kanallarıyla ilgili önemli olan bir diğer aminoasit kalıntısı ise diğer birçok pH’ya bağlı iyon kanalında da anahtar rol üstlenen histidindir. Çoğu durumda, histidin yapısında bulunan imidazol halkası sayesinde düşük pH’ta protonlanır ve artan pozitif yük, bu aminoasidin çevresinde konformasyonel değişiklikleri tetiklemektedir. İnsan OTOP1 proteininde proton algılamasında potansiyel olarak rol oynayabilecek H173, H187 ve H229 olmak üzere üç histidin kalıntısı bulunmaktadır. Bunlar arasında özellikle H229 eskiden kritik bir loop bölgesi olan L5-6’da yer aldığı sanılması, insan OTOP1’e özgül olması ve ekstraselüler alana ulaşabiliyor olması nedeniyle öne çıksa yapılan mutasyon deneylerinin bulguları onun Otop1’in protonlanmasında vazgeçilmez bir eleman olmadığı daha çok büyük bir sistemin parçası olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte H229’daki mutasyonlar hem L5–6 hem de L11–12 yapılarını etkileyerek kapılma mekanizmalarını bozabilir. His173 ve His187 kalıntılarının etkileri ise muhtemelen allosteriktir (Li ve ark., 2022). OTOP1’i aktive eden karvakrol adındaki bir bileşik TM5-TM6 bölgesinde bulunan His229 gibi bazı önemli kalıntılar karvakrol duyarlılığını etkilemektedir. Proton ve alkaliden farklı olarak, karvakrol duyarlılığından sorumlu temel kalıntı TM5–TM6 bağlantısında yüklü bir amino asit değil, treonin (T247)’dir. İlginç bir şekilde, karvakrolün fenolik –OH grubu, hem S134 hem de T247 yan zincirlerinde paylaşılan oksijen gruplarıyla hidrojen bağı oluşturarak kanalın açılmasını kolaylaştırmaktadır (Hu ve ark., 2024). Histidinin önemini destekleyen bir diğer çalışmada da bulgular *Caenorhabditis elegans* OTOP8 (CeOTOP8)’deki His567 kalıntısı, iki barrel arasında, hücre içi tarafta derin bir kavite tabanında yer aldığını ve bu kalıntının yüksek derecede korunmuş bir ara yüzey kalıntısı olduğunu göstermiştir. Düşük pH koşullarında, His567’nin protonlanması ve TM9

üzerindeki Asp439 ile tuz köprüsü etkileşimi oluşturacağı hipotezi ortaya konmuştur (Gan ve ark., 2024). Tuz köprüsü, bir proteinde pozitif yüklü bir amino asit grubu ile negatif yüklü bir amino asit grubu arasında oluşan elektrostatik etkileşimdir. Tuz köprüleri kritik fonksiyonel grupların doğru konumlandırılmasına ve yapısal bütünlüğün korunmasına katkı sağlamaktadır (Donald ve ark.,). Daha önceki çalışmalarda OTOP kanallarının hücre içi arayüz bölgesi, iki vestibül arasında sıkı bir paketlenme yerine çözücüye erişilebilir bir boşluk oluşturduğu ve bu bölgede Asp509 (TM9) ile His669 (TM12) kalıntıları hidrojen bağıyla etkileştiği ortaya konmuştur. Bu iki kalıntı da yüksek oranda korunmuştur ve C-domainindeki kavitede bulunan daralmanın olduğu bölgeye yakın konumlanmıştır. Üstelik His669 (His669Ala ve His669Gln) mutasyonları kanal aktivitesini tamamen ortadan kaldırmış, Asp509 mutasyonları (Asp509Asn ve Asp509Ala) ise kanalın hücre içi pH'ya bağlı hızını belirgin şekilde yavaşlatmıştır. Benzer etkiler, fare OTOP1'deki homolog pozisyonundaki (Asp388) mutasyonlarda da gözlenmiştir (Chen ve ark., 2019).

OTOP1 kapılanma mekanizmasında önemli olabilecek bir diğer kalıntı da Arg232'dir. Arg232 kalıntısının alt birim arayüzde ve TM7/TM12 boşluğunda oluşan vestibül yapısına doğru yöneldiği ve mutasyonunun voltaja bağlı pH eğrisinde gerilemeye neden olduğu gösterilmiştir. (Li ve ark., 2022). Yapısal analizler de bu bulguyu desteklemiştir. OTOP1 kanalında N-domain ve C-domain'in birbirine komşu olduğu alt birim arayüz, zarın her iki tarafından da su moleküllerinin geçişine izin verir; böylece hem hücre içi hem de hücre dışı yönden gelen protonlar için sürekli bir su zinciri oluşur. Bu bölgede yer alan amino asitlerin büyük kısmı hidrofobik özellikte olsa da üç kalıntı özellikle dikkat çekmiştir: Glu267, Arg540 ve His574). Bu kalıntılardan Glu267 ve His574, OTOP ailesi boyunca yüksek oranda korunmuştur, bu da onların yapısal ve işlevsel açıdan kritik roller üstlendiğini göstermektedir (Saotome ve ark., 2019).

Chen ve arkadaşlarının çalışmasında *Xenopus tropicalis*'ten elde edilen XtOTOP'un her bir alt birimdeki iki α -barrel yapısının da proton iletimi yapan yollar olarak işlev görebileceği hipotezi ortaya konmuştur. Çünkü her barrel, hücre dışı ortama açık bir boşluk içermektedir. Bununla birlikte, her iki barreldaki bu boşluklar intrasellüler taraftan kapalıdır. Bundan dolayı bu yol elenmiştir. Hiçbir domaindeki kavite doğrudan iletken bir yol sunmadığından mutasyon analizleri yapılmış ve C-domainindeki vestibül Gln585 ve

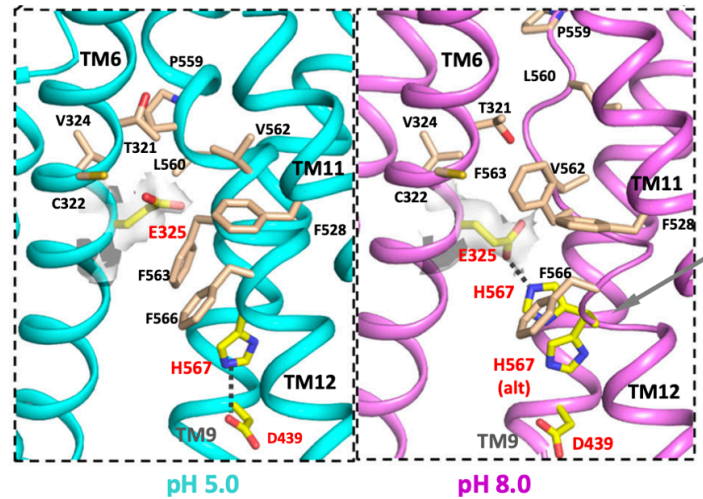
Asn623 kalıntılarına yapılan mutasyonların, iletim akımını ortadan kaldırdığı sonucuna varılmıştır. C domaininde bulunan vestibülde daralmaya neden olan aminoasitlerin çevresinde iki özgün yapısal özellik dikkat çekmiştir. İlki C-vestibülteki Tyr666, OTOP kanallarında yüksek oranda korunan ve OTOP'ların imzası olarak bilinen FYR motifinden (Hughes ve ark., 2008) gelir; bu motif N-vestibülde bulunmaz (Şekil 2.6.) (Chen ve ark., 2019). C-vestibül daralma üçlüsü, N-vestibülde bulunmayan bazı korunan kalıntılar (Gln520, Gln554 ve Arg667) ile geniş bir H bağı oluşturur. Bu kalıntılardan Arg667 FYR motifinin bir parçasıdır ve Gln554, zebrafish OTOP1'deki "backstroke mutant" (Glu429Val) ile eşdeğer pozisyonda yer almaktadır (Chen ve ark., 2019). İlginç bir şekilde çoğu çok alt birimli iyon kanalının aksine OTOP1 ve OTOP3'te kolesterol benzeri moleküller çeşitli bölgelerde yer alarak merkezi tüneli tıkamaktadır. Çalışmalarda bu lipidlerin hücrelerden taşınarak gelmiş ya da saflaştırma ve nanodisk yeniden yapılandırma işlemleri sırasında eklendiği ihtimali göz önünde bulundurulsa da (Saotome ve ark., 2019) ileri dönemlerde elde edilen bulgularla proteinin doğal yapısında bu lipidlerin bulunduğu doğrulanmıştır (Chen ve ark., 2019; Gan ve ark., 2024)



Şekil 2.6. OTOP kanalında proton iletiminden sorumlu kalıntılar ve yapısal motifler. A) OTOP1'in N-baş (pembe) ve C-kuyruk (mavi) bölgeleri, proton iletiminde rol oynadığı düşünülen α -heliks yapılarıyla birlikte gösterilmiştir. B) N-domain'in iç kısmında yer alan TM3–TM6 arasında bulunan hidrojen bağları ve iyon etkileşimleri, proton geçişi için olası bir altbirimler arası arayüz oluşturur. C) C-domain içinde TM9–TM12 arasında konumlanan kalıntılar, iki alt birim arasındaki altbirimler arası arayüz bölgesini oluşturmakta ve proton iletiminde kritik rol oynayan polar kalıntıların (ör. His, Asp, Glu) karşılıklı etkileşimlerini göstermektedir. (Chen ve ark., 2019).

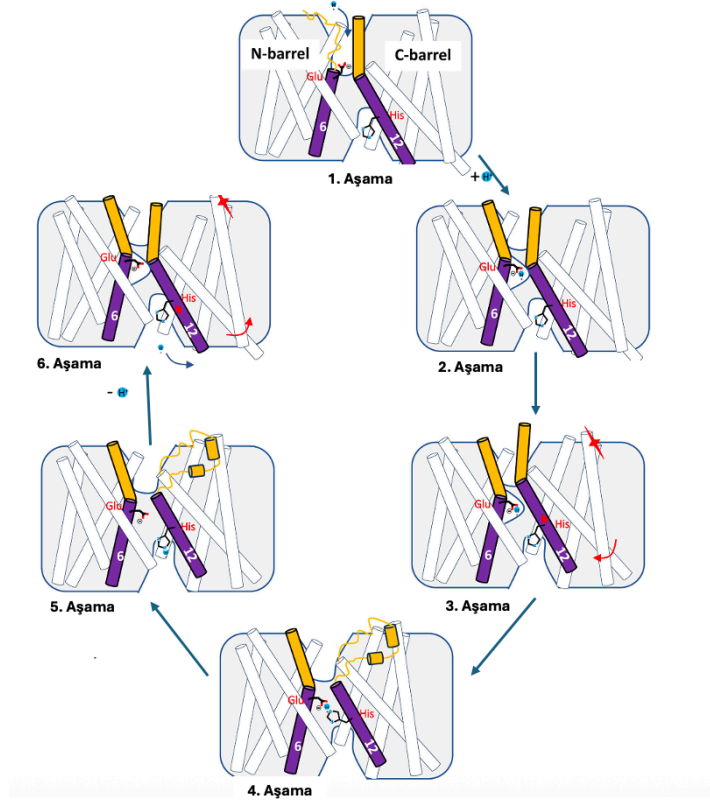
Merkezi tünelin kolesterolle tıkanmış olmasından dolayı iyon geçişi için uygun bir yol oluşturmadığı bildirilmiştir. Ancak yapısal karşılaştırmalar merkez bölgedeki aminoasit kalıntılarının, genel olarak omurgalı OTOP proteinleri arasında yüksek derecede korunduğu ve bu korunumun özellikle zebra balığı ve memeli türlerine ait OTOP1 dizileri arasında daha da belirgin olduğu görülmüştür. Üstelik sanal taramayla bulunan C.2.2. adı verilen kanalı inhibe eden molekülün bu bölgeye bağlandığı ve ilginç bir şekilde endojen kolesterol moleküllerinin yerini aldığı sonucuna varılmıştır (Burendei ve ark., 2025).

OTOP kanallarında proton iletimi süreci birden fazla adımı içeren çok aşamalı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. OTOP'ların kapılanma mekanizmasını anlamak için yüksek pH'daki konformasyonel değişiklikleri anlamak önemlidir. Gan ve arkadaşlarının çalışmasında gösterildiği üzere düşük pH'dan yüksek pH'a geçiş sırasında TM12 heliksi, düşük pH'da yüksek oranda korunmuş bir Pro559 kalıntısına bir bükülme oluşturmaktadır. Yüksek pH'da ise Pro559 öncesindeki TM12'nin N-baş kısmı çözülerek loop haline dönüşmektedir. Bu heliks-döngü yapısal geçişi, Phe563'ün yukarı yönelmesine ve böylece His567'nin yukarıya dönmesi ile Glu325'in aşağıya dönmesi için gerekli boşluğun oluşmasına olanak tanımaktadır. Yüksek pH'da, His567'nin yan zinciri (imidazol halkası), baskın konformasyonunda ekstraselüler tarafa doğru "yukarı" döner ve Glu325 ile bir tuz köprüsü oluşturmaktadır (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. OTOP kanalında pH'ya bağlı konformasyonel değişimler ve tuz köprüsü oluşumu (Gan ve ark., 2024).

Ancak mOTOP2'deki eşdeğer kalıntılar (Glu250 ve His551) birbirinden çok daha uzakta bulunur. Bu durum, proton aktarımı gerçekleşmeden önce, bu kalıntıların birbirine yaklaşmasını sağlayacak ek bir konformasyonel değişimin olduğunu göstermektedir. Gerçekleşen C-barrel salınım hareketi, His551'in Glu250'ye yaklaşmasını sağlamakta ve böylece tuz köprüsü oluşabilmektedir. Karşılaştırmalı mutagenез analizleri sonucunda bu alt birimler arası hareketin kanal aktivitesinin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (Gan ve ark., 2024). OTOP proteinlerinde olası proton iletimi aşamaları Şekil 2.8.'de anlatılmıştır. Bununla birlikte yayınlanan güncel bir çalışmada Otop1'in merkezinde bulunan A1384 kalıntısının mutasyonunun fonksiyonel kalması, önerilen tuz köprüsünün kanal işlevi için zorunlu olmadığını, ancak kanal kapanmasında değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir (Burendei ve ark., 2025).



Şekil 2.8. 1. Aşama) TM6 heliksinin N-baş kısmında bulunan bir loop konformasyonu, glutamat kalıntısının ekstraselüler ortama maruz kalmasına ve protonlanmasına olanak tanır. 2. Aşama) Protonlanma gerçekleştiğinde, TM6'nın N-başındaki loop-heliks geçişi, protonu taşıyan glutamatın yan zincirini, barreller arası ara yüzeyin ortasına taşır. mOTOP2 yapısında gözlenen iki konformasyon, bu ilk iki durumu (1 ve 2) temsil etmektedir. 3. Aşama) CeOTOP8 yapıları, sürecin bir sonraki iki aşamasını (3 ve 4) yansıtmaktadır. Bu aşamada, C-barrel yukarı doğru bir salınım hareketi yaparak, histidinin glutamata yaklaşmasını sağlar ve böylece proton aktarımı gerçekleşebilir hale gelir. 4. Aşama) TM12'nin N-başında gerçekleşen heliks-loop geçişi, histidinin yukarı dönerek, protonlanmış glutamatla bir tuz köprüsü

oluşturması için gerekli boşluğu oluşturur. 5. Aşama) Histidin protonu kabul ettikten sonra, yan zinciri intraselüler alana doğru geri döner ve bu sırada protonu sitozolik çözeltiye bırakır. 6. Aşama) Histidin bu hareketini takiben, TM12'nin N-başı yeniden heliks yapısını kazanır ve C-barrel aşağı doğru salınır. Böylece glutamatın yan zinciri tekrar barrellar arası ara yüze döner ve hücre dışından yeni bir proton alarak süreci yeniden başlatmaya hazır hale gelir (Saotome ve ark., 2019).

Alkali maddelerin genellikle bazik amino asitlerle etkileşime girmesi nedeniyle, fare OTOPI1'in ekstrasellüler bölgesinde yer alan bazik amino asitlerde alanin taraması yapılmıştır. Vahşi tip OTOPI1'de, ortam bazikleştikçe akımlar düzenli bir şekilde artmıştır. Ancak, Lys221Al mutasyonu (S5–S6 bağlantı bölgesinde bulunur) ve Arg554Al mutasyonu (S11–S12 bağlantı bölgesinde bulunur) bu artışı önemli ölçüde azaltmıştır. Üstelik, bu mutasyonların asitle uyarılan akımlar üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Ayrıca asidik ortamda diğer iyonlara geçirgen olmayan OTOPI1'in bazik ortamda Na⁺, K⁺, Cs⁺ ve Li⁺ katyonlara geçirgen olabileceği bulunmuştur (Tian ve ark., 2023). Yapılan başka bir çalışmada fare OTOPI1 proteininde, TM6–TM7 bağlantı bölgesinde yer alan korunmuş bir hücre içi ArgR292 kalıntısının mutasyona uğratılması, asit uyarılarına verilen yanıtlar korunmuş, NH₄Cl'ye verilen yanıtların belirgin biçimde azalmasına yol açmıştır. Bulgular OTOPI1'de asit ve baz aktivasyonları farklı moleküler bölgeler tarafından yönetildiğini göstermektedir (Liang ve ark., 2023). OTOPI1 kanalının en dikkat çekici özelliği, hücre dışı pH'ın nötr değerden herhangi bir yönde sapmasına yanıt olarak aktivitesinin artması, yani modülatör bir davranış sergilemesidir. Özellikle N ve C domainleri, bu çift yönlü pH yanıtının temelini oluşturmaktadır (Sladkov ve Kolesnikov 2024). N-domain ve C-domain arasında belirgin bir elektriksel asimetri bulunmaktadır. N-domain'in ekstrasellüler kısmı boyunca yük dağılımı oldukça negatiftir, buna karşın C-domain, hücre dışı tarafta negatif yük taşıırken, zar düzlemi bölgesine yaklaştıkça pozitif yüklü hale gelmektedir (Saotome ve ark., 2019).

İyon kanallarının fonksiyonlarını tam olarak anlayabilmek için, posttranslasyonel modifikasyonların da ayrıntılı biçimde incelenmesi gerekmektedir. Posttranslasyonel modifikasyonlardan biri olan glikozilasyon, birçok iyon kanalının katlanması, hücre zarına taşınması, stabilitesi ve aktivitesi üzerinde düzenleyici bir role sahiptir. Ancak literatürde, glikozilasyonun OTOPI1'in işlevi üzerindeki etkisini doğrudan inceleyen yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Çalışmada, OTOPI1'in TM5- TM-6 bölgeleri

arasındaki loopda yer alan Asp238 ve Asp251 kalıntıları N-glikozilasyona uğradığı ve bu bölgelerin, kanalın zar yüzeyine taşınması ve maksimum proton iletimi için kritik olduğu belirlenmiştir (Sasaki, Yano-Nashimoto, ve Yamaguchi 2024).

2.3.3. OTOPI

OTOP1, otopetrin ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. İlk olarak 2003 yılında tanımlanmış ve vestibüler otokoni oluşumu için gerekli olduğu ve iç kulakta keşfedildiği için ismini yunanca ‘oto’ (kulak) ve ‘petros’ (taş) kelimelerinin birleşiminden almıştır (Hughes ve ark., 2008; Hurle ve ark., 2003). 2021 yılında genom çapında yapılan bir ilişki çalışmasında vestibular hastalıklardan biri olan ve otokonyumun çıkarılmasıyla meydana gelen benign paroksizmal pozisyonel vertigo da OTOPI ile ilişkilendirilmiştir (Skuladottir ve ark., 2021). OTOPI proteini, 612 aminoasitten oluşmaktadır (Şekil 2.9.).

Length 612	Last updated 2003-12-15 v1							
Mass (Da) 67,353	MD5 Checksum ⁱ FE79FE72A3C5384DA3466DD44C2AD272							
10	20	30	40	50	60	70	80	90
MLEGLGSPAS	PRAAASASVA	GSSGPAACSP	PSSSAPRSPE	SPAPRRGGVR	ASVPQKLAEM	LSSQYGLIVF	VAGLLLLLAW	AVHAAGVSKS
100	110	120	130	140	150	160	170	180
DLLECFLTALM	LLQLLWMLWY	VGRSSAHRRL	FRLKDTHAGA	GWLRGSITLF	AVITVILGCL	KIGYFIGFSE	CLSATEGVFP	VTHSVHTLLQ
190	200	210	220	230	240	250	260	270
VYFLWGHAKD	IIQSFKTLER	FGVIHSVFTN	LLWANGVLN	ESKHQLNEHK	ERLITLGFGN	ITTVLDDHTP	QCNCPTPTLC	TAISHGIYYL
280	290	300	310	320	330	340	350	360
YPFNIEYQIL	ASTMLYVLWK	NIGRKVDSDQ	HQKMQFKSDG	VMVGAVLGLT	VLAATAVVV	VYLIHIGRSK	TKSESALIMF	YLYAITLLML
370	380	390	400	410	420	430	440	450
MGAAGLAGIR	IYRIDEKSLD	ESKNPARKLD	SDLLVGTASG	SWLISWGSIL	AILCAEGHPR	YTWYNLPYSI	LAIVEKYIQN	LFIFESIHRF
460	470	480	490	500	510	520	530	540
PEKLSEDIQT	LRVVTVCNGN	TMPLASSCPK	SGGVARDVAP	QKDMPPAAN	GNVCMRESHD	KEEEKQEESF	WGGSPSPVRL	PRFLQGNAGR
550	560	570	580	590	600	610		
KVLRNIAAFL	FLCNISLWIP	PAFGCRPEYD	NGLEEIVFGF	EPWIIIVNLA	MPFSIFYRMH	AAASLFEVYC	KI	

Şekil 2.9. OTOPI’i oluşturan aminoasitler

OTOP1 protonların (H^+ iyonlarının) hücre zarından geçişini sağlayan alışılmadık bir yapıya sahiptir. Çoğu iyon, pozitif veya negatif yüklü çeşitli iyonların taşınmasını sağlamaktadır. Ancak OTOPI’in de içinde bulunduğu OTOPI ailesi, bugüne kadar tanımlananlar arasında sadece proton (H^+) taşıyabilen tek iyon kanalı ailesidir. OTOPI’in segmentler çift namlulu (double-barrel) mimarisi, diğer bilinen iyon kanallarında görülmeyen yeni bir protein katlanma tipi sergilemektedir. Üstelik hem tat algısı hem de

metabolik düzenleme gibi farklı sistemlerde görev almaktadır (Frank ve ark., 2022). *OTOP1*, retina (Hurle ve ark., 2011), beyaz ve kahverengi yağ doku (Wang ve ark., 2014), vestibular ve tat hücreleri, uterus, dorsal root gangliyonları, stimüle mast hücreleri (Y. H. Tu ve ark., 2018), timus, kalp, böbrek, deri, mide, adrenal bez ve meme bezinde eksprese edilmektedir (Hurle ve ark., 2003).

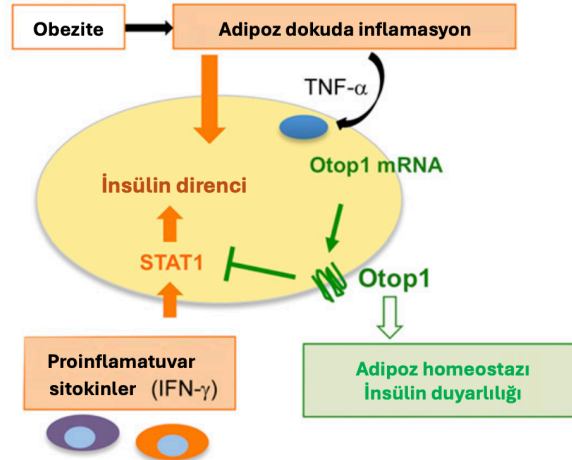
Bu proteinin aşırı ekspresyonu, transfekte edilmiş hücre hatlarında purinerjik aracılı Ca^{2+} homeostazını modüle etmektedir. Bu durum endoplazmik retikulum (ER) Ca^{2+} depolarının tükenmesine yol açmakta ve aynı zamanda ATP, ADP ve UDP'ye yanıt olarak aktive olan endojen purinerjik reseptör P2Y'nin spesifik inhibisyonuna neden olmaktadır. Normalde ATP, P2Y reseptörleri aracılığıyla Gq proteinlerini aktive etmekte ve IP3 sinyal yolunu tetikleyerek ER'deki Ca^{2+} depolarının boşalmasına neden olmaktadır. Ancak *OTOP1* ekspresyonu, P2Y aracılı bu mekanizmayı baskılamakta ve ekstrasellüler ortamdan hücre içine Ca^{2+} girişini düzenleyerek bu süreci kendi aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Hughes ve ark., 2007). Bununla birlikte ekstrasellüler ortamda yeterli Ca^{2+} bulunmadığı durumlarda *OTOP1* P2Y'yi baskılayamamaktadır (Kim ve ark., 2010). *OTOP1*'in ER'deki IP3-duyarlı Ca^{2+} depolarını tüketmesi, diğer Gq-bağımlı GPCR'lerin aracılık ettiği Ca^{2+} artışlarını engellemek için yeterli olmamaktadır. *Otop1* eksprese eden hücrelerde Gq sinyal iletim kaskadının sağlam olması *OTOP1*'in P2Y reseptörlerinde Gq aktivasyonunun öncesinde etkileştiğini düşündürmektedir. Ayrıca, *Otop1* ATP'ye yanıt verebilmek için ekstrasellüler Ca^{2+} 'a ihtiyaç duymaktadır. Bu yönüyle fonksiyonu, ekstrasellüler Ca^{2+} girişini aracılık etme özelliğiyle bilinen P2X reseptörlerinin aktivitesine benzerlik göstermektedir (Hughes ve ark., 2007). Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *OTOP1*'in özellikle ATP ve UTP'ye yüksek afinitesi olan intraselüler Ca^{2+} akışından sorumlu P2Y reseptör alt tiplerinden P2Y2 ve P2Y4'ü inhibe ettiği *in vivo* olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte ADP ve UDP'ye duyarlı olan P2Y6, P2Y12, P2Y13 ve P2Y14 *OTOP1*'den etkilenmemiştir. Üstelik bu işlevi göstermesi için tek bir alel yeterli gelmiştir (Kim ve ark., 2010). *OTOP1*'in Ca^{2+} homeostazını etkilediğini gösteren başka bir çalışmada da COS-7 hücrelerinde heterolog olarak eksprese edilmesi, transfekte edilmemiş kontrol hücrelerine kıyasla ATP'ye verilen Ca^{2+} yanıtlarında azalmaya yol açmıştır (Sladkov ve Kolesnikov 2024). Ayrıca, lateral kesici dişlerde mikrodonti olarak tanımlanan peg lateralis görülen kişilerin genom

analizleri, bu diş gelişim bozukluğunun Otop1 geninde nokta mutasyon taşıyan bireylerde daha sık ortaya çıktığını göstermiştir (Choi ve ark., 2025; Lee ve ark., 2024). Tüm bu bulgular, OTOPI'in henüz tanımlanmamış bir mekanizma aracılığıyla hücre içi Ca^{2+} düzenlenmesinde rol oynadığı fikrini desteklemektedir (Sladkov ve Kolesnikov 2024).

Purinerjik reseptörler aracılığıyla hızlı Ca^{2+} pikleri oluşurken, OTOPI aracılı Ca^{2+} girişi daha çok plato şeklinde seyretmektedir. Şimdiye kadar Otopetrinler dışında başka hiçbir protein ailesinde ER depolarının boşalması, P2Y inhibisyonu ve Ca^{2+} influxunun birlikte düzenlenmesi gözlenmemiştir. Ayrıca, hiç P2 reseptörü bulunmayan rat osteosarkoma hücrelerine transfekte edilen OTOPI'in, hücrelerde ATP'ye bağlı Ca^{2+} yanıtı oluşturabilmesi oldukça dikkat çekicidir. İlginç bir şekilde, OTOPI dizisinde klasik ATP bağlanma bölgeleri, seçicilik porları veya G-protein bağlanma motifleri bulunmamaktadır (Hughes ve ark., 2007). OTOPI'in iletkenliğinin başka iyonlara veya özgül çözünen maddelere bağımlı olmaması, bu proteinin bir H^+ taşıyıcısı değil, H^+ kanalı olduğunu güçlü biçimde desteklemektedir (Turner ve Liman 2022). Tip I hücrelerinin Tip II hücrelerinden salınan nörotransmitter ATP'yi uzaklaştırarak tat tomurcuğu içindeki purinerjik sinyalleşmeyi düzenlediği düşünülmektedir. Yeni bulgular OTOPI'in Tip I hücrelerde de eksprese edildiğini göstermektedir. Üstelik, Tip I hücrelerinin kemosensör aktivasyonu algılayabildiğini ve sinaptik iletişim süreçlerine katıldığını, dolayısıyla merkezi sinir sistemindeki glial hücrelere benzer şekilde üçlü sinaps yapılarında rol oynayabileceğini göstermiştir (Kaplan ve ark., 2025).

OTOPI'in purinerjik reseptörlerle ilişkisini inceleyen çalışmadan sonra uzun bir süre bu konuda başka araştırma yapılmamış ancak 2014 yılında, obeziteye bağlı beyaz yağ dokusu inflamasyonuna karşı gelişen antiinflamatuvar yanıt ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada, obezite ve sitokinler (TNF- α ve IL-6) tarafından indüklenen inflamasyona yanıt olarak ortaya çıkan STAT1 aracılı interferon- γ (INF- γ) salınımının, OTOPI'in STAT1 inhibisyonu yoluyla baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 2.10.). STAT1 aktif olmasa bile OTOPI onunla etkileşim halinde bulunmuştur. Buna ek olarak yapılan mikrodizileme analizinde Otop1 mutant farelerde INF- γ hedefli genlerin ekspresyon seviyelerinde (*Oasl1*, *Oasl2*, *Ifi44*, *Ifitm3*, ve *Ifih1*) belirgin bir artış gözlenmiştir. Normal farelere kıyasla Otop1 mutant farelerde yüksek yağlı diyeteye bağlı artan insülin direnci ve karaciğer

yağlanması bulguları *OTOP1*'in kronik inflamasyonu baskılayarak metabolik homeostazı sağladığını göstermiştir. Ayrıca bu farelerde adipoz doku inflamasyonu ve makrofaj infiltrasyonu (M1/M2 oranında artış) daha fazla artmıştır. Bir diğer önemli bulgu ise zayıf farelerde *Otop1* mRNA ekspresyonunun kahverengi yağ dokuda tespit edilebilir düzeyde olması ancak epididimal beyaz yağ dokuda çok düzeylerde kalmasına rağmen yüksek yağlı diyetle indüklenen obezite sonrası beyaz yağ dokudaki *OTOP1* mRNA düzeylerinin çok fazla artmış olmasıdır. Çalışmanın diğer ayağında vahşi tip farelerle leptin reseptörü eksikliği olan farelerin *OTOP1* ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış ve leptin reseptörü eksik olan farelerin epididimal beyaz yağ dokusundaki *OTOP1* mRNA düzeylerinin 80 kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Benzer artış obez farelerin inguinal yağ dokusunda da görülmüştür. Ayrıca vücut ağırlığı ile *OTOP1* mRNA ekspresyonu arasında da korelasyon görülmüştür (Wang ve ark., 2014).



Şekil 2.10. *Otop1*'in beyaz yağ dokusunda inflamasyon ve insülin direnci üzerindeki etkisi (Wang ve ark., 2014).

Otop1 geni susturulan farelerinin yüksek yağlı diyetle beslendiklerinde artmış insülin direnci, hepatik steatoz ve yağ dokusu inflamasyonu gösterdikleri bu fenotip, anormal kahverengi yağ dokusu fonksiyonu ile tutarlıdır. Bu yüzden, *OTOP1*'in kahverengi yağ dokusundaki işlevi araştırılmış ve *OTOP1* eksik hücreler ile farelerin termal ve metabolik fenotipleri incelenmiştir. RT-qPCR analizleri, *Otop1* geninin fare kahverengi yağ dokusunda yüksek düzeyde eksprese edildiğini doğrulamıştır. Analiz sonuçlarına göre, kahverengi yağ dokusundaki *Otop1* mRNA düzeyi, inguinal beyaz yağ dokusuna göre 6,3

kat ve epididimal beyaz yağ dokusuna göre 46,2 kat daha yüksek bulunmuştur. Buna karşılık, *Otop1* geninin silindiği farelerde bu düzeyin yaklaşık %35 oranında azaldığı belirlenmiştir. *Otop1* geninin kaybı, maksimum mitokondriyal solunumda belirgin bir azalma gözlenmiş ve bu değer bazal seviyenin %54'üne düşmüştür. Dolayısıyla, *Otop1* geninin kaybı bazal solunumu etkilemeden, maksimum solunumu azaltmıştır. Bu bulgu, OTOPI1'in mitokondriyal performans ve hücrel stres yanıtında düzenleyici bir role sahip olabileceğini göstermektedir. Ek olarak, β 3-adrenerjik agonist ile yapılan uyarım deneylerinde *Otop1*^{-/-} farelerin kahverengi yağ dokusunun enerji harcamasının kontrol gruplarına göre daha fazla arttığı, ancak palmitat varlığında bu etkinin ortadan kalktığı bildirilmiştir. Bu sonuç, *Otop1*'in kahverengi yağ dokusunda β 3-adrenerjik uyarana verilen metabolik yanıtı yağ asidine bağımlı biçimde düzenlediğini düşündürmektedir (Tu ve ark., 2023). Yayımlanan güncel bir çalışmada *Otop1* geni susturulmuş farelerin kahverengi adipositlerinde OTOPI1 proteininin fonksiyonel ifadesi ve rolünü incelenmiştir. Bulgular farklılaşmış kahverengi adipositlerin OTOPI1'e bağlı H⁺ akımlarına sahip olduğunu göstermiştir. Sitoplazmik pH ölçümleri ise asidik çözeltilere maruz bırakıldığında hücre içi pH'nin OTOPI1'e bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca *Otop1*'in inhibitörleri kullanılarak kanalın baskılandığı gösterilerek OTOPI1'in gerçekten fonksiyonel bir proton kanalı olduğunu desteklenmiştir. Tüm bu bulgular, gelecekte OTOPI1'in kahverengi yağ dokusunda enerji metabolizması ve pH düzenlemesi üzerindeki rolünün daha fazla araştırılması gerektiğini desteklemektedir (Islam ve ark., 2025).

OTOPI1'in ekşi tat reseptörü olabileceği ilk kez 2018 yılında, Prof. Liman'ın grubundan Tu ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada ortaya konmuştur. Ökaryotik canlılarda proton kanalları üzerine çalışan grubun fareler üzerinde yaptığı transkriptomik araştırmalarda Zn²⁺ya duyarlı proton akımına sahip fare tat reseptör hücrelerinin (PKD2L1 hücreleri) transkriptomunu, bu akımdan yoksun tat reseptör hücrelerinin (TRPM5 hücreleri) transkriptomu ile karşılaştırmışlardır. Ardından PKD2L1 hücrelerinde zenginleşmiş ve az tanımlanmış veya tanımlanmamış transmembran proteinleri kodlayan 41 geni seçerek HEK-293 ve *Xenopus oocyteler*de bu genleri eksprese etmiş düşük pH'ya bağlı iyon yanıtlarını gözlemlemişlerdir. Bulgular yalnızca *Otop1*'in ekstraselüler asidifikasyona yanıt verdiğini göstermiştir. Böylece tarihte ilk defa ekşi tat reseptörü için gerçekten güçlü bir aday ortaya çıkmıştır. Bulgular *Otop1*'in kendini sınırlayan bir doğası olduğu ve

asitliğe hızlı bir yanıt vermesi yanı sıra bu yanıtın hızlıca kaybolduğunu göstermiştir. Ayrıca bu proton kanalının H^+ 'ya oldukça özgül olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte Hv1'in aksine Otop1 voltaja bağlı bir kanal olmadığı da gösterilmiştir (Tu ve ark., 2018). Bu çalışmanın hemen ardından 2019 yılında yine Prof. Liman'ın grubundan Teng ve arkadaşları OTOPI'in ekşi tat reseptörü olduğunu kesin bir şekilde doğrulamışlardır. Yapılan genetik inaktivasyon çalışmalarında farelerde *Otop1*'in CRISPR/Cas9 gen düzenleme yöntemi kullanılarak susturulması, tip III tat hücrelerinde proton akışının tamamen ortadan kalkmasına neden olmuştur. Bu hücrelerde hücre içi pH'nın artık dış ortam pH'sından etkilenmediği ve asit uyarıların aksiyon potansiyeli oluşturamadığı gözlenmiştir. Ayrıca NH_4Cl ve kinin (acı) yanıtında da azalma görülmüştür. Bu da OTOPI'in alkalizasyon algısıyla ilgili olabileceğine dair ilk sinyaller olmuştur (Teng ve ark., 2019). 2022 yılında ise OTOPI kanalının sadece ekstraselüler asiditeyi değil aynı zamanda ekstraselüler alkalizasyonu da algılayabildiği keşfedilmiştir. Bu sayede dışarıdan proton alma özelliğinin yanında dışarıya içeriden proton pompalayabileceği de gösterilmiştir. Bu tarihe kadar *C. elegans*'ta transmembran kanal benzeri protein 1'in (TMC-1), alkali duyusunu ilettiği bilinse de omurgalılarda alkaliyle aktive olan birincil duyuşal reseptörler henüz tanımlanmamıştı. Bu keşifle beraber OTOPI'in asidik ortamda proton girişini, bazik ortamda ise proton çıkışını aracılık eden bifazik bir etkisi olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada ekstrasellüler pH artırıldığında, OTOPI transfekte hücrelerde dışa doğru akımlar meydana gelmiş ve bu akım büyüklüğü pH ile birlikte artmıştır. Alkaliyle (pH 10.5) indüklenen akımın, asitle (pH 4.0) indüklenen akımın yaklaşık %40'ı kadar olduğu belirlenmiştir (Tian ve ark., 2023). Teng ve arkadaşlarının fare *Otop1* ile transfekte edilmiş hücrelerde alkali uyarıya yanıt olarak dışa doğru akım gözlemlemiş olmaları da bu bulguları desteklemektedir (Teng ve ark., 2019). OTOPI kanalının ekstraselüler alkalizasyonu algılayabildiğinin anlaşılmasının ardından, bu kanalın amonyum kloridi (NH_4Cl) de algılayabildiğine dair yeni bulgular ortaya konmuştur. Amonyum, kendine özgü ve güçlü bir tada sahip olup, acı, tuzlu ve hafif ekşi tatların birleşimi şeklinde tanımlanmaktadır. Genellikle rahatsız edici bir tat olarak algılansa da insanlarda bu tadı seven kültürel topluluklar mevcuttur. NH_4Cl , çok güçlü bir tat uyarısı olduğundan, dil sinirlerinden kayıt alınan deneylerde uzun süredir kontrol uyarısı olarak kullanılmakta ve verilerin normalize edilmesinde referans madde işlevi görmektedir

(Liang ve ark., 2023). OTOP1 kanalları asidik uyarıya karşı evrimsel olarak korunmuş bir proton geçirgenlik özelliği göstermektedir, ancak alkali uyarıya (NH₄Cl) verilen yanıt türler arasında farklılık göstermektedir (Sladkov ve Kolesnikov 2024).

OTOP kanallarının, nematodlarda bulunan duyuşal nöronlar başta olmak üzere pek çok dokuda geniş biçimde eksprese edilmesi, ancak ASH polimodal duyuşal nöronlarında asit uyarımına karşı kalsiyum yanıtlarını ya da asit kaçınma davranışlarını etkilememesi, bu kanalların işlevlerinin türler arasında farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, memelilerde OTOP1 aktivitesi asidik koşullarda artarken, bu durum asidik yiyeceklerin daha ekşi olarak algılanmasına yol açmaktadır (Li ve ark., 2023). Buna karşılık, güvercin ve kanarya gibi kuş türlerinde OTOP1 aktivitesinin asidik ortamda azalması, onların memeliler tarafından tolere edilemeyen yüksek asiditeli meyveleri tüketebilmesini sağlayarak ekolojik bir avantaj kazandırmaktadır. Tüm bu örnekler, OTOP kanallarının evrimsel süreçte farklı türlerde özgün uyarlamalara uğradığını ve bu nedenle fonksiyonel çeşitlilik gösteren bir kanal ailesi olduğunu göstermektedir (Goswami 2025).

Hem asidik hem de bazik ortamlar tat alma yanıtlarını ve noisepsiyonu indükleyebilmektedir. TMC-1 gibi iyon kanalları ekstrasellüler TRPV1, TRPA1 ve CatSper1 gibi iyon kanalları intraselüler alkali koşullarda aktive olmaktadır. Bunlar arasından özellikle TRPV1 reseptörü, hem asit (ekstrasellüler) hem de baz (intraselüler) pH tarafından aktive edilebilme özelliğiyle tanımlanan ve günümüzde oldukça popüler olan ilk iyon kanalıdır. Bununla birlikte, ekstrasellüler alkali duyumunun hücresel ve moleküler mekanizması hâlâ tam olarak aydınlatılamamıştır ve omurgalılarda doğrudan alkaliyle aktive olan bir birincil reseptör şimdiye kadar doğrulanmamıştır (Tian ve ark., 2023). Bu bilgiler ışığında, OTOP1'in alkali pH ile de aktive olabiliyor olması, omurgalılarda ilk kez tanımlanan alkaliyle uyarılan birincil reseptör olma potansiyeli açısından büyük önem taşımaktadır.

2021 yılında yayımlanan bir çalışmada *Drosophila*'da besinlerdeki asitliğin algılanması için gerekli olan Otop kanalları ailesine ait bir üyeyi tanımlanmıştır. Asit tadının algılanmasında Otop kanallarının işlevsel olarak korunmuş olması, son derece dikkat çekicidir; çünkü kemoreseptörler (tat reseptörleri) 800 milyon yıl önce birbirinden

evrimsel olarak ayrılmış olan sinekler ve memeliler arasında genellikle büyük farklılıklar göstermektedir. Otop kanallarının aksine, sineklerde şekerler, acı bileşikler, asetik asit, amino asitler, poliaminler, CO₂ ve diğer tat bileşiklerinin algılanmasında görev yapan iki ana reseptör ailesi memelilerde bulunmamaktadır. Dolayısıyla, sinekler ve farelerde asit tadı için Otop kanallarının korunmuş olması, bu iki türün tat sistemlerinin genel anatomileri büyük ölçüde farklı olmasına rağmen oldukça dikkat çekicidir. Ayrıca, sineklerde tat reseptör hücreleri nöronlardan oluşurken, memelilerde bu hücreler özelleşmiş epitelyal hücrelerdir. Buna rağmen, Otop proteinlerinin asit tadı algısındaki korunan rolü hem sineklerde hem de memelilerde gözlenmektedir. Bu bilgiler ışığında Otop'ları hayatta kalım açısından evrimsel olarak son derece güçlü bir seçim baskısı altında korunduğunu ortaya koymaktadır (Ganguly ve ark., 2021).

Farmakolojik ajanlar, iyon kanallarının fonksiyonel özelliklerini, kapılma mekanizmalarını ve yapı-işlev ilişkilerini incelemek için değerli araçlardır (Kong ve ark., 2025). Otop1'in olası ligandları Tablo 1.2.'de sunulmuştur. Otop1'in düzenlenmesinde Hughes ve arkadaşları tarafından aday gösterilen ilk ligand, genellikle P2X ve P2Y inhibitörü olarak bilinen suramindir. Suramin, sülfatlanmış bir polianyon olup birçok proteinin aktivitesini baskılayabilmektedir ve Otop1'i geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bağlamda suramin, hem Otop1 aracılı P2Y yanıtını hem de Otop1'in ekstrasellüler Ca²⁺ girişini geri dönüşümlü şekilde baskılamaktadır. Aynı çalışmada, ne Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının yokluğu ne de glikoz, ekstrasellüler Ca²⁺, Ca²⁺ giriş inhibitörü SKF96365 veya K⁺ artışının Otop1 aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Hughes ve ark., 2007). Otop1'in en güçlü ligandlarından biri de Zn²⁺'dir (Tu ve ark., 2018). Bunun nedeni proton ile Zn²⁺'nin aynı bağlanma bölgesi için rekabet etmesidir (Sladkov ve Kolesnikov 2024). Zn²⁺, tip III tat reseptör hücrelerinde ve *Otop1* eksprese eden HEK293 hücrelerinde gözlenen proton akımlarını inhibe etmiştir. Ancak tip III tat reseptör hücrelerindeki yarı maksimal inhibitör konsantrasyon, Otop1 eksprese eden HEK293 hücrelerindeki daha düşük bulunmuştur. Bu durum, iki hücre tipi arasındaki yardımcı alt birimlerin varlığı veya hücresel çevredeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, tat reseptör hücrelerinde Zn²⁺'nin proton akımını inhibe etme etkisinin pH'ya duyarlı olmuştur (Teng ve ark., 2019). Zn²⁺ iyonunun, Otop1 kanalını zaman bağımlı bir şekilde hafifçe güçlendirdiği bildirilmiş olmakla

birlikte, aynı zamanda kanalın güçlü bir inhibitörü olduğu da bilinmektedir (Hu ve ark., 2024). Üstelik Zn^{2+} inhibe edici etkisini göstermesi için yüksek konsantrasyonlar gerekmektedir ve OTOP kanallarına özgül değildir. Başka birçok iyon kanalını daha inhibe edebilmektedir (Islam ve ark., 2023). Bu nedenle, Zn^{2+} iyonu, OTOP1'in yapısal özelliklerinin incelenmesi için uygun değildir. Bu nedenlerden dolayı reaktif mavi-2 analogu olan Cibacron blue 3G-A 1280 kimyasal madde arasından önerilmiştir. Cibacron blue 3G-A tarafından OTOP1'in inhibisyonu rekabetçi veya vestibül tıkayıcı şeklinde olmamıştır. İnhibisyon pH ve voltajdan bağımsız gelişmiştir. Yapılan analizlerde Hill katsayısı yaklaşık olarak 1.0 bulunmuştur. Bu sonuç, Cibacron blue 3G-A'nın OTOP1 kanalı üzerinde tek bir bağlanma bölgesine sahip olduğunu veya birden fazla bağlanma bölgesi varsa bile bunlar arasında kooperatif bir etkileşimin bulunmadığını göstermektedir. Cibacron blue 3G-A'nın OTOP1 dışında P2X ve P2Y reseptörlerini de bloke edebildiği bilinmektedir. Bu durum, OTOP1'in P2Y reseptörleriyle fonksiyonel bir etkileşim içinde olduğu daha önceki bulgular (Hughes ve ark., 2007; Kim ve ark., 2010) dikkate alındığında, Cibacron blue 3G-A'nın etkisinin yalnızca OTOP1'e özgül olmadığı anlaşılmaktadır (Islam ve ark., 2023; Kong ve ark., 2025). OTOP1 için önerilen bir diğer ligand da karvakroldur. Karvakrol, kekik ve tımar gibi uçucu yağlarda bulunan fenolik bir bileşiktir ve keskin, sıcak bir koku ve acı/hoş olmayan/odunsu/baharatlı tada sahip olmasıyla bilinmektedir. Karvakrolun (1 mM, pH 6) proton varlığında fare OTOP1'in intraselüler alana doğru akımlarını güçlendirdiği gösterilmiştir. Üstelik bir doyma noktası da saptanmamıştır. Karvakrol, protonlara ihtiyaç duymadan da fare OTOP1 kanalını doğrudan aktive edebilmiştir. Bununla birlikte karvakrolün fare OTOP1 üzerindeki aktivasyon etkisinin düşük pH'da oldukça azaldığı gözlenmiştir. OTOP1 kanallarının karvakrole karşı duyarlılığı evrimsel olarak büyük ölçüde korunmuştur. Şimerik kanal analizleri, karvakrol duyarlılığının mOTOP1'deki belirli transmembran bölgeler tarafından belirlendiğini, özellikle TM2–TM5 arası (Phe67–Thr143) ve TM6–TM9 arası (Val216–Arg294) bölgelerin bu özellik için kritik yapısal unsurlar olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bazı türlerde OTOP1 kanalı karvakrole tepkisiz olurken diğerlerinde aktivasyona neden olmasından dolayı türlerin Phe67–Thr143 ve Val216–Arg294 bölgeleri için amino asit dizilimleri hizalanmıştır. (Hu ve ark., 2024). 2025 yılında yayımlanan çalışmada, OTOP1 kanalı için üç güçlü ve tercihen pozitif allosterik

modulator tanımlanmıştır: MFaN, HIMOP ve B2FAMP. Bu modulatorler arasında MFaN kanalın asidik koşullarda uyarılmasıyla oluşan akımları pH-bağımlı bir şekilde artırmış ancak kanalın temel farmakolojik veya biyofiziksel özelliklerini değiştirmemiştir. Ayrıca, S5–S6 halkasında yer alan çeşitli amino asitlerin mutasyonları MFaN'nin etkisini belirgin biçimde azaltmıştır. Etkilerini zayıf asidik koşullarda gösterirken güçlü asitlere karşı etkisiz kalmıştır. Buna ek olarak, S11–S12 halkasındaki ortak Arg554Ala mutasyonu, kanalın Zn^{2+} , alkali pH ve MFaN'ye verdiği yanıtları tamamen ortadan kaldırmıştır. İlginç bir şekilde HIMOP, OTOP1'in alkali koşullardaki geçişini arttırmıştır. Tüm bu modulatorler, OTOP1'e karşı özgül bulunmuş OTOP2, OTOP3 ve diğer iyon kanallarını etkilememiştir. (Kong ve ark., 2025). OTOP1'in farklı maddeler tarafından tam olarak bloke edilememesi, bu kanal içerisinde birden fazla proton taşıma yolunun birlikte bulunabileceğine işaret etmektedir (Sladkov ve Kolesnikov, 2024). Ayrıca bu uygulamalar tat hücrelerinden alınan OTOP1 kanalları üzerinde yapılmıştır. Yapılan en son çalışmada C-domain bölgesindeki cebin protein-ligand hidrojen bağları için daha fazla polar amino asit kalıntısı içermesi ve C-domain'deki varsayımsal gözenekte kanal fonksiyonu için gerekli olan Glu429 - His572 arasında bir tuz köprüsünün bulunmasından dolayı bu cep potansiyel olarak araştırılmıştır. İlaç benzeri moleküllerden oluşan ChemBridge Kütüphanesi'nden alınmış, %90 çeşitlilik oranına sahip 302.893 molekülden oluşan bir seti sanal tarama ile bu bölgeye kenetlenmiştir. Bu bileşikler arasından 200 μM derişimdeki bileşik olan C11, akımları neredeyse tamamen inhibe etmiştir. C11'in DrOTOP1 akımlarını inhibisyonu doz bağımlı olup, IC_{50} değeri 76 μM ve Hill katsayısı $h = 2.2$ olarak belirlenmiştir; bu da birden fazla bağlanma bölgesi ve pozitif kooperativiteye işaret etmektedir. Üstelik C11'in kenetlenmiş konformasyonundaki aromatik halkaların konumlanması Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı ilaçlardan oksakarbazepin gibi trisiklik dibenzazepin ailesine ait bileşiklerin yapısına benzemektedir. Bu ilaçların tat alma duyusunu azalttığı ve bazı iyon kanallarını inhibe ettikleri bilinmektedir. İkinci bileşik serisi, HEK-293 hücrelerinde eksprese edilen DrOTOP1'in tüm-hücre patch-clamp kaydı kullanılarak yeniden test edilmiştir. En güçlü bileşik olan C2.2, 200 μM derişimde akımları tamamen bloke etmiş ve doz-yanıt verilerinin IC_{50} değeri 6.6 μM bulunmuştur. Yapılan mutasyon analizlerinde, yalnızca I565W mutasyonu C11 ve C2.2 tarafından gerçekleştirilen inhibisyonu anlamlı şekilde değiştirmiştir. Bununla beraber fare OTOP1

yapısının zebra balığı C-domain cebi kalıntılarındaki dizilim benzerliğine sahip olmasına rağmen bu bileşiklerin fare OTOPI’de inhibisyona neden olmadığı ve C domain cebine bağlanmadığı görülmüştür. Yapısal karşılaştırmalar sonucunda, alt birimler arası yüzeyin hücre içi yarısında, C-domain cebine kıyasla C2.2 moleküllerine karşılık gelebilecek iki bölge tespit edilmiştir. Bu bölgeler, konumlarına göre “dış bölge” (lipid çift tabakasına bakan) ve “merkez bölge” (merkezi boşluğa bakan) olarak adlandırılmıştır. Ayrıca, bu bölgelerin evrimsel olarak korunduğu belirlenmiştir. İlgili aminoasit kalıntılarının, genel olarak omurgalı OTOPI proteinleri arasında yüksek derecede korunduğu ve bu korunumun özellikle zebra balığı ve memeli türlerine ait OTOPI dizileri arasında daha da belirgin olduğu görülmüştür. Yapılan analizler dikkate alındığında, C2.2’nin her iki bölgeye de bağlandığı ve ilginç bir şekilde endojen kolesterol moleküllerinin yerini aldığı sonucuna varılmıştır. Yapılan mutasyon analizleri de doking ve deneysel bulguların sonuçlarını doğrulamıştır. Bu mutasyonlardan Gly130Trp ve Met573Trp (dış bölge), 10 µM C2.2 ile yapılan inhibisyonu anlamlı ölçüde azaltmıştır. Merkezi bölgedeki Val201Trp ve Ser389Trp mutasyonları kanal aktivitesinin tamamen kaybolmasına neden olmuştur. Glu384Al mutasyonu IC₅₀ değerini 15.3 µM’ye kaydırmıştır (Burende ve ark., 2025).

Tablo 1.1. Otop1’in potansiyel ligandları

Ligand	Görevi	Miktar	İlgili makale
Suramin	İnhibisyon	100 µM	Hughes ve ark., 2007
Zn ²⁺	İnhibisyon	200 µM, pH 5.5	Y. H. Tu ve ark., 2018
Zn ²⁺	İnhibisyon	0.10 mM, pH 4.95 0.36 mM, pH 5.12	Teng ve ark., 2019
Zn ²⁺	İnhibisyon	5.30 µM, pH 8	Tian ve ark., 2023
Zn ²⁺	İnhibisyon	1mM, pH ve voltaja bağımlı	Islam ve ark., 2023
Cibacron blue 3G-A	İnhibisyon	3.4 µM, pH 5.0; 5.0 µM, pH 5.5; 5.2 µM, pH 6.0	Islam ve ark., 2023
Zn ²⁺	İnhibisyon	500 µM, pH 5.5	Hu ve ark., 2024
Karvakrol	Aktivasyon EC ₅₀	692.27 ± 28.86 µM, pH 6	Hu ve ark., 2024
MFaN	Aktivasyon	10.3 ± 2.6, µM pH 5.5	Kong ve ark., 2025

HIMOP	EC ₅₀	16.8 ± 6.5 µM, pH 5.5	
B2FAMP		12.2 ± 3.4 µM, pH 5.5	
C11	İnhibisyon	76 µM	Burendei ve ark., 2025
C2.2	IC ₅₀	6.67 µM	

2.3.4. OTOP2

İnsan Otop2 genin kromozomal konumu 17q25.3 olarak belirlenmiştir (Hurle ve ark., 2003). OTOP2 kolon (Turner ve Liman, 2022), retina (Hurle ve ark., 2011), mide, testis ve olfaktör bulbda (Tu ve ark., 2018), eksprese edilmektedir. OTOP1'e benzer şekilde voltajdan bağımsızdır (Tu ve ark., 2018). OTOP2, birçok kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasından özellikle KRK'de ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bundan dolayı tümör baskılayıcı bir gen olarak sınıflandırılması gerektiği iddia edilse de bu konu tartışılmaktadır (Qu ve ark., 2019). Ayrıca KRK'nin karaciğer metastazında (Rasool ve ark., 2024) ve özofagus skuamöz hücreli karsinom (DNA metilasyon biyobelirteci) (Bian ve ark., 2024) gibi gastrointestinal tümörlerde OTOP2 geninin ekspresyonu anlamlı şekilde düşmektedir. Guo ve Sun'un biyoinformatik analizleri sonucunda OTOP2 geninin KRK dokularındaki yüksek ekspresyonunun hastaların genel sağkalımı ile pozitif ilişkili bulunmuştur. Ancak beklendiği üzere KRK dokularında OTOP2 ekspresyon düzeyi, normal dokulara kıyasla belirgin şekilde daha düşük çıkmıştır. Bu bulgulara dayanarak yapılan *in vitro* hücre kültürü analizler sonucunda HT29 ve SW620 hücre hatlarında OTOP2'nin susturulması kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesini azaltmış, migrasyon, proliferasyon ve EMT'yi ise (E-cadherin ekspresyonunu azaltma, N-cadherin, Snail ve Vimentin genlerinin ekspresyonlarını artırma yoluyla) teşvik ettiği ortaya koymuştur arttırmıştır. Ayrıca, miR-3148'in KRK hücre hatlarında OTOP2 ekspresyonunu baskıladığı ortaya konmuştur (Guo ve Sun, 2022). Bir diğer *in vitro* analizde OTOP2'nin yüksek seviyelerde eksprese edilmesi, genin proliferasyonunu DLD1 ve SW480 KRK hücrelerinde p53 aracılığıyla baskılamıştır. Çalışmada ayrıca endojen OTOP2'nin SW480 hücrelerine DLD1 hücrelerine göre belirgin bir şekilde daha düşük olduğu bildirilmiştir. Plazmid aracılığıyla bu hücrelerde OTOP2'nin aşırı aktivasyonu ise hücre bölünmesi yavaşlamış, PCNA azalmış ve p21 proteini artmıştır (Qu ve ark., 2019). Palaniappan ve arkadaşlarının çalışması da bu

bulguları desteklemektedir (Palaniappan ve ark., 2022). 2024 yılında tek hücre RNA dizileme yöntemi kullanılarak BEST4/ OTOP2 hücreleri olarak isimlendirilen insan kolon epitelinde daha önce tanımlanmamış absorptif bir hücre tipi keşfedilmiştir. Kriptlerin tepesinde yer alan bu hücreler gelişimin erken evrelerinde ortaya çıkar ve incebağırsak ile kolonun tüm bölgelerinde düşük bir oranda (<%5) bulunmaktadır (Parikh ve ark., 2019; Malonga ve ark., 2024). Bu özel hücreler *OTOP2* geni (proton kanalı), *BEST4* geni (Ca^{2+} duyarlı Cl^- kanalı) ve *GUCA2B* genini (tokluk hissiyle ilişkili bir hormon olan uroguanylini üretir, bu peptid de guanilat siklaz C'yi aktifleştirerek bağırsak epitel hücrelerinde cGMP üretimini artırır) yüksek oranda eksprese etmektedir ve bu genler aktif olarak işlev görmektedir. Bu hücreler, metallothionein gen ailesine ait genleri de eksprese etmektedir. Bu genlerin, hücrelere serbest radikallere karşı savunduğu, aynı zamanda metal iyonlarının taşınması ve kısa süreli depolanmasında görev aldığı bildirilmiştir. Fonksiyonel olarak, bu hücrelerin ekstraselüler ortamın pH'sı düştüğünde H^+ iyonlarını hücre içine aldıkları gösterilmiştir. Normal durumda hücre içi asitleşme toksik etkilere neden olabilirken yapılan proteomik analizler, BEST4/OTOP2 hücrelerinin aynı zamanda yüksek düzeyde antiapoptotik protein BAG1 eksprese ettiğini ortaya koymuştur. Çalışmada, inflamasyon ve kanser durumlarında bu hücrelerin sayısının azaldığı ve işlevinin bozulduğu belirlenmiştir (Parikh ve ark., 2019). Yapılan sınırlı sayıda çalışmada ülseratif kolitte BEST4⁺/OTOP2⁺ hücrelerin azaldığı ancak Crohn hastalığında arttığı görülmüştür. BEST4⁺/OTOP2⁺ hücreleri, bağırsakta bakteriler tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) neden olduğu lümen pH değişimlerini algılayabileceği ve buna yanıt verebileceği düşünülmektedir (Malonga ve ark., 2024). Bunlara ek olarak çalışmalarda OTOP2'nin kolon kanseri nüksü ile ilişkisine de bakılmıştır. Diğer çalışmaların aksine Sallinger ve arkadaşlarının çalışmasında OTOP2 geninin kolon kanserinde potansiyel bir prognostik biyobelirteç olabileceği ortaya konmuştur. In situ analizlerin sonucunda, evre II kolon kanseri hastalarında nüks gelişen olgularda, OTOP2 geninin neoplastik dokuda anlamlı şekilde daha fazla eksprese edildiği tespit edilmiştir (Sallinger ve ark., 2023).

2.3.5. OTOP3

İnsan *OTOP3* genin kromozomal konumu 17q25.3 olarak belirlenmiştir (Hurle ve ark., 2003). *OTOP3* retina (Hurle ve ark., 2011), epidermis, ince bağırsak ve midede (Y. H. Tu ve ark., 2018) ifade edilmektedir ve voltaja çok az bağımlıdır (Y. H. Tu ve ark., 2018). *OTOP1*'E benzer şekilde *OTOP3* kanalı, Cu^{2+} (bakır), Ni^{2+} (nikel), Cd^{2+} (kadmiyum) ve Zn^{2+} (çinko) iyonları tarafından benzer derecede inhibe edilmektedir (Sladkov ve Kolesnikov 2024). *OTOP3*'ün kanser ile ilişkilendirildiği ilk çalışma 2019 yılında özellikle ileri yaştaki KRK hastalarında prognozu öngörülebiyecek transkriptomik imzaların belirlenmesinin amaçlanmıştır. Çalışmada *OTOP3*'ün kötü prognozla anlamlı şekilde ilişkili olduğu gösterilmiş; *OTOP3* düzeyinin artışı, ölüm riskinde %50'lik bir artış (HR: 1.5, $p < 0.05$) ile ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark., 2019). *OTOP3*'ün potansiyel bir onkogen olduğunu destekleyen bir diğer çalışmada, yüksek *OTOP3* ekspresyonu KRK hastalarında daha düşük sağkalım oranlarıyla anlamlı düzeyde ilişkilendirilmiştir. Kanserleşmiş ve sağlıklı kolon hücrelerinin karşılaştırıldığı analizler, kanser hücrelerinde *OTOP3*'ün aşırı ifade edildiğini ortaya koymuştur. Sikloheksimid, FBS inaktivasyonu ve MG132 tedavi deneyleri aracılığıyla, *OTOP3*'ün c-Myc ekspresyonunu ve stabilitesini ubiquitinasyon yoluyla düzenlediği ve bunun KRK hücre proliferasyonunu arttırdığı bulunmuştur (Jang ve ark., 2024).

2.3.6. Laktik asit ve Kolon

Kanser hakkında temel bir referans olan Hanahan ve Weinberg'in modeline göre kanserin temel özellikleri sürekli proliferatif sinyalleşme, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçış, hücre ölümüne direnç, sınırsız çoğalma, anjiyogenez, invazyon, metastaz, metabolizmanın yeniden programlanması ve bağışıklık sisteminden kaçış olarak özetlenmektedir. İlerleyen yıllarda bu özelliklere yenilere eklenmiştir (Hanahan, 2022). Artan kanıtlar, tümör mikroçevresinin (TME), tümörlerin gelişiminde ve ilerlemesinde kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Asidik TME, solid tümörlerin biyokimyasal ayırt edici özelliklerinin başında yer almaktadır (Zhou ve ark. 2019). Kanser hücrelerinin artan metabolik aktivitesi ve düzensiz kan dolaşımı sonucu laktik asit ve CO_2 birikimi, TME'de pH'nın 7.2–7.4'ten 6.2–6.9'a neden olmaktadır. Bu durum, Hanahan'ın modelindeki hücresel metabolizmayı yeniden programlama özelliğiyle doğrudan

ilişkilidir. Çünkü asidik ortam, hücrelerin enerji üretim yollarını değiştirmekte ve metabolik adaptasyonlara yol açmaktadır. Bunun yanı sıra, asidik mikroçevre hücrelerin doku bariyerlerini aşma ve çevre dokulara invaze olma yeteneğini güçlendirerek metastaz potansiyelini de artırmaktadır (Michl ve ark., 2024). Sağlıklı kolonositler enerji ihtiyaçlarını büyük oranda, mikrobiyal fermantasyonun bir ürünü olan bütirattan sağlamaktadır. Ancak kanserleşme sürecinde bu hücreler, Warburg etkisi olarak bilinen bir metabolik değişime uğramaktadır. Warburg etkisine göre kanser hücreleri, oksijen yeterli olsa bile glikoliz sürecini yoğun şekilde sürdürür. Oluşan pirüvat, Krebs döngüsüne girerek oksidatif fosforilasyona uğramak yerine laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi aracılığıyla laktik aside dönüştürülür. Bu durum, laktik asit birikimine neden olmaktadır. Kolorektal kanser hücreleri, enerji üretiminde hem glikozu hem de bütiratu kullanabilme gibi benzersiz bir metabolik esnekliğe sahiptir. Bu iki enerji kaynağı arasında çoğunlukla glikozu tercih etmektedir. Bu adaptasyon, kanser hücrelerinin değişen çevre koşullarına uyum sağlamasını ve hayatta kalmasını kolaylaştırmaktadır. Bu süreçte iki önemli taşıyıcı protein görev almaktadır. Bunlardan ilki olan MCT1 (Monocarboxylate Transporter 1), bütiratin hücre içine alınmasını ve glikoliz sonucu oluşan laktatın hücre dışına atılmasını sağlar. Bu sayede pH dengesi korunmaktadır. Diğeri olan GLUT1 (Glucose Transporter 1) ise glikoz taşır ve birçok kanser türünde aşırı eksprese olmaktadır. GLUT1'in aşırı eksprese olmasının nedeni oksidatif fosforilasyondan kaçan hücrelerin 36 ATP yerine sadece 2ATP üretmesi bu yüzden de hızlıca daha fazla enerjiye ihtiyaç duyması olduğu düşünülmektedir. (Fung ve ark., 2012; Eslami ve ark., 2019). Bu süreç, hipoksiye yanıt veren transkripsiyon faktörü HIF-1'in (hypoxia-inducible factor-1) aşırı ekspresyonu, c-Myc ve Ras gibi onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı, mikroRNA'lar ve sirtuinler gibi düzenleyici moleküllerin değişimiyle yakından ilişkilidir (Vaupel ve Multhoff, 2021). Malign hücrelerin bu enerji açısından verimsiz yolu tercih etme nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, tümör hücrelerine sağladığı bazı avantajlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bazı çalışmalar, dış ortam asidozu ve artmış laktat düzeylerinin, serbest yağ asidi, folat ve glutamin emilimini artırarak tümör hücrelerine ek enerji kaynağı oluşturduğunu göstermiştir (Oseguera ve Yau, 2023).

Gastrointestinal sistem boyunca pH değeri hem bölgesel olarak hem de bireyler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların temel nedenleri arasında insan

anatomisi, diyet, mikrobiyal aktivite ve çevresel faktörler yer almaktadır. Sağlıklı bir kolon, kendi içinde de belirgin pH farklılıkları sergiler. Proksimal kolonda pH değeri genellikle 5.0 ile 7.5 arasında değişirken, distal kolonda mikrobiyal metabolizma sakkarolitik fermantasyondan proteolitik fermantasyona kayar. Bu süreçte dallı zincirli yağ asitleri ve amonyum iyonları (NH_4^+) oluşur ve buna bağlı olarak pH 6.0 ile 8.0 aralığına kadar yükselir. Diyet veya hastalık gibi dış etkenler olmadıkça, bireylerde kolonik pH değeri genellikle zaman içinde sabit kalmaktadır (Brinck ve ark., 2025). Laktik asitin kolonda birikmesi hastalıklarla ilişkilidir. Birçok bakteri türü tarafından üretilmesine rağmen, ani ölüm sonrası alınan kolon örneklerinde bile sadece 5–7 mM laktat saptanmıştır (Wang ve ark., 2020). Normal fizyolojik koşullar altında ekstrasellüler laktik asit konsantrasyonu yaklaşık 1.5 mM düzeyindedir. Ancak hipoksi, inflamasyon, malignite veya metabolik disfonksiyon gibi patolojik durumlarda bu değer 20–40 mM aralığına kadar yükselebilmektedir (Zhou ve ark., 2022). Laktik asidoz, TME'nin belirgin bir özelliğidir ve kemoterapiye karşı kanser direncini arttırmaktadır. Glikoz varlığında laktat (laktik asitin protonlarını kaybetmesi sonucu oluşur) ve protonların yoğun salınımı sonucu ortaya çıkar. (Daverio ve ark., 2023). Yüksek mortalite oranı nedeniyle hematolojik bir acil durum olarak kabul edilir. Klinik olarak stabil olan bazı kanser hastalarında Tip B laktik asidoz, doğrudan altta yatan maligniteye bağlı olarak da gelişebilmektedir. Tip B laktik asidoz, normal oksijenlenme koşullarında artmış glikolitik metabolizma sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu durum Warburg etkisine bağlıdır (Oseguera ve Yau, 2023).

Yüksek laktat konsantrasyonu ve düşük pH içeren koşullarda yetiştirilen kanser hücreleri, glikoz bulunmayan ortamda apoptozdan kaçınmakta ve normal koşullara kıyasla 10 kata kadar daha uzun süre yaşayabilmektedir (Daverio ve ark., 2023). Laktik asit yalnızca bir metabolik ürün değil, aynı zamanda hücrel ve hücre dışı düzeyde sinyal iletimi fonksiyonuna sahip biyolojik bir sinyal molekülü olarak da kabul edilmektedir. Düşük pH, T hücrelerinin fonksiyonunu baskılayarak tümörün bağışıklık hücreleri tarafından algılanmasını zorlaştırmaktadır (Michl ve ark., 2024). Son yıllarda yapılan çalışmalar, laktik asidin makrofaj metabolizması ve polarizasyonu ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. İnflamasyon sırasında laktik asit, makrofaj metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olarak görev yapar ve aşırı inflamatuvar yanıtları baskılar. Bununla

birlikte, malign tümörlerde tümör dokusu tarafından üretilen yüksek düzeyde laktik asit, tümör ilişkili makrofajların M2 fenotipine yönelmesini teşvik eder. Bu durum, tümör mikroçevresinde immünosupresif bir ortamın oluşmasına ve tümör progresyonunun artmasına yol açar (Zhou ve ark., 2022). Bu bağlamda, OTOP1 proteini de önemli bir düzenleyici olma potansiyeline sahiptir. *OTOP1* mutant farelerde, adipoz dokuda inflamasyon ve makrofaj infiltrasyonu (özellikle M1/M2 oranında artış) daha fazla saptanmıştır (Wang ve ark., 2014).

Laktat, hemen hemen tüm malign süreçlerde rol oynayan ve gerekli tek “onkometabolit” olarak kabul edilmektedir. Sitoplazmik laktat, çoğunlukla artan düzeyde eksprese edilen MCT4’ler aracılığıyla hücre dışına taşınmaktadır. Bu taşıma sistemi, diğer proton taşıyıcıları ve karbonik anhidraz enzimleri (CAII, CAIX) ile birlikte çalışır. Karbonik anhidrazlar, oksidatif metabolizma sırasında üretilen CO₂’yi H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına dönüştürür. Bu şekilde, hücre dışına proton salınımı artar. Bu proton TME’nin asidifikasyonundan sorumludur (Vaupel ve Multhoff, 2021). OTOP kanallarında ise bu dönüşüm sağlanamaz ve hücre içinin fazla asidikleşmesi durumunda sitotoksik etki gözlenebilir.

Laktat kullanan bakteri sayısı düşük olan mikrobiyal topluluklar, daha az stabil olup laktat kaynaklı bozulmalara karşı daha duyarlıdır. Bu bulgular, laktat kullanan bakterilerin (Laktik asitten KZYA üretirler) bağırsak ekosisteminin stabilitesini ve sağlığını korumada önemli bir rol oynadığını açıkça göstermektedir (Wang ve ark., 2020). İnsan kolonunda pH 5.5 koşullarında, laktat birikimi meydana gelmekte ve buna bağlı olarak bütirat ve propiyonat düzeylerinde azalma ile mikrobiyal kompozisyonda belirgin değişiklikler gözlenmektedir. Wang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, pH 6.5 koşullarında 10–20 mM laktat infüzyonu yapılmasına rağmen laktat düzeylerinin düşük kaldığı belirlenmiştir. Buna karşılık, daha düşük pH (5.5) koşullarında, üç farklı fekal mikrobiyal toplulukta laktat birikimi meydana gelmiştir. Bu değişiklikler sonucunda *Bacteroidetes* ve anaerobik *Firmicutes* üyelerinin azaldığı, buna karşın *Actinobacteria*, *Lactobacillus* türleri ve *Proteobacteria*’nın baskın hale geldiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2020).

OTOP’ların vücut genelinde yaygın biçimde eksprese edilmesi, bu kanalların diğer hücresel ortamlarda NH₄Cl gibi bileşiklere yanıt verip vermediğinin araştırılmasına yol

açmıştır. Bağırsakta, bakteriler tarafından sindirilen proteinlerin parçalanması sonucu amonyak (NH₃) oluşmaktadır (Liang ve ark., 2023). Ayrıca, bağırsak mikrobiyotasında bulunan laktik asit bakterileri de laktik asit üretir ve bu durum bağırsak lümenindeki pH'ı değiştirmektedir (Erfanian ve ark., 2023). Benzer şekilde, kanser hücrelerinde gözlenen Warburg etkisi sonucunda tümör mikroçevresinde laktik asit birikimi meydana gelir ve pH düşer (Li ve Cui 2023). Bu nedenle, OTOP ailesinin tüm üyeleri, hem mikrobiyal metabolitler hem de tümör mikroçevresi gibi değişken pH koşullarına duyuşsal veya düzenleyici bir yanıt oluşturabilir.

2.4. Steoridal Saponinler

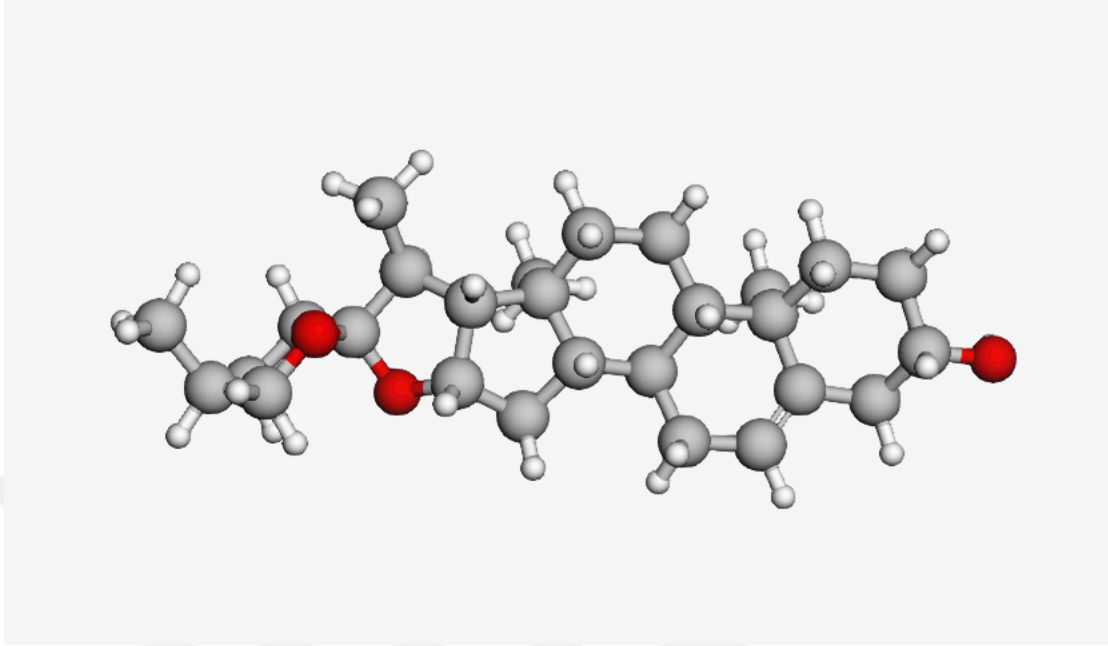
Kanser tedavisinde kullanılan temel kemoterapi ilaçlarının yaygın toksik yan etkileri nedeniyle klinik uygulamalarda ciddi bir zorluk oluşturmaktadır. Ayrıca, kemoterapötik ajanlara karşı gelişen ilaç direnci tedavinin önünde önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu nedenle, yeni antikanser ilaçlarının araştırılması acil bir gereklilik haline gelmiştir. Çalışmalar, polifenoller, flavonoidler, monoterpenler ve triterpenler, kükürtlü bileşikler ve saponinler gibi doğal bileşiklerin tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyebildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin klinik uygulamalara kullanımı bulunmamaktadır (Wang ve ark., 2024). Steroidal saponinler, karmaşık kimyasal yapılara ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip doğal bileşiklerdir. Bu bileşikler; antiinflatuar, antimikrobiyal, antifungal ve antitümör özellikler göstermektedir. Bitki türleri arasında geniş bir dağılıma ve genellikle yüksek molekül ağırlıklarına sahiplerdir. Kimyasal olarak bir aglikon ile bir veya daha fazla şeker grubundan oluşurlar. Aglikon kısımları genellikle beş halkalı furostan veya altı halkalı spirostan iskelet yapısında ve bu iskelet D-glukoz, D-galaktoz, L-ramnoz, D-ksiloz, L-arabinoz veya D-glukuronik asit gibi çeşitli monosakkaritlerle bağlanabilme yeteneğine sahiptir. Bu yapısal çeşitlilik, saponinlerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinin farklılaşarak özelleşmelerini sağlamaktadır. Steroidal sapogeninler 20. yüzyılın ortalarından itibaren farmasötik steroid sentezinde doğal başlangıç maddeleri olarak büyük önem kazanmıştır. Bu bileşiklerin bitkilerden (özellikle *Dioscorea* türleri, *Trigonella foenum-graecum* ve *Agave* cinsleri) bol miktarda elde edilebilmesi, sentetik kortikosteroidler, cinsiyet hormonları ve pregnenolon gibi önemli ilaçların üretiminde düşük maliyetli bir biyokimyasal hammadde sağlamıştır (Herráiz 2017). Bunun yanı sıra, saponinler hemolitik, köpük oluşturuıcı ve

deterjan özellikleri ile de karakterizedir. Bu özellikler, onların biyolojik membranlarda vestibül oluşturma ve hücre yüzeyindeki karbonhidrat yapılarında modifikasyonlara neden olmalarını sağlamaktadır (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2022).

İyon kanallarını aktive eden veya inhibe eden farmakolojik ajanlar, kanalın kapanma mekanizmalarını ve bu mekanizmaların fizyolojik süreçlerdeki önemini aydınlatmak amacıyla yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Hu ve ark., 2024). Bu farmakolojik ajan adayları arasında steroidal sapogeninler özel bir yere sahiptir. Steroidal sapogeninler, çeşitli tümör hücreleri üzerinde belirgin sitotoksik ve antikanser etkiler göstermeleriyle dikkat çekmektedir. Üstelik sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkilerinin meydana gelmesi için çok daha yüksek dozlar gerekmektedir. Sırasıyla diosgenin, dioscin, gracillin, sarsasapogenin, pennogenin, yamogenin, aginoside, paragoside, prosapogenin, icogenin, gitonin ve polyphyllin D gibi aglikonlar ile bunların glikozit türevleri steroidal saponinler arasında yer almaktadır. Ancak yamogenin, bu grup içinde farmakolojik özellikleri ve özellikle antikanser etkileri açısından en az incelenmiş bileşiklerden biri olarak öne çıkmaktadır (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2022). 2021 yılına kadar, yamogenin'in sitotoksik veya antitümör etkilerini doğrudan inceleyen hiçbir çalışma bulunmamaktadır (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2021). Bu nedenle, yamogenin'in biyolojik aktivitelerinin ve olası moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, hem steroidal sapogeninlerin yapısal-işlevsel ilişkilerinin hem de OTOP kanallarının fonksiyonel dinamiklerinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

2.5. Yamogenin (Neodiosgenin)

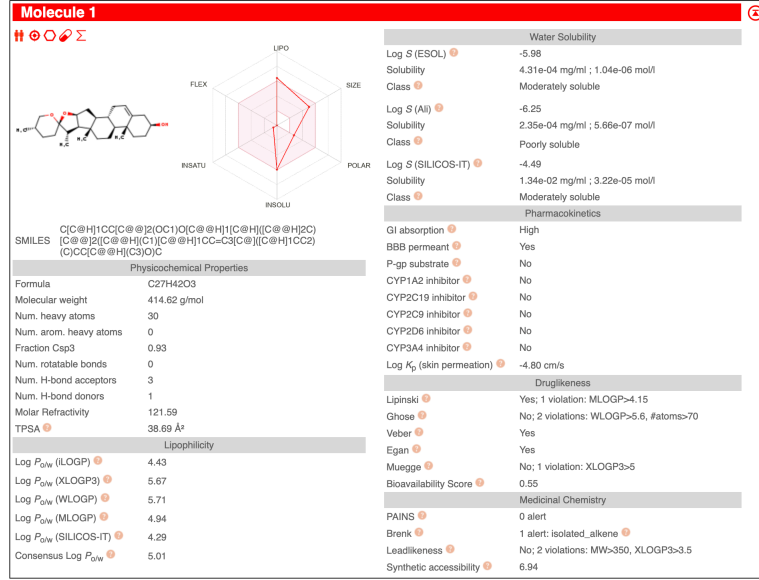
Yamogenin, steroidal sapogenin yapısında doğal bir triterpenoid bileşiktir ve spirostan tipi steroidler grubuna dahil edilir (Şekil 2.12.). Bu, bileşiğin yan zincirinde spiroketal halka yapısı bulunan bir steroidal saponinin şeker içermeyen (aglikon) kısmı olduğu anlamına gelmektedir. İsminin sonundaki '-genin' takısı da bunu doğrulamaktadır.



Şekil 2.11. Yamogenin (Neodiosgenin) molekülünün üç boyutlu yapısı (Pubchem).

Kimyasal olarak prenol lipidler sınıfında yer alır ve biyosentetik olarak terpenoid yolları üzerinden sentezlenmektedir (Grayu, Erişim Tarihi: 17 Ekim 2025). Yamogenin ilk olarak 2009 yılında Sun ve arkadaşları tarafından *Asparagus officinalis* L. bitkisinin kurutulmuş gövdelerinden izole edilmiştir (Sun, Huang ve Kong 2010). Ayrıca yamogenin, yapısal olarak diosgenin'in stereokimyasal izomeridir ve bu nedenle benzer biyolojik aktivitelere sahiptir (Ghosh ve Thakurdesai 2022). SwissADME analizine göre Yamogenin ($C_{27}H_{42}O_3$; Moleküler ağırlık: 414.62 g/mol), farmakokimyasal açıdan lipofilik bir karaktere sahiptir. Molekülün ortalama lipofiliklik değeri (Consensus LogP) 5,01 olarak belirlenmiş olup, bu durum bileşiğin yüksek membran geçirgenliğine sahip olduğunu göstermektedir. Polar yüzey alanı (TPSA: 38.69 Å²) ve düşük hidrojen bağı oluşturma kapasitesi (1 verici, 3 alıcı) de bu bulguyu desteklemektedir. Ayrıca yamogenin gastrointestinal sistemden yüksek düzeyde emilebilmekte ve kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Lipinski kuralına göre yalnızca bir ihlal (MLogP > 4.15) tespit edilmiş olup, genel olarak bileşiğin “ilaç benzeri” özellikler taşıdığı belirlenmiştir. Molekülün biyoyararlanım skoru 0.55 olup orta düzeyde sistemik erişilebilirliğe işaret etmektedir. Ayrıca PAINS uyarısı bulunmaması, molekülün yapısal olarak toksik veya reaktif bir grup içermediğini göstermektedir (SwissADME, Erişim tarihi: 1 Kasım 2025) (Şekil 2.13).

Yamogenin'in yapısında 11 kiral merkez ve 6 halka bulunmaktadır (Ghosh ve Thakurdesai 2022).



Şekil 2.12. SwissADME üzerinden yamogeninin özellikleri

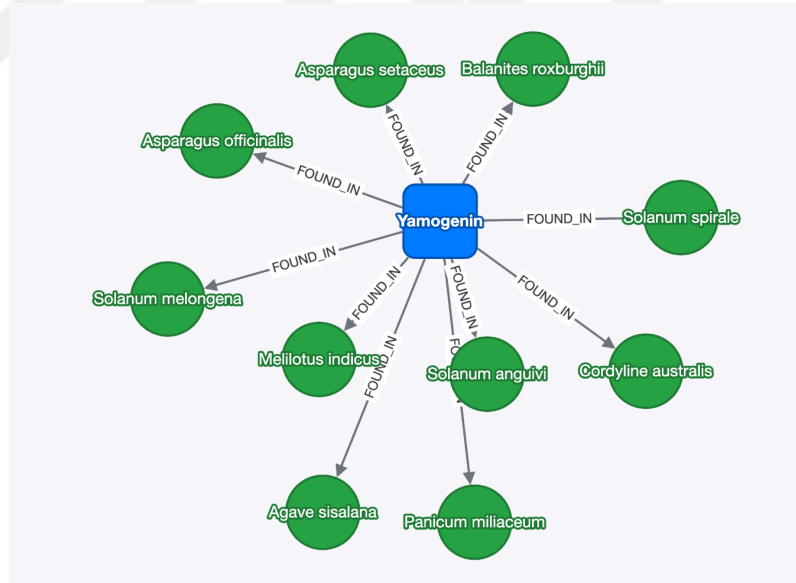
Yamogenin türevlerinin hesaplamalı farmakoloji veritabanı analizine göre çeşitli biyolojik hedeflerle etkileşime girebildiği belirlenmiştir. En yüksek etkileşim skorlarına sahip hedef proteinler aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2.2.) (Lab of System Pharmacology, China Erişim tarihi: 5 Kasım 2025).

Tablo 2.2. Yamogenin ve türevlerinin en yüksek bağlanma skorlarına sahip hedef proteinleri (Lab of System Pharmacology).

Hedef Protein	Skor	Fonksiyon
Steroid 5-alfa-redüktaz 1	10.484	Aktivatör (0.512)
Mitokondriyal açıl taşıyıcı protein,	10.955	İnhibitör (0.508)
Glukokortikoid reseptörü	8.460	İnhibitör (0.522)
1,25-dihidroksivitamin D3 reseptörü	10.596	Aktivatör (10.596)
Protein Farnesiltransferaz (PFT)	9.167	İnhibitör (0.616)
11-β-Hidroksisteroid dehidrogenaz 2	10.972	İnhibitör (0.520)

Kalsitonin gen ilişkili peptid reseptörü	6.640	Aktivatör (0.500)
NADH-ubiquinone oksidoredüktaz	7.694	İnhibitör (0.574)

GRAYU veritabanına göre, yamogenin doğada çeşitli bitki türlerinde doğal olarak bulunmaktadır. Bu türler arasında *Asparagus officinalis* (kuşkonmaz), *Asparagus setaceus* (süs kuşkonmazı), *Solanum melongena* (patlıcan), *Solanum anguivi*, *Solanum spirale*, *Melilotus indicus* (sarı burçak), *Panicum miliaceum* (darı), *Cordyline australis* (Yeni Zelanda kordonotu), *Agave sisalana* (sisal bitkisi) ve *Balanites roxburghii* (çöl hurması ağacı) bulunmaktadır. Bu bitkilerin bir kısmı gıda olarak tüketilmekte bir kısmı ise geleneksel tıp ve endüstride biyoaktif bileşik kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2.14.) (Grayu Erişim Tarihi 17 Ekim 2025).



Şekil 2.13. Yamogenin'in doğal olarak bulunduğu bitki türleri (Grayu).

Yapılan çalışmalar, yamogeninin çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Özellikle HepG2 karaciğer hücrelerinde triasilgliserol (TAG) birikimini engelleyerek, yağ asidi sentezinde görev alan genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Ghosh ve Thakurdesai 2022; Moriwaki ve ark., 2014).

Yamogeninin antimikrobiyal aktivitesi *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus paracasei*, ve *Lactobacillus acidophilus* suşları üzerinde çalışılmıştır. Bu suşlar arasında en güçlü etkiyi *Staphylococcus aureus* üzerinde göstermiş olup MİK (Minimum inhibitör konsantrasyon) değeri 350 µg/mL olarak bulunmuştur. Diğer suşlarda ise bu etkinlik > 3.5 mg/mL olarak bildirilmiştir. Bu sonuç yamogeninin antimikrobiyal ajan olarak potansiyeli olmadığını göstermektedir (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2024).

Yamogeninin nöroprotektif ve antidepresan etkisi ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar *in vivo* olarak çalışılmıştır. Bulgular, LPS ile depresyonun indüklendiği mürin modellerinde yamogenin tedavisinin sükröz tercih testinde ödül mekanizmasını aktive ettiği, zorunlu yüzme testinde ise hareketsizlik süresini azalttığını göstermiştir. Bu sonuçlar, bileşiğin depresyon benzeri davranışları hafifletici özellik taşıdığını ortaya koymuştur. Moleküler düzeyde, yamogeninin bu etkilerini, PERK/eIF2α/ATF4/CHOP sinyal yollarını modüle ederek endoplazmik retikulum stresini azaltma yoluyla sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca, bileşik antiapoptotik protein Bcl-2'nin ekspresyonunu artırırken, proapoptotik kaspaz-3'ün düzeyini düşürmüştür; böylece nöronal hücre ölümünü engelleyici bir etki göstermiştir. Yamogenin aynı zamanda mikrogliya aktivasyonunu baskılamış, ancak BDNF sinyal yolunu doğrudan etkilememiştir (Chen ve ark., 2023).

2.6. Yamogeninle İlgili Kanser Çalışmaları

Son yıllarda yapılan çalışmalar, yamogeninin yalnızca antiinflamatuvar, hepatosteoza koruyucu ve nöroprotektif etkiler değil, aynı zamanda çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif ve proapoptotik özellikler gösterdiğini de ortaya koymuştur. Yen ve arkadaşlarının çalışmasında, *Solanum violaceum* bitkisinden izole edilen yamogenin türevi, bilinen dokuz steroidal glikozitten biri olarak tanımlanmıştır. Bu bileşiğin sitotoksik etkisi, altı farklı insan kanser hücre hattında (HepG2, Hep3B, A549, Ca9-22, MCF-7 ve MDA-MB-231) değerlendirilmiştir. Hücre canlılığını inhibe eden IC₅₀ değerleri 4.26–7.25 µg/mL aralığında çıkmıştır. Ayrıca aynı çalışmada bileşiğin anti-inflamatuvar etkinliği de ölçülmüş ancak belirgin bir inhibisyon göstermediği bildirilmiştir (Yen ve ark., 2012). Stefanowicz-Hajduk ve arkadaşlarının 2021 yılında yayınlanan

çalışmasında, *Trigonella foenum-graecum* (çemen) tohumlarından elde edilen ekstraktlar ile steroidal saponin bileşikleri olan diosgenin, yamogenin ve tigogenin'in sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bu bileşikler, HeLa (servikal karsinom), SKOV-3 (ovaryum karsinomu) ve MOLT-4 (lösemi) hücre hatlarında test edilmiştir. Ayrıca HaCaT (normal keratinosit) hücre hattı kontrol amacıyla kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, MOLT-4 hücre hattı dışında tüm hücre hatlarında belirgin sitotoksik etki gözlenmiştir. Bulgular ayrıca HeLa ve SKOV-3 hücrelerinde yamogenin ve onun izomeri olan diosgenin bileşiklerinin proliferasyon inhibisyon etkilerinin benzer olduğunu göstermiştir. Yamogenin sağlıklı hücre hattı ve kanser hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini karşılaştırmak amacıyla seçicilik indeksleri de hesaplanmıştır. Bulgular, yamogenin'in diosgenin ve tigogenin'e kıyasla daha düşük seçicilik sergilediğini, ancak buna rağmen belirgin antitümör potansiyel taşıdığını ortaya koymuştur (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2021). Başka bir çalışmada kolon kanseri (HCT116 hücre hattı), gastrik adenokarsinoma (AGS hücre hattı), baş-boyun skuamöz karsinoma (UM-SCC-6 hücre hattı), ve sağlıklı insan fibroblast hücreleri üzerinde yamogeninin MTT ile antiproliferatif aktivitesi ölçülmüştür. Ayrıca DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ve ROS (reaktif oksijen türleri) üretim seviyesi belirlenerek antioksidan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada ayrıca mitokondriyal membran depolarizasyonu ve apoptozla ilişkili kaspaz -8, kaspaz-9 mRNA seviyeleri de ölçülmüştür. Bulgulara göre yamogenin, proliferasyonu azaltma üzerinde en fazla etkiyi AGS hücrelerinde (IC_{50} 18.50 ± 1.24 $\mu\text{g/mL}$) göstermiştir. HCT116 hücrelerinde ise IC_{50} değeri 60 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca yamogenin AGS hücrelerinde oksaliptatin (IC_{50} 10.64 ± 0.68 $\mu\text{g/mL}$) ve kapasitabinin (IC_{50} 13.09 ± 1.83 $\mu\text{g/mL}$) sitotoksik etkilerini arttırarak kemoduyarlayıcı bir etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Yamogenin ROS üretimini indüklemiş, mitokondriyal zarın depolarizasyonuna neden olmuştur. Ayrıca AGS hücreleri 60 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda yamogenin ile 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve ardından gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre BCL2A1, CASP5, DEDD2, MCL1, NFKBIA, RELB ve TNFRSF25) genlerinde belirgin artış saptanmıştır. Buna karşın, yamogenin tedavisi 92 genin 30'unda anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Bu azalma özellikle, BCL3, CASP9, CHUK, LRDD ve TNFRSF1B genlerinde gözlenmiştir. ABTS ve DPPH testleri sonucunda

yamogeninin orta düzeyde antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2024). Prostat kanseri tedavisinde potansiyel doğal inhibitör adaylarının araştırıldığı güncel bir *in silico* çalışmada, yamogenin'in androjen reseptörüne yüksek bağlanma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir. Moleküler doking analizleri sonucunda -9.5 ila -9.4 kcal/mol arasında değişen bağlanma enerjisiyle en yüksek bağlanma enerjisine sahip bileşikler arasında yer alan yamogenin, potansiyel bir androjen reseptör inhibitörü adayı olarak değerlendirilmiştir (Huang ve Hu, 2025). Yapılan çalışmaların sonuçları tablo olarak verilmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Yamogeninin antikanser etkisini araştıran çalışmalar.

Çalışma	Hücre Hatları	Yamogenin IC ₅₀ (µg/mL)	Sonuçlar
(Lu ve ark., 2009)	MGC-803 HepG2 A549 MCF-7	25-35	Sitotoksik etki gösterilmiştir.
(Yen ve ark., 2012)	HepG2 Hep3B A549 Ca9-22 MCF-7 MDA-MB-231	4.26–7.25	Sitotoksik etki gösterilmiştir.
(Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2021b)	HaCaT MOLT-4 SKOV-3 HeLa	9.70 ± 0.91 - 16.70 ± 0.08 16.50 ± 0.59	Yamogenin SKOV-3 ve HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri gösterilmiştir.
(Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2022b)	SKOV-3 HaCaT	23.90 ± 1.48 - 16.40 ± 1.41	- Sitotoksik etki gösterilmiştir. (10 µg/mL'den itibaren) - Hücre döngüsünü G1 fazında inhibe etmiştir. Kaspaz-8, -9, ve -3/7'yi aktive etmiştir. - Apoptozu indüklemiştir. - TNF reseptör ailesindeki genleri upregüle etmiştir. - Mitokondriyal membran potansiyelini sağlıklı hücrelere kıyasla x2 düşürmüştür. (20 µg/mL)

Tablo 2.3. (devamı) Yamogeninin antikanser etkisini araştıran çalışmalar.

(Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2024)	HCT116	$\approx 60 \mu\text{g/mL}$	- HCT116 ve AGS hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. - Oksaliptin ve kapesitabinle sinerjistik etkiye sahip olmuştur. - AGS hücrelerinde, mitokondriyal membran potansiyelini düşürmüştür. - Hücre döngüsünü G1 fazında inhibe etmiştir. - Kaspaz-8 ve -9 yolaklarını aktive olmuştur.
	AGS	$\approx 18.50 \pm 1.24$	
	UM-SCC-6	-	

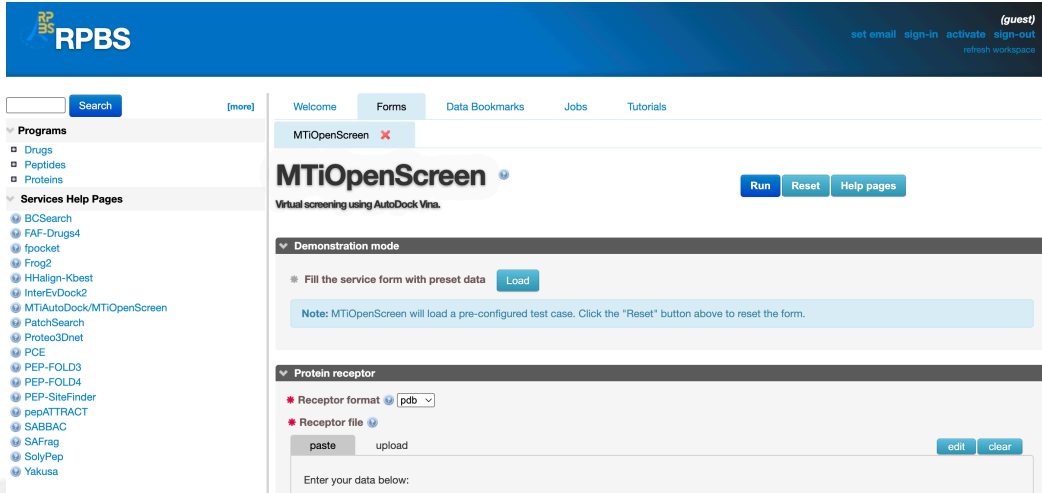
3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *In silico*

3.1.1. Sanal Tarama Yöntemiyle Etken Madde Belirleme

Sanal tarama için RPBS (<https://moby2.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::MTiOpenScreen>) içindeki MTiOpenScreen arayüzü kullanıldı (Şekil 3.15). MTiOpenScreen, sanal tarama işlemlerini gerçekleştirmek için AutoDock Vina motorunu kullanmaktadır. AutoDock Vina, bir gradyan tabanlı konformasyonel arama algoritması kullanarak ligand ve hedef protein arasındaki en uygun bağlanma pozisyonlarını tahmin etmektedir. Arama alanı, x, y ve z koordinatlarında tanımlanan bir grid kutusu ile belirlenerek grid çözünürlüğü program tarafından otomatik olarak 1 Å olarak ayarlanmaktadır. MTiOpenScreen, varsayılan olarak 10 bağlanma modu ve 8 arama yoğunluğu değerleriyle çalışmaktadır.

Oluşturulan bağlanma pozlarının puanlanması ve ligandların sıralanması ise bağlanma enerjisini kcal/mol cinsinden yaklaşık olarak tahmin eden Vina'nın ampirik skorlama fonksiyonuna dayanmaktadır.



Şekil 3.14. RPBS içinde MTiOpenScreen Sayfası

Bu tez çalışmasında, ligandın OTOP1 reseptör proteini ile olası bağlanma bölgelerinin belirlenmesi amacıyla önce OTOP1 reseptör proteininin üç boyutlu (3D) yapısı, AlphaFold Protein Structure Database üzerinden AF-Q7RTM1-F1-v6 kimlik numarasıyla elde edildi. Ardından ligand kısmı için besin kütüphanesi seçildi. MTiOpenScreen web sunucusu üzerinden sanal tarama işlemi başlatıldı. Elde edilen sonuçlar, AutoDock Vina yazılımı tarafından hesaplanan bağlanma enerjileri (kcal/mol) ve bağlanma pozisyonları dikkate alınarak değerlendirildi. Bu analizler sonucunda, en uygun bağlanma enerjisine sahip, lipofilik bir karakter ve büyük ve karmaşık bir molekül olması sebebiyle OTOP proteinlerine en uygun ligand adayı olarak yamogenin belirlendi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Sanal tarama sonuçları

Bileşik	MODEL ID	Enerji (kcal/mol)	nRot
Smilagenone_ZINC000118936406	1	-10.9	0
Tsugaric_acid_A_ZINC000038852739	1	-10.8	7
Smilagenone_ZINC000118936407	1	-10.8	0
Yamogenin_ZINC000118913233	1	-10.6	1

Tablo 3.4. (devamı) Sanal tarama sonuçları

Solanidine_ZINC000118917271	1	-10.4	1
Amentoflavone_ZINC000003984030	1	-10.4	7
5alpha_Stigmastan_3_6_dione_ZINC000263584001	1	-10.4	6
R_Hispaglabridin_B_ZINC000014439708	1	-10.3	2
beta_Elemolic_acid_ZINC000257490152	1	-10.2	6
1_2_3_4_Tetrahydro_1_phenyl_4_1_phenylethyl_naphthalene_ZINC000095620638	1	-10.2	3
Yamogenin_ZINC000249699126	1	-10.1	1
Stigmasteryl_glucoside_ZINC000118915264	1	-10.1	12
Sapogenins_ZINC000257348756	1	-10.1	0
Neochlorogenin_ZINC000253530691	1	-10.1	2
Ganodermanondiol_ZINC000031302404	1	-10.1	7
Yamogenin_ZINC000118913234	1	-10.0	1
Sitosterol_beta_D_glucoside_ZINC000390822450	1	-10.0	13

Tablo 3.4. (devamı) Sanal tarama sonuçları

Plantacyanin_ZINC000022007964	1	-10.0	3
Enterocin_900_ZINC000031560977	1	-10.0	6
Coriandrinol_ZINC000049888788	1	-10.0	13
Collettiside_I_ZINC000253599623	1	-10.0	7
5_Epidemissidine_ZINC000028539649	1	-10.0	1
2alpha_3alpha_Dihydroxyolean_12_en_28_oic_acid_ZINC000248334876	1	-10.0	3
R_Hispaglabridin_B_ZINC000014439706	1	-9.9	2
Neogitogenin_ZINC000008234223	1	-9.9	2
Neochlorogenin_ZINC000118917390	1	-9.9	2
Ergosterol_ZINC000253497749	1	-9.9	5
Ergocalciferol_ZINC000038166947	1	-9.9	6
dammarenediol_II_ZINC000004097716	1	-9.9	6
Coriandrinol_ZINC000085645655	1	-9.9	13
Capsicoside_B2_ZINC000253499424	1	-9.9	13
alpha_Solanigrine_ZINC000078817070	1	-9.9	1
alpha_Amyrone_ZINC000006031046	1	-9.9	0

Tablo 3.4. (devamı) Sanal tarama sonuçları

1_2_3_4_Tetrahydro_1_phenyl_4__2_phenylet hyl_naphthalene_ZINC000095620632	1	-9.9	4
Sapogenins_ZINC000257348757	1	-9.8	0
Ergosterol_ZINC000253497744	1	-9.8	5
Coriandrinol_ZINC000118922613	1	-9.8	13
Betulinic_acid_ZINC000086860224	1	-9.8	3
alpha_Solanigrine_ZINC000118917292	1	-9.8	1
6__Malonylgenistin_ZINC000059728565	1	-9.8	13
3beta_5alpha_4_4_Dimethylergosta_8_24_28 __dien_3_ol_ZINC000256967721	1	-9.8	6
3beta_5alpha_4_4_Dimethylergosta_8_24_28 __dien_3_ol_ZINC000256967718	1	-9.8	6
24_Methyl_trans_22_dehydrocholesterol_ZIN C000004097813	1	-9.8	5
Yuccagenin_ZINC000038140885	1	-9.7	2
Yamogenin_ZINC000038139812	1	-9.7	1
Stellasterol_ZINC000257349724	1	-9.7	5

Tablo 3.4. (devamı) Sanal tarama sonuçları

Solasodiene_ZINC000004081783	1	-9.7	0
Solanidine_ZINC000263583557	1	-9.7	1
Porrigenin_A_ZINC000044405924	1	-9.7	3
Neogitogenin_ZINC000118916628	1	-9.7	2
Glycochenodeoxycholic_acid_3_glucuronide_ZINC000604936279	1	-9.7	13
Ganodermanontriol_ZINC000031302378	1	-9.7	9
Ergosterol_ZINC000003982480	1	-9.7	5
beta_Sitosterol_3_O_beta_D_Glucuronopyranoside_ZINC000253609791	1	-9.7	12
beta_Amyrenone_ZINC000025549432	1	-9.7	0
alpha_Amyrin_acetate_ZINC000256602002	1	-9.7	2
Acetylursolic_acid_ZINC000017434116	1	-9.7	3
3beta_Lanostenol_ZINC000257347596	1	-9.7	6
3b_5a_6b_Cholestanetriol_ZINC000004273510	1	-9.7	8
3alpha_12_Ursene_3_24_diol_ZINC000604381406	1	-9.7	3

Tablo 3.4. (devamı) Sanal tarama sonuçları

1_2_3_4_Tetrahydro_1_phenyl_4_1_phenylet hyl_naphthalene_ZINC000002585491	1	-9.7	3
Spinosterol_ZINC000004081884	1	-9.6	6
Smilagenone_ZINC000256408210	1	-9.6	0
Neochlorogenin_ZINC000085576447	1	-9.6	2
Luteolin_7_glucuronide_ZINC000238766135	1	-9.6	10
Luteolin_7_glucuronide_ZINC000059207071	1	-9.6	10
Farnesiferol_A_ZINC000002120151	1	-9.6	4
Epi_alpha_amyrin_ZINC000004097713	1	-9.6	1
Coriandrinol_ZINC000118913172	1	-9.6	13
Coriandrinol_ZINC000085532584	1	-9.6	13
Collettiside_I_ZINC000253558560	1	-9.6	7
Cholestanol_ZINC000005715769	1	-9.6	6
Betulafolienetriol_ZINC000584578311	1	-9.6	7
beta_Elemonic_acid_ZINC000098044023	1	-9.6	5
beta_Amyrenone_ZINC000254515709	1	-9.6	0

Tablo 3.4. (devamı) Sanal tarama sonuçları

alpha_Solanigrine_ZINC000001238284	1	-9.6	1
6__Acetylglycitin_ZINC000299817470	1	-9.6	11
3beta_5alpha_24S__Ergost_8_14__en_3_ol_ZI NC000256368967	1	-9.6	6
3b_4b_5a_24Z__4_Methylstigmasta_7_24_28 __dien_3_ol_ZINC000004074029	1	-9.6	6
24_Methylenecycloartan_3_ol_ZINC00000409 7817	1	-9.6	6
Yamogenin_ZINC000249699119	1	-9.5	1
Yamogenin_ZINC000242701898	1	-9.5	1
Ursolic_acid_ZINC000003947456	1	-9.5	2
Tomatidine_ZINC000008143640	1	-9.5	1
Taraxerol_ZINC000004082498	1	-9.5	1
Taraxasterol_acetate_ZINC000245224192	1	-9.5	2
Smilagenone_ZINC000118936408	1	-9.5	0
Sapogenins_ZINC000254591134	1	-9.5	0
Resin__from_formaldehyde__acetone__and_te traethylenepentamine_ZINC000001570222	1	-9.5	0
Ergostan_3_ol_ZINC000257355443	1	-9.5	6

Tablo 3.4. (devamı) Sanal tarama sonuçları

Ergocalciferol_ZINC000044830251	1	-9.5	6
Ercalcitriol_ZINC000096030318	1	-9.5	8
Epi_alpha_amyrin_ZINC000004429036	1	-9.5	1
Corosolic_acid_ZINC000014980294	1	-9.5	3
Coriandrinol_ZINC000253534733	1	-9.5	13
Clerosterol_3_glucoside_ZINC000096023778	1	-9.5	13
Chenodeoxycholic_acid_glycine_conjugate_ZI NC000013542524	1	-9.5	8
Capsicoside_B2_ZINC000253499425	1	-9.5	13
Campest_7_en_beta_ol_ZINC000036371861	1	-9.5	5
Calenduladiol_ZINC000256367731	1	-9.5	3

3.1.2. Reseptör Proteinlerinin Hazırlanması

Bu tez kapsamında, deneysel olarak çözülmüş bir insan OTOP1 kristal yapısı henüz bulunmadığından, bu etkileşimleri yapısal olarak değerlendirmek için makromolekül olarak insan OTOP1 reseptör proteininin üç boyutlu yapısı (AlphaFold Protein Structure Database, AF-Q7RTM1-F1-v6), insan OTOP2 reseptör proteininin üç boyutlu yapısı (AlphaFold Protein Structure Database, AF-Q7RTS6-F1-v6), insan OTOP3 reseptör proteininin üç boyutlu yapısı (AlphaFold Protein Structure Database, AF-Q7RTS5-F1-v6) kullanıldı. Protein yapısı AlphaFold Protein Structure Database üzerinden .pdb formatında indirildi. Daha sonra, proteinin pqr dosyaları, PDB2PQR aracı kullanılarak pdb dosyalarından elde edildi. PDB2PQR aracı, belirtilen pH değerinde protonasyon

durumlarını belirlemek için PROPKA yazılımını kullanmaktadır. Ayrıca eksik atomları yeniden oluşturmakta, H atomları eklemekte, atomik yükleri atmakta ve kuvvet alanını belirlemektedir. Ek olarak, Poisson–Boltzmann hesaplamalarıyla protonasyon durumlarını ve elektrostatik potansiyelleri tahmin etmektedir (PDB2PQR ** Use PDB2PQR Web Service Directly Instead of This Tool **. n.d.).

Bu işlemler tamamlandıktan sonra elde edilen pqr dosyası, doking aşamasına hazır hale getirildi.

3.1.3. Ligand Yapısının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında OTOP1 proteiniyle etkileşimi incelenecek ligand olarak yamogenin seçildi. Yamogenin molekülüne ait üç boyutlu yapı, PubChem veritabanı üzerinden (PubChem CID: 441900) 3D .sdf formatında indirildi.

Ligand optimizasyonu için Discovery Studio programı kullanıldı. İlk olarak ligand yapısına H atomları eklendi ve ardından Clean Geometry aracı kullanılarak geometrik optimizasyon yapıldı. Hazırlanan ligand dosyası, daha sonra AutoDock Tools (ADT) yazılımında kullanılmak üzere .mol2 formatında kaydedildi.

3.1.4. Bağlanma Bölgesi (Cep) Analizi ve Grid Merkezlerinin Belirlenmesi

OTOP kanallarının ligand bağlanma bölgeleri, literatürde dış bölge ve merkezi bölge olarak tanımlanan iki altbirimler arası yüzlerin cepleri üzerinden açıklanmaktadır (Brundei ve ark., 2025). Çalışmada tanımlanan bu iki cep, OTOP protein ailesinde yüksek düzeyde korunmuş olup, TM3–TM6 ve TM9–TM12 bölgeleri ile ilişkilidir. Bu tezde, literatürde tanımlanan cep bölgeleri insan OTOP1, OTOP2 ve OTOP3 modellerine AlphaFold üzerinden entegre edilmiştir. Bunun için önce cryo-elektron yapısı ile insan AlphaFold modelleri hizalanmış, cepleri oluşturan aminoasit kümeleri süperpozisyon yoluyla eşlenmiştir. Daha sonra cep bölgeleri PyMOL üzerinde manuel olarak seçilmiştir.

Cep merkezleri şu şekilde hesaplanmıştır:

OTOP1

- Outer site: (-2.63, 4.19, 3.01)

- Central site: (-4.83, -5.61, 9.98)

OTOP2

- Outer site: (-1.67, 1.73, 0.11)
- Central site: (-6.79, 0.75, -7.73)

OTOP3

- Outer site: (-9.50, 2.34, -2.78)
- Central site: (-3.48, -2.73, 5.60)

Bu koordinatlar her bir cep için grid kutusunun x–y–z merkez koordinatları olarak tanımlanmıştır. Böylece doking hesaplamaları doğrudan literatürde deneysel olarak doğrulanmış fonksiyonel bağlanma bölgelerine yönlendirilmiştir.

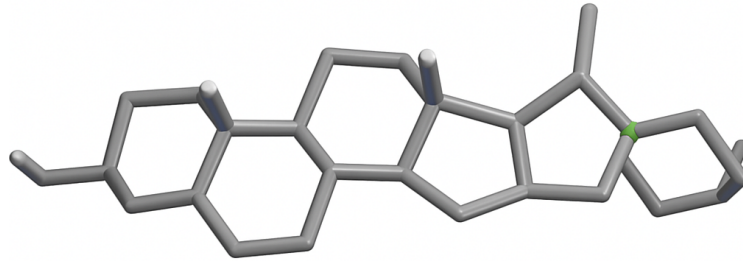
3.1.5. Moleküler Doking Çalışmaları

Moleküler doking, iki veya daha fazla molekülün üç boyutlu uzayda birbiriyle nasıl etkileşeceğini ve bağlanacağını tahmin etmeyi amaçlayan bir hesaplamalı modelleme yöntemidir (Sousa, Fernandes, and Ramos 2006). Doking programları, reseptör ve ligand moleküllerinin konformasyonel uzayını taramak için kullanılan bir arama algoritması ile bu bağlanma pozisyonlarını değerlendiren bir skarlama üzerine kuruludur (Berry, Fielding, ve Gamielien 2015; Huey ve ark., 2007). Dokingin ilk aşamasında, ligandın aktif bölge içinde veya bağlanma durumunda alabileceği olası pozisyonlar tahmin edilmektedir. İkinci aşamada, ligand ile reseptör arasında oluşan bağlanma pozlarının enerjileri skarlama fonksiyonları kullanılarak hesaplanmakta ve bu pozlar enerji değerlerine göre sıralanmaktadır. En düşük bağlanma enerjisine sahip pozlar, en uygun ve en yüksek afiniteye sahip reseptör-ligand etkileşimini temsil etmektedir. Bu nedenle, skarlama fonksiyonları büyük bileşik veritabanlarının taranması ve en düşük bağlanma enerjisine sahip potansiyel öncü bileşiklerin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Berry ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında kullanılan AutoDock Tools 1.5.7 yazılımı, yarı-ampirik bir kuvvet alanı yaklaşımına dayanmaktadır. AutoDock'un skorlama fonksiyonu, AMBER kuvvet alanı temelli beş terimli bir fonksiyona dayanmaktadır. Bu terimler Van der Waals etkileşimleri, H bağları ve Coulomb elektrostatik potansiyeli içermektedir (Ayhan Eşiyok ve ark., 2014; Berry ve ark., 2015; Tanchuk ve ark., 2016).

AutoDock'un arama algoritması Benzetilmiş tavlama, Genetik algoritma ve Lamarckçı genetik algoritma olmak üzere üç ana bileşenden oluşur. Bunlar arasında Lamarckçı genetik algoritma, diğerlerine göre daha yüksek performans göstermektedir. Bu algoritmada AutoDock, "ara ve sırala" yöntemiyle ligand ve reseptör arasındaki olası konfigürasyonları tarayıp etkileşim bölgelerini belirlemekte ve bağlanma enerjisine göre sıralama yapmaktadır.

Tez çalışmasında yamogenin'e ait mol2 dosyası, doking işlemini başlatmak için AutoDock Tools 1.5.7 programında açıldı. Şekil 3.16'da gösterildiği şekilde (yeşil nokta) ligandın rotasyon merkezi belirlenerek pdbqt formatında kaydedildi.



Şekil 3.15. Yamogeninin 3 boyutlu yapısı (Autodock Vina)

Daha sonra, tüm reseptörlerin .pqr dosyasına Gasteiger yükleri eklendi ve bu dosya .pdbqt formatında kaydedildi. Ardından, daha önce kaydedilen ligand .pdbqt dosyası seçilerek grid kutusu parametreleri düzenlendi. Grid kutusu daha önce belirlenen cep bölgelerine x-y-z boyutları 60x60x60 olarak ayarlandı. Spacing (Å) ve smoothness değerleri sırasıyla 0.375 ve 0.5 olarak hesaplandı. Grid parameter files (.gpf), grid kutusuna ait bu parametreleri depolamak için kullanıldı. Ardından ligand ve makromolekül yeniden seçilerek doking parametreleri tanımlandı. Genetik algoritmaya ait parametreler şu şekilde ayarlandı: popülasyon büyüklüğü 150 ve enerji değerlendirme sayısı 2 500 000 (orta).

Yamogenin molekülü, yalnızca bir dönebilen bağa sahip küçük ve yarı rijit bir bileşik olduğundan, konformasyonel arama uzayının sınırlı olmasına rağmen hesaplamaların daha güvenilir sonuç vermesi amacıyla 30 yerine 50 koşu gerçekleştirildi. Diğer tüm parametreler varsayılan değerlerde yapıldı.

Doking için gerekli tüm dosyalar hazırlandı ve bu parametreler .dpf (docking parameter file) dosyasında saklandı. AutoDock Tools kapatıldıktan sonra, terminal üzerinden çalışma başlatıldı. Öncelikle, oluşturulan .gpf dosyası şu komutla çalıştırılarak atom-spesifik afinite haritaları elde edildi:

```
autogrid4 -p otop1_yamogenin.gpf -l otop1_yamogenin.glg
```

Daha sonra docking işlemi şu komutla yürütüldü:

```
autodock4 -p otop1_yamogenin.dpf -l otop1_yamogenin.dlg
```

İşlem tamamlandıktan sonra oluşan .dlg dosyası AutoDock Tools 1.5.7 programında açıldı ve analiz edildi.

3.2. In Vitro

3.2.1. Kullanılan Gereçler

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarında, laboratuvar altyapısı kullanılarak gerçekleştirildi.

- Hücre kültürü petrisi
- 25 ve 75 cm² flask
- 6 kuyucuklu hücre kültürü plakası
- 12 kuyucuklu hücre kültürü plakası
- 96 kuyucuklu düz taban hücre kültürü plakası
- 15 ml ve 50 ml'lik falkon
- 5 ml, 10 ml ve 25 ml'lik serolojik pipet
- 200 µL ve 1000 µL'lik mikropipet uçları
- 1,5 ml'lik ependorf tüp

- 2 ml'lik kriyoviya
- Thoma lamı
- 0.22 ve 0.45 µL'lik membran filtre

3.2.2. Kullanılan Kimyasallar

- Fetal Bovine Serum (Capricorn, Cat No: FBS-HI-11A)
- DMEM-HG (NutriCulture, Cat No: DMEMHG05)
- Sodyum Pirüvat (Gibco, 11360-070)
- Esansiyel Olmayan Aminoasit (Diagnovum Cat No: D603-100ML)
- Penisilin/Streptomisin (NutriCulture cat No: PS100)
- Tripsin-EDTA (Capricorn, TRY-3B)
- Dimetil Sülfoksit – DMSO (NutriCulture, Cat No: DMSO50)
- Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide: MTT (AmBeed, CAS No: 298-93-1)
- Laktik Asit (BİOSHOP, LAC660.1, CAS No: 50-21-5)
- Yamogenin (Cayman, 36008 CAS No: 512-06-1)
- Etanol
- PBS
- OTOP1 ELISA (BT LAB, Cat.No E7938Hu)

3.2.3. Kullanılan Cihazlar

- pH metre (AD 12)
- Distile su cihazı (Mipro)
- Masaüstü soğutmalı santrifüj (Nuve, NF800)
- Mikrosantrifüj (BECMAN COULTER, Microfuge 20)
- Laminar biyogüvenlik kabini (MSC-II A-120, Class 2A MSC-20-A120.030)
- CO₂'li inkübatör (N-BIOTEK, NB-203XL)
- Inverted mikroskop (Euromex, OX.2053-PLPH)
- -86 celsius derin dondurucu (Telstar, U445 2.2)
- Buzdolabı (ALTUS, AL370N)
- ELISA okuyucu (Allsheng, AMR-100)

- Su banyosu (Mipro, MSB12023)
- Vorteks
- Masaüstü orbital çalkalayıcı (DLAB, SK-O330-PRO)
- Hassas terazi (KERN, ABS)
- Otoklav (Nuve, NC40M)
- Fotoğraf makinası

3.2.4. Hücre Kültürü Uygulamaları

Çalışmada kolorektal adenokarsinoma (Caco-2 (ATCC® HTB-37™) hücreleri kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarının tamamı steril laminar flow kabinde yapıldı.

Tablo 3.5. Caco2 hücre hattının genel özellikleri (ATCC).

Caco2 hücre hattının genel özellikleri	
Organizma	<i>Homo sapiens</i>
Hücre tipi	Enterosit
Doku	Kolon
Morfoloji	Epitelyal
Hastalık	Kolorektal adenokarsinoma
Besiyeri	DMEM HG, %10 FBS, %1 Na-pirüvat, %1 non-esansiyel aminoasit, %1 penisilin/streptomisin
Biyogüvenlik seviyesi	1

Caco2 hücreleri teslim alındıktan hemen sonra, %10 FBS (Fetal Sığır Serumı) içeren DMEM HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's L-glutaminli, Na-pirüvatlı)

besiyeri içeren petri kaplarında %5 CO₂ ve 37 °C ve %95 nem içeren ortamda inkübe edildi. Hücreler, flask yoğunluğu %70-80'e (confluency) ulaşınca pasajlandı. Ardından stokları kriyoviyallere alındı. Stoklar -86 °C derin dondurucuda saklandı. Pasajlanma sürecinde hücreler Tripsin-EDTA (%0.05) yardımıyla kaldırıldı.

3.2.5. Besiyerlerinin Hazırlanması

%10'luk FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 450 mL'lik besiyeri içerisine 50 mL FBS, 5 mL sodyum pirüvat, 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu, ve 5 mL penisilin/streptomisin ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyerlerinin ağzı parafilmle sarılarak kullanılıncaya kadar +4°C'ye kaldırıldı. Hücrelerle muamele edilmeden önce her kullanımda besiyerleri 37 °C'de ısıtıldı. %1'luk FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 495 mL'lik besiyeri içerisine 5 mL FBS 5 mL sodyum pirüvat, 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu ve 5 mL penisilin/streptomisin ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyerlerinin ağzı parafilmle sarılarak kullanılıncaya kadar +4°C'ye kaldırıldı. Hücrelerle muamele edilmeden önce her kullanımda besiyerleri 37 °C'de ısıtıldı.

3.2.6. Yamogeninin Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanması

Yamogenin (25 mg, Cayman CAS; 512-06-1, Saflık; ≥98%), toz halde ticari olarak satın alındı. Üretici firma yamogenin çözünürlüğünün etanol içinde 1mg/ml olduğunu bildirmiştir. Bu yüzden yamogenin etanol ile çözülüp 0.45 µm membran filtreden geçirilerek ana stok hazırlandı ve -20 °C'ye kaldırıldı. Etanol hücreler için toksik olabileceği için çözücü kontrol olarak sitotoksite deneyinde kontrol edildi. Literatür taramalarında yamogeninin kolon kanseri hücrelerinde etkisini araştıran tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada yamogeninin HCTT116 hücreleri üzerinde IC₅₀ konsatrasyonu 60 µg/mL bulunmuştur (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2024). MTT ile doz tarama çalışması için yamogeninin %1 FBS içeren (İlacın, besiyerindeki proteinlerle etkileşimini en aza indirebilmek için bu miktar seçildi) DMEM besiyeri içerisinde 60; 30; 15; 7,5 µg/mL dozları hazırlandı.

3.2.7. Laktik Asit ile Stimülasyon

Laktik asit, TME'de yer alan, tümör hücrelerine enerji sağlayan ve aynı zamanda tümörün büyümesini, ilerlemesini ve bağışıklık sisteminden kaçışını destekleyen bir sinyal

molekölü olarak görev yapan bir metabolik yan üründür (Li ve Cui 2023). Bununla birlikte zayıf, organik asittir; OTOPI proteini aracılığıyla aynı pH'da zayıf asitlerin güçlü asitlerden daha ekşi algılandığı bildirilmiştir (Teng ve ark., 2019). Laktik asit sıvı formda (Bioshop, LAC660.1, CAS No: 50-21-5, Saflık: %85-90, M_A: 90.08 g/mol) geldi. MTT ile doz tarama çalışması için %1 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde 1,6; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ve 1000 mM dozlarda laktik asit dozları hazırlandı.

3.2.8. Sitotoksikite Testi

Yamogeninin tek başına ve laktik asitle uyarılma sonucu Caco-2 hücrelerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek ve optimum dozları belirlemek amacıyla MTT testi kullanıldı. MTT testi, suda çözünen sarı MTT boyası [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] canlı (metabolik olarak aktif) hücrelerdeki mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmeyen mor bir formazan tuzuna dönüşmesi prensibine dayanmaktadır. Farklı kuyucuklardaki renklerin yoğunluğu ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülerek test tamamlanmaktadır (Plumb 2004). Bu test metabolik aktivitedeki küçük değişikliklerin analizine olanak tanımaktadır. Bu sayede doğrudan hücre ölümü olmadan toksik bir ajana maruz kalındığında hücre stresinin tespit edilmesini sağlamaktadır (Kumar, Nagarajan, ve Uchil 2018).

5 mg MTT çözeltisi 1 ml PBS içerisinde çözdürüldü. Ardından ve 0.22 µL'lik membran filtreden geçirildi, alüminyum folyo ile sarıldı ve -20°C'ye kaldırıldı. Caco-2 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5x10³ hücre (ml'de 25x10³) olacak şekilde bölündü. Bunun için; Flask yüzeyini >%80 oranında kaplayan hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılıp bir falkona alındı. Falkon hücrelerin homojen ve ayrı düşmesi için pipetajlanıp iyice çalkanlandı. Bu hücrelerden bir miktar endorfa aktarıldı ve tripan mavisi boyası ile 1:1 oranda sulandırılıp thoma lamında sayıldı. Ardından ml'deki hücre sayısı hesaplanıp hedef hacime göre oranlama yapıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda besiyeri uzaklaştırıldı. 60; 30; 15; 7,5 µg/mL yamogenin ve 1,6; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ve 1000 mM laktik asit dozları hücrelere uygulandı. Her bir doz için en az 8 kuyucuk kullanıldı. İlaç uygulamasını takiben deney başlangıcındaki hücre sayısını belirlemek için T₀ okumaları alındı ve hücreler 24 ve 48 saatlik %5 CO₂ ve 37 °C ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Ayrıca boş (blank) okuma alındı. Kombinasyon aşaması

için ise 24 saat laktik asit uygulamasının ardından besiyeri uzaklaştırılıp yamogenin uygulandı ve 24, 48 ve 72 saatlik %5 CO₂ ve 37 °C ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda, ilaçlı besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 100 µL/kuyucuk serumsuz taze besiyeri eklendi. Her bir kuyucuğa 10 µL MTT (12 mM) stok çözeltisi eklendi ve MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için, plakalar alüminyum folyoya sarılıp 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra besiyeri yavaşça çekilerek atıldı. Oluşan formazan tuzunu çözmek için, besiyerine 100 µL DMSO eklendi ve orbital çalkalayıcıda 10 dakika boyunca karıştırıldı. Ardından plakaların kapakları açık şekilde ELISA okuyucuda 562nm’de absorbans değerleri okundu. Absorbans değerlerinden blank okumalar çıkarıldı. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak etken maddelerin IC₅₀ değerleri Graphad Prism 7 programı kullanılarak belirlendi.

3.2.9. Migrasyon Deneyi

Hücre göçü, tek tek hücrelerin veya hücre kümelerinin bir yerden başka bir yere hareketi olarak tanımlanmaktadır. Migrasyon, yara onarımı, kanser invazyonu ve metastazı, immün yanıtlar, anjiyogenez ve embriyonik morfogenezin ayırt edici bir özelliğidir (Grada ve ark., 2017).

Uygulanan etken maddelerin lateral hücre göçü üzerine etkileri migrasyon deneyi ile belirlendi. 12 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5×10^4 hücre (ml’de 25×10^3) olacak şekilde hücreler bölündü ve confluent oluncaya kadar 37 °C’de %5 CO₂’li inkübasyona bırakıldı. Hücreler confluent olduktan sonra besiyeri uzaklaştırıldı, kalemle orta alan çizildi ve 200 µl’lik steril pipet ucuyla yara oluşturuldu. Ardından yavaş bir yıkama yapıldı ve eski besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri eklendi. Yıkama sonrası belirlenen IC₅₀, 1/2 IC₅₀ ve 2xIC₅₀ konsantrasyonlarda yamogenin, laktik asit ve laktik asit stimülasyonu ardından yamogenin grupları olarak uygulandı. Yamogenin ve laktik asit grupları için 0, 3, 6 ve 24 saatlerde hücrelerin mikroskop görüntüleri kaydedildi. Son grup için ise 24 saatlik laktik asit uygulaması ardından yara oluşturuldu ardından 24 saatlik yamogeninle muamele sonrası hücrelerin mikroskop görüntüleri kaydedildi. Yamogenin dozları 3. Saatten itibaren etkisini gösterdiği için inkübasyon süreleri uzatılmadı. Bulgular ImageJ programında analiz edildi.

3.2.10. OTOP1 ELISA Testi

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi, bir örnek içinde antijen veya protein gibi belirli bir maddeyi nicel olarak ölçmek amacıyla kullanılan immünolojik bir analiz tekniğidir. Bu yöntemde antijen–antikor etkileşimi sonucunda bir enzim sayesinde renk değişimi oluşturularak renk yoğunluğu, spektrometre aracılığıyla ölçülür. Bu sayede hedef maddenin miktarını saptanır. Daha karmaşık örneklerin analizinde sandviç ELISA yöntemi tercih edilir. Bu yöntemde hedef antijen, iki farklı antikor arasında “sandviç” şeklinde tutulur; biri katı yüzeye bağlanmış yakalama antikoru diğeri ise enzimle işaretlenmiş tespit antikoru. Böylece özgüllük ve duyarlılık artar. Bu tez çalışmasında da örneklerde hedef proteinin düzeyini belirlemek amacıyla sandviç ELISA kiti kullanılmıştır (Shah ve Maghsoudlou, 2016).

Caco-2 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünüp üzerine IC_{50} , $1/2 IC_{50}$ ve $2xIC_{50}$ konsantrasyonlarda yamogenin, ve 3.125 mM ve 50 mM laktik asit ve laktik asit stimülasyonu ardından yamogenin grupları olarak uygulandı. Yamogenin ve laktik asit grupları için 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda etken madde uygulaması sonlandırılırken son grup için 24 saatlik laktik asit uygulaması ardından 24 saatlik yamogeninle muamele sonrası etken madde uygulaması sonlandırıldı. Ardından besiyerleri uzaklaştırılıp hücreler toplandı. Ayrıca ölüp kalkan hücreler etiketlenerek ependorflara toplandı. Ardından santrifüjlenerek PBS içinde toplandı. OTOP1 bir membran protein olduğu için Caco-2 hücreleri parçalandı. Lizis protokolüne göre önce hücreler PBS ile yıkandı ve ardından 1mL PBS içerisinde alındı. Bu aşamada hücreler tekrarlayan dondur-çöz döngüleri (30dk -20 °C’de içerisinde tutulma + 37 °C’de 10 dk su banyosunda tutulma) ile parçalandı. Bu döngü 3 kez tekrarlandı. Hücreler 20 dk 3000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatantlar protokole uygun bir şekilde çalışıldı.

Yamogeninin tek başına ve laktik asitle uyarılma sonucu hücrelerdeki OTOP1 proteinini miktarı üzerine etkilerini belirlemek için ELISA kiti ((BT LAB, Human Proton Channel OTOP1 ELISA Kit, Cat.No E7938Hu) kullanıldı. Kit kullanılmadan önce 30 dk oda ısısında bekletildi. 6 ml 25x yıkama tamponu konsantresi, 144 ml distile su ile karıştırılarak 150 ml $1\times$ yıkama tamponu elde edildi. Ardından 120 µl hacimde standart (80 ng/ml) 120 µl standart seyreltici ile karıştırılarak 40 ng/ml stok standart çözeltisi

hazırlanır. Standart solüsyonunun iyice homojen olması amacıyla 15 dk boyunca hafifçe karıştırılarak bekletildi. Stok standart çözeltisi 1:2 oranında seyreltilerek 20;10;5;2.5 ng/ml ara stok standart çözeltileri hazırlandı. Bunların yanında bir de 0 ng/ml (boş kontrol) standart seyreltici bulunan ependorf ayrıldı. Arta kalan stok standart çözeltisi -20 °C'ye kaldırıldı.

Her bir standart kuyucuğuna 50 µL standart çözeltisi eklendi. Boş kontrol kuyucuğuna standart seyreltici kondu. Örnek kuyucuklarına 40 µL örnek (lizat) eklendi ardından bu kuyucuklara 10 µL anti-OTOP1 antikoru eklendi. Boş kontrol kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Karıştırıcı ile plaka çalkalanıp ve sealer ile kapatılarak 37 °C'de 60 dk inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrası, bağlanmamış Streptavidin-HRP'yi uzaklaştırmak amacıyla sealeri çıkarılıp 5 kere yıkama tamponu ile kuyucukları yıkandı. Her yıkama için 300 µL yıkama tamponu x 30 saniye-1dk bekletme periyotları uygulandı. Ardından plaka havlu kâğıt üzerine koyuldu ve bastırarak kurulandı. Bu aşamadan sonra her kuyucuğa 50 µL Substrat Çözeltisi A ve 50 µL Substrat Çözeltisi B eklendi. Plaka sealer ile kapatılıp alüminyum folyo ile kaplanarak 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucuğa 50 µL asidik durdurma solüsyonu eklendi. 10 dk içerisinde 450nmde OD değeri ölçüldü ve sonuçlar excele aktarıldı ve GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ile analiz edildi.

3.2.11. İstatistiksel Analiz Çalışmaları

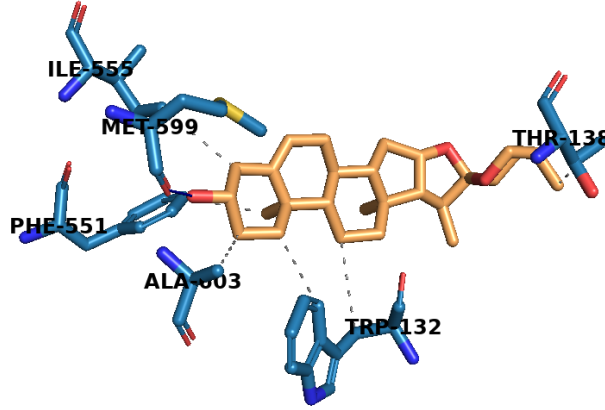
Tez projesinden elde edilen verilerde, MTT testin verilerinde grupların kontrol ile karşılaştırılması için tek yönlü ANOVA testleri kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ELISA testi sonuçlarının değerlendirilmesi için ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde öncelikle standart eğriler oluşturulmuş, bu amaçla four-parameter logistic (4PL) non-linear regression modeli kullanıldı. Standart eğriler üzerinden örneklerin konsantrasyonları interpolasyon yöntemiyle hesaplandı. Yamogenin/Laktik asit ve kontrol gruplarına ait veriler standartlarla birlikte aynı analizde değerlendirildi. Elde edilen konsantrasyon değerleri tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile karşılaştırıldı. Migrasyon testi sonuçları için yüzde alan formülü uygulandı. Elde edilen veriler GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ve Microsoft Excel (Office 365, Version 16.x) programları kullanılarak grafiklendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Doking Sonuçları

Bu tezde yamogeninin insan OTOP1, OTOP2 ve OTOP3 reseptörlerine bağlanma potansiyeli, daha önce belirlenen dış ve merkezi alt birimler arası arayüz cep bölgeleri üzerinden değerlendirilmiştir. Doking analizleri sonucunda, yamogeninin her üç reseptörde de merkezi cebe, dış cebe kıyasla daha yüksek afiniteyle bağlandığı belirlenmiştir. OTOP1 reseptöründe yamogenin için en yüksek bağlanma affinitesi merkezi cep bölgesinde elde edilmiştir (-8.10 kcal/mol). Dış cep bölgesindeki bağlanma enerjisi ise -6.95 kcal/mol bulunmuştur.

Bağlanma modu analizleri, yamogeninin merkezi cep içinde Met599 kalıntısı ile bir adet H bağı oluşturduğunu ve Trp132, Thr138, Phe551, Ile555 ve Ala603 gibi hidrofobik amino asitlerle güçlü hidrofobik etkileşimler kurduğunu göstermiştir. Bu hidrofobik mikroçevre, cep geometrisine uygun olarak ligandı stabilize eden ana unsuru oluşturduğu tahmin edilmiştir (Şekil 4.17). Bu sonuçlar, OTOP1'in proton iletim yolu ile ilişkili alt birimler arası merkezi cep bölgesinin yamogenin tarafından potansiyel olarak hedeflenebileceğini ve molekülün fonksiyonel modülasyon oluşturabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.16. Yamogeninin OTOP1 reseptörünün merkezi cep bölgesindeki bağlanma pozisyonu. Görselde MET599 ile oluşan hidrojen bağı ve Trp132, Thr138, Phe551, Ile555, Ala603 ile kurulan hidrofobik etkileşimler gösterilmektedir.

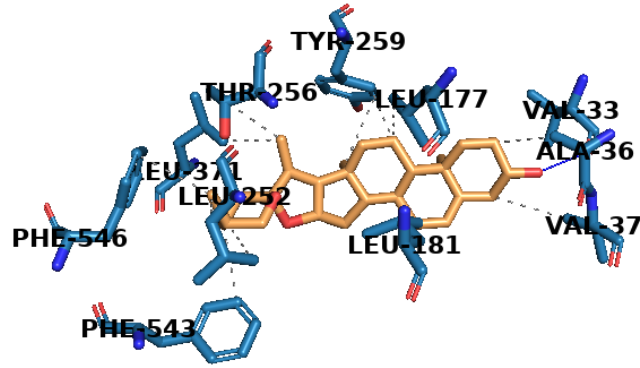
Tablo 4.6. Şekil 4.17’de gösterilen bağlanma pozisyonuna ait moleküler etkileşimlerin tablo formatı. Met599 ile oluşan H bağına ilişkin mesafe ve açı ile hidrofobik etkileşim oluşturan kalıntıların atom–atom temas mesafeleri detaylı olarak verilmiştir.

Hidrofobik Etkileşimler					
İndeks	Kalıntı	Aminoasit	Uzaklık	Ligand atom	Protein atom
1	132U	TRP	3.47	18	1207
2	132U	TRP	3.87	12	1202
3	138U	THR	3.66	29	1267
4	661U	PHE	3.57	22	5203
5	555U	ILE	3.65	23	5239
6	603U	ALA	3.78	24	5694

H Bağları									
İndeks	Kalıntı	Aminoasit	Uzaklık H-A	Uzaklık D-A	Donör Açısı	Protein Donörü?	Yan Zincir	Donör Atom	Alıcı Atom
1	599U	MET	2.39	3.35	165.24	X	X	30 [O3]	5660[O2]

OTOP2 reseptöründe yamogeninin en iyi bağlanma pozisyonu benzer şekilde merkezi cep bölgesinde elde edilmiştir. Merkezi bölge için bağlanma enerjisi -9.03 kcal/mol olup, bu değer tüm reseptörler arasında en yüksek afiniteyi temsil etmektedir. Dış bölge cebi bağlanma enerjisi -6.89 kcal/mol olup, iki cep arasında belirgin bir bağlanma enerjisi farkı bulunmaktadır.

Yamogenin–OTOP2 kompleksinde VAL33 ile bir adet H bağı olduğu, bunun yanında Ala36, Val37, Leu177, Phe543 ve Phe546 kalıntıları ile geniş bir hidrofobik etkileşim ağı meydana geldiği belirlenmiştir. Bu bağlanma modu yamogeninin cebi içerisine derin ve kararlı şekilde yerleştiğini göstermektedir (Şekil 4.18). Bu sonuçlar yamogeninin OTOP2 üzerindeki bağlanmasının hem enerji değeri hem de etkileşim çeşitliliği açısından en güçlü bağlanma davranışını sergilediğini göstermektedir.



Şekil 4.17.Yamogeninin OTOP2 reseptörünün merkezi cep bölgesindeki bağlanma pozisyonu. Şekilde Val33 ile H bağı ve Ala36, Val37, Leu177, Tyr259, Phe543 ve Phe546 kalıntıları ile gerçekleşen hidrofobik etkileşimler görülmektedir

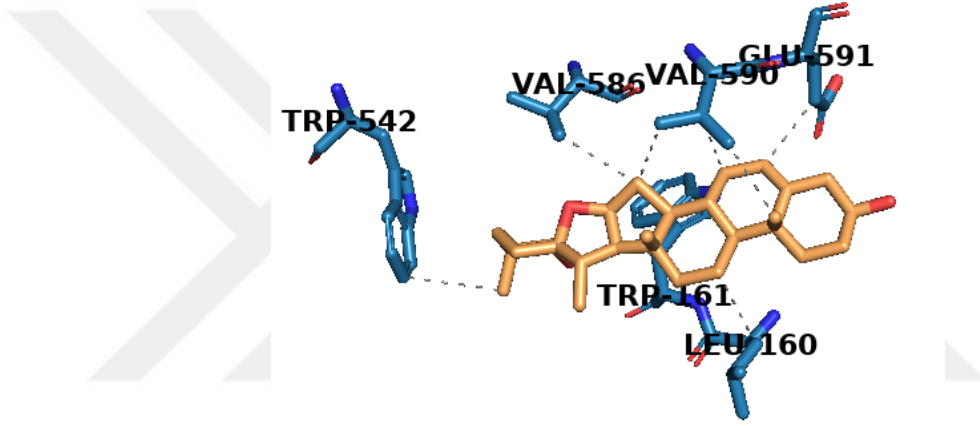
Tablo 4.7. Şekil 4.18’de gösterilen bağlanma pozisyonuna ait moleküler etkileşimlerin tablo formatı. Val33 ile oluşan H bağına ilişkin mesafe ve açı ile hidrofobik etkileşim oluşturan kalıntıların atom–atom temas mesafeleri detaylı olarak verilmiştir.

Hidrofobik Etkileşimler					
İndeks	Kalıntı	Aminoasit	Uzaklık	Ligand atom	Protein atom
1	36U	ALA	3.48	24	363
2	37U	VAL	3.81	23	371
3	177U	LEU	3.27	12	1691
4	181U	LEU	4.00	16	1729
5	252U	LEU	3.47	27	2397
6	252U	LEU	3.37	29	2394
7	256U	THR	3.93	19	2430
8	259U	TYR	3.80	15	2461
9	259U	TYR	3.17	12	2459
10	371U	LEU	3.44	19	3534
11	543U	PHE	3.61	25	5127
12	546U	PHE	3.72	29	5154

H Bağları									
İndeks	Kalıntı	Aminoasit	Uzaklık H-A	Uzaklık D-A	Donör Açısı	Protein Donörü?	Yan Zincir	Donör Atom	Alıcı Atom
1	33U	VAL	2.22	2.71	109.46	X	X	30 [O3]	336[O2]

OTOP3 reseptöründe de yamogenin merkezi cep bölgesine daha yüksek enerji ile bağlanmıştır. Merkezi bölge bağlanma enerjisi -8.87 kcal/mol, dış bağlanma cebi ile ise -7.68 kcal/mol enerji ile bağlanmıştır.

OTOP3 cep analizinde H bağı tespit edilmemiş, ancak bağlanmanın tamamen hidrofobik etkileşimler üzerinden stabil hale geldiği görülmüştür. Leu160, Trp161, Val586, Val590 ve Glu591 kalıntıları yamogeninin cep içinde stabilize olmasını sağlayan ana etkileşim yüzeylerini oluşturmuştur (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. Yamogeninin OTOP3 reseptörünün merkezi cep bölgesindeki bağlanma pozisyonu. Bağlanma tamamen hidrofobik aminoasitlerle gerçekleşmekte olup Leu160, Trp161, Val586, Val590 ve Glu591 ile etkileşimler sergilenmektedir.

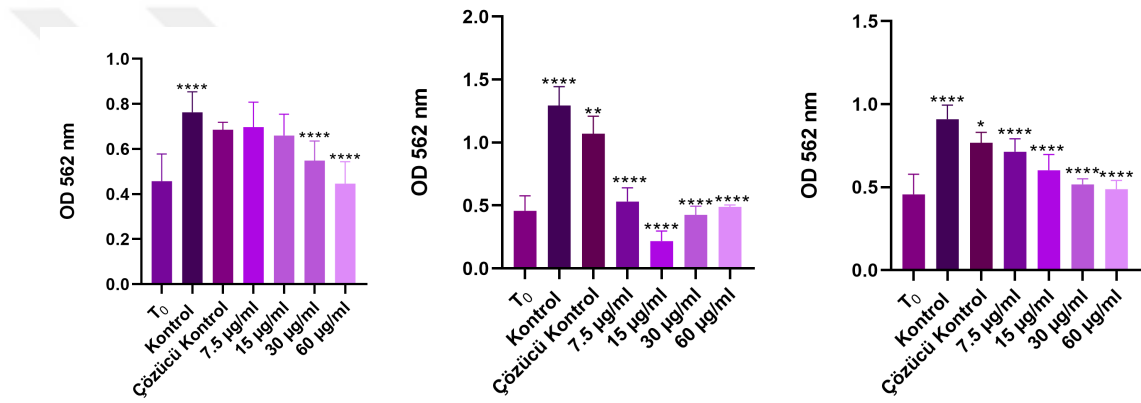
Tablo 4.8. Şekil 4.19’da gösterilen OTOP3 merkezi cep bağlanma pozisyonuna ait moleküler etkileşimlerin tablo formatı. Hidrofobik bağlara ilişkin atom–atom mesafeleri sunulmuştur.

Hidrofobik Etkileşimler					
İndeks	Kalıntı	Aminoasit	Uzaklık	Ligand atom	Protein atom
1	160U	LEU	3.51	12	1564
2	161U	TRP	3.01	5	1573
3	542U	TRP	3.82	29	5198
4	586U	VAL	3.38	9	5626
5	590U	VAL	3.27	16	5652
6	590U	VAL	3.12	22	5653
7	590U	VAL	3.27	9	5654
8	591U	GLU	3.31	21	5661

4.2. *In Vitro* Çalışma Sonuçları

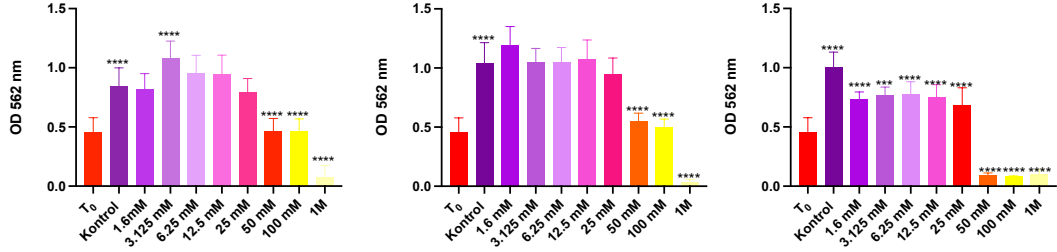
4.2.1. Sitotoksikite Sonuçları

Yamogenin'in Caco-2 hücre hattı üzerindeki etkisi doza ve zamana bağlı olarak değişmiştir. Bileşiğin 24 ve 48 saatlik uygulamalarda IC₅₀ değeri yaklaşık 30 µg/ml olarak hesaplanmıştır. 48. saatte yamogeninin metabolize olmasına bağlı olarak logaritmik bir eğri görülmüştür. Bileşik, 48 ve 72. saatlerde en düşük dozlar da dahil olmak üzere sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.20).



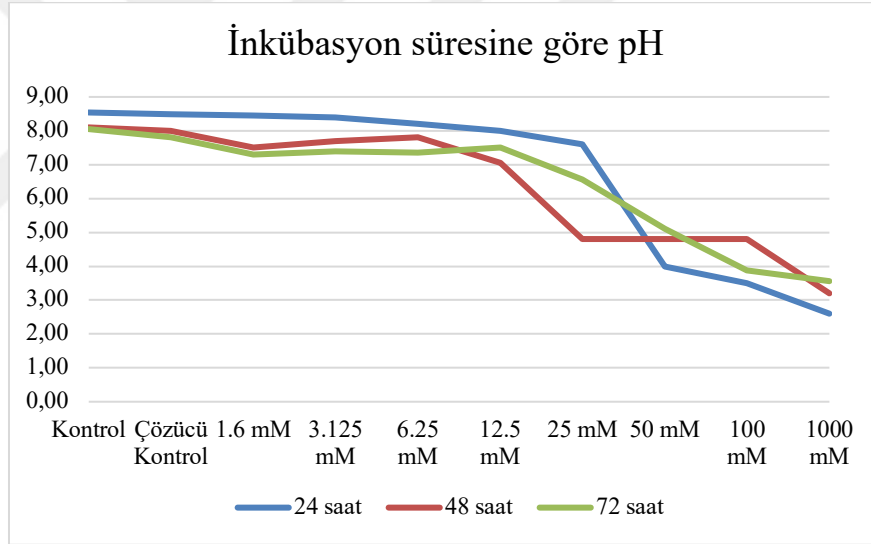
Şekil 4.19. Yamogenin'in Caco-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda hücre canlılığı üzerine etkisi. A) 24 saat inkübasyon B) 48 saat inkübasyon C) 72 saat inkübasyon

Caco-2 hücrelerine literatürdeki TME çalışmalarında kullanılan 1,6; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ve 1000 mM konsantrasyonlarında laktik asit uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre canlılığı MTT ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, laktik asidin ters U şeklinde bir grafik oluşturduğunu göstermiştir. 24 ve 48. Saatlerde düşük doz laktik asit konsantrasyonlarında proliferasyonda artış gözlenirken 72. saatte hücre ölümleri başlamış ve kontrol de dahil olmak üzere hücre canlılığında hafif azalmalar görülmüştür. 24 ve 48. saatlerde laktik asite bağlı ölümler 25 mMdən itibaren görülmeye başlanmıştır. Laktik asitin IC₅₀ değeri tüm zaman noktalarında 50 mM olarak hesaplanmıştır. Bulgular, Caco-2 hücrelerinin düşük doz laktik asit konsantrasyonlara karşı dayanıklı ve hatta proliferatif etkiyi arttırıcı, ancak yüksek dozlarda laktik asit aracılı stres altında canlılığını kaybettiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, laktik asidin Caco-2 hücrelerinde asidik TME koşullarını taklit ederek metabolik stresi artırdığı ve uzun süreli maruziyetlerde sitotoksik etkinin güçlendiği belirlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. Laktik asidin Caco-2 hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Şekiller soldan sağa sırasıyla; A) 24 saat inkübasyon B) 48 saat inkübasyon C) 72 saat inkübasyon

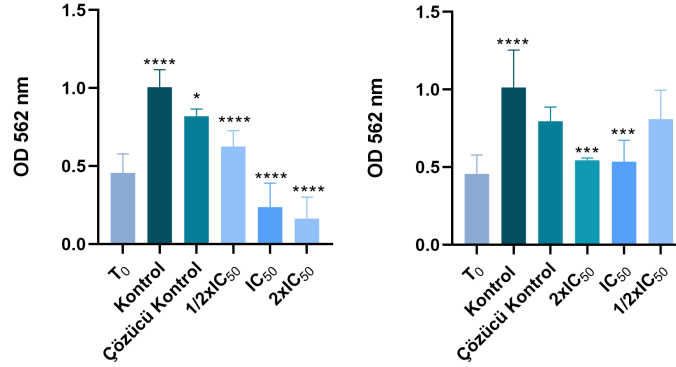
İnkübasyon sürelerinin sonunda her konsantrasyondan besiyerleri toplanarak pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir. pH değerlerinin, laktik asit konsantrasyonu ve inkübasyon süresi arttıkça kademeli olarak düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.22). Bu sonuç, laktik asidin ortam pH'sını azaltarak asidik mikroçevre koşullarını oluşturduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.21. Laktik asit konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak ortam pH'sındaki değişim.

Bu bulguların ardından Caco-2 hücrelerinde asidik mikroçevre koşullarının yamogenin'in sitotoksik etkisi üzerindeki rolünü değerlendirmek amacıyla, hücreler öncelikle 24 saat boyunca 50 mM laktik asit ile stimüle edilmiş, ardından 24 ve 48 saat boyunca 2xIC₅₀, IC₅₀, ve 1/2IC₅₀ dozlarında yamogenin uygulanmıştır. Uygulama sonrası üreticinin önerisine uygun bir şekilde plakalar 562 nm'de okunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, laktik asit ile ön muamele yapılan hücrelerde yamogeninin sitotoksik etkisi daha erken dozlarda ve daha yüksek düzeyde ortaya çıkmıştır. Kombine gruplarda hücre canlılığında belirgin azalma gözlenmiş ve IC₅₀ değerlerinin, yalnızca yamogenin uygulanan gruplara kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, asidik mikroçevre koşullarının

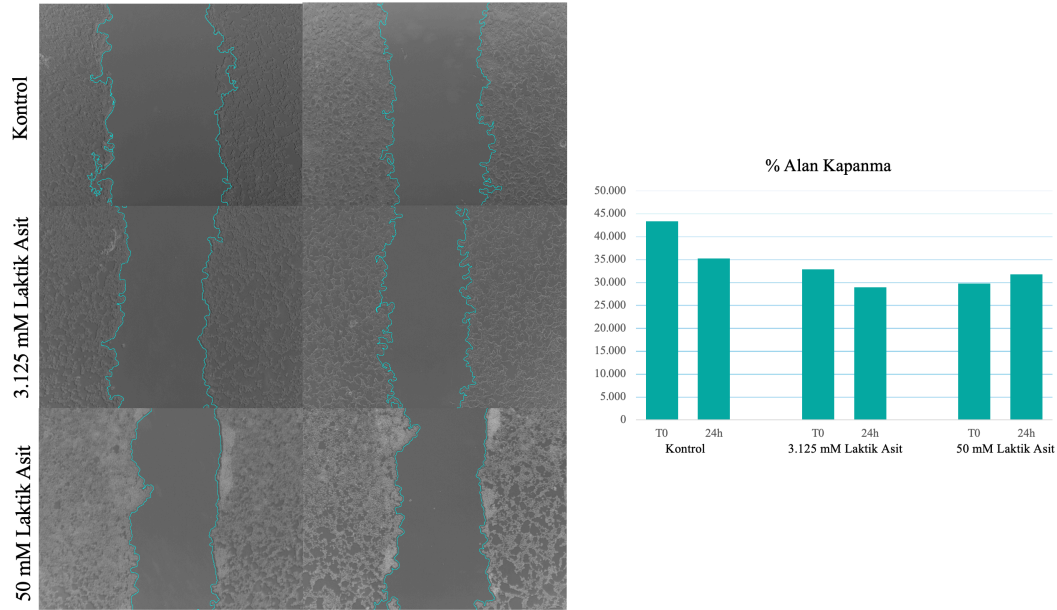
yamogenin'in sitotoksik etkisini potansiyel olarak artırabileceğini ve Caco-2 hücrelerinde organik asit ile stimülasyonun hücre duyarlılığını artırdığı göstermektedir (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. Laktik asit ile ön muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinde Yamogenin uygulaması sonrası hücre canlılığı. A) 24 saat inkübasyon B) 48 saat inkübasyon

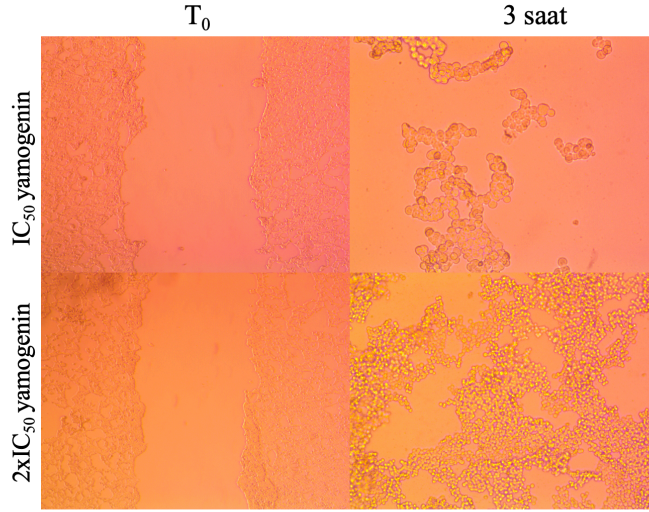
4.2.2. Migrasyon Testi Sonuçları

Yamogenin'in Caco-2 hücrelerinin migrasyon kapasitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla migrasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Hücreler IC₅₀, 2×IC₅₀ ve ½×IC₅₀ konsantrasyonlarında yamogenin ve laktik asitle ile muamele edilerek 0 ve 24 saatlik sürelerde yara alanının kapanma oranı ölçülmüştür. Kontrol grubunda ve 3.125 mM laktik asit verilen grupta yara alanında kapanma gözlenirken 50 mM laktik asit verilen grupta hücre göçü tamamen durmuştur (Şekil 4.24).



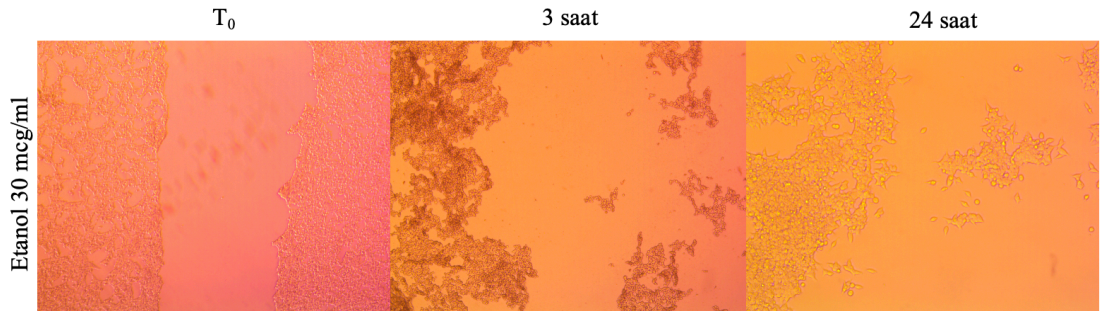
Şekil 4.23. Laktik asitin Caco-2 hücre migrasyonu üzerindeki etkisi.

Yamogenin gruplarında ise IC_{50} ve $2 \times IC_{50}$ dozlarında ilk 3 saat içerisinde hücreler tamamen ölmüştür (Şekil 4.25).



Şekil 4.24. Yamogeninin Caco-2 hücre migrasyonu üzerindeki etkisi.

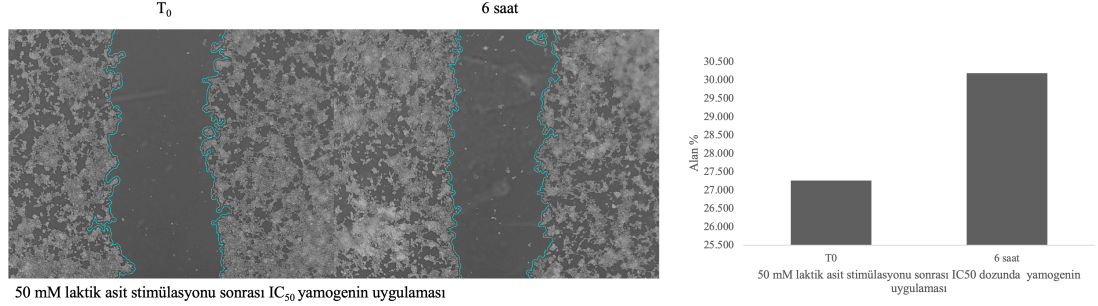
Çözücü kontrol grubunda ise ilk 3 saat içerisinde hücreler apoptoz sürecine girmiş, 8. saatten itibaren stres durumu ortadan kalmış ve 24. saatte sağlıklı morfolojik yapılarında kalmışlardır. Bu durum anastasis adı verilen ölümden geri dönüş fenomeniyle açıklanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. Çözücü Kontrolün Caco-2 hücre migrasyonu üzerine etkisi

50 mM laktik asit stimülasyonu sonrası, IC_{50} dozlarında yamogenin ile tedavi edilen hücrelerde 6. saatte hücre migrasyon alanında belirgin bir açılma gözlenmiştir. Ancak 24. saatte gelindiğinde, hücre canlılığının kaybolması nedeniyle migrasyon alanı kalmamış ve hücreler apoptoz sürecine girmiştir. Buna ek olarak, 3.125 mM laktik asit ile stimüle

edilen hücrelerde IC₅₀ dozlarında yamogenin uygulanmasından sonra 3. saatte dahi hücrelerin büyük kısmının öldüğü ve migrasyon alanında canlı hücre kalmadığı görülmüştür (Şekil 4.27). Bu sonuçlar, yamogenin'in sitotoksik ve antimetastatik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir

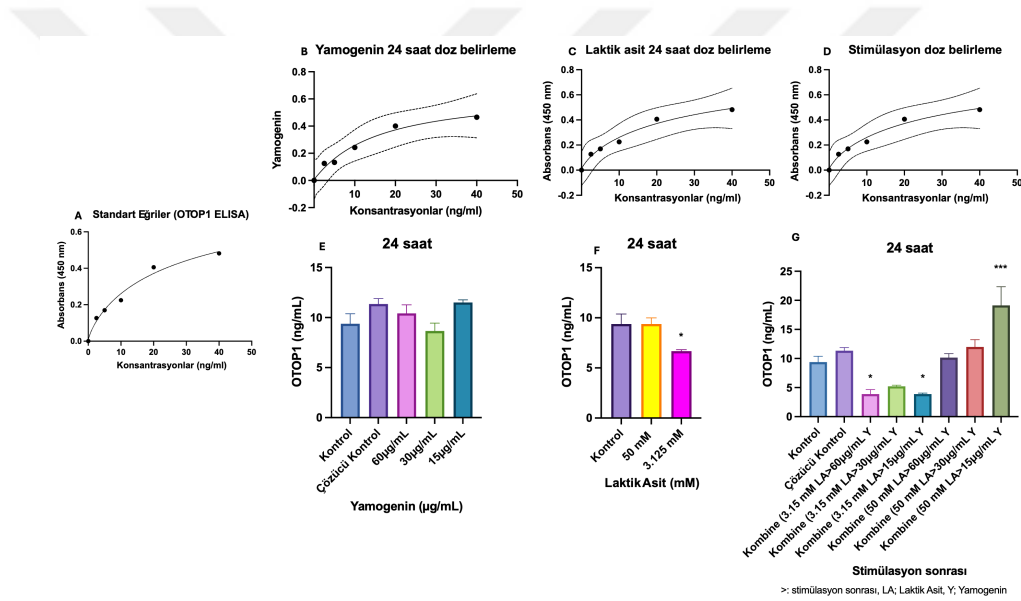


Şekil 4.26. 50 mM laktik asit stimülasyonu sonrası IC₅₀ dozunda yamogenin uygulanan hücrelerde 6. saatte migrasyon alanındaki değişim.

4.2.3. OTOP1 Ekspresyonunun ELISA ile Gösterilmesi

Caco-2 hücrelerinde laktik asit ile 24 saatlik stimülasyon sonrası uygulanan yamogenin tedavisinin OTOP1 protein düzeyleri üzerindeki etkisi ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. (Şekil 4.26). ELISA sonuçları Caco-2 hücrelerinde OTOP1 ekspresyonunun varlığını açık bir şekilde göstermektedir. Bu bulgu ekşi reseptörlerin herhangi bir kanser hücresindeki varlığını gösteren ilk çalışmadır. Çözücü kontrol grubunda OTOP1 ekspresyonunda hafif bir artış gözlenmiştir. 15 µg/ml ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$) yamogeninin 24 saat boyunca uygulanması sonucu ölüm oranı düşük gözlemlenirken ELISA sonuçlarında OTOP1 ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. Düşük doz 24 saat laktik asit uygulaması (pH 8.4) Caco-2 hücrelerinde proliferatif etkiye neden olurken OTOP1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağlamıştır. Bu azalma 24 saat laktik asit stimülasyonu sonrası 24 saatlik yamogeninle tedavi sonrasında daha da belirginleşmiştir. 50 mM asitle 24 saat inkübasyon sonrası (pH 4.0) Caco-2 hücrelerinde ciddi bir ölüm gözlenirken OTOP1 seviyelerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bununla birlikte düşük doz yamogenininle artan OTOP1 seviyeleri 50 mM yamogeninle belirginleşmiştir. Bu sonuçlar MTT sonuçları ile de uyumludur. MTT sonuçlarında da benzer şekilde yamogenin tek başına az bir ölüme sebep olurken 50 mM laktik asit ile stimülasyon sonrası sinerjistik bir etki göstermiştir (Şekil 4.25).

Özetle, elde edilen bulgular OTOP1 düzeylerindeki artışın hücre ölüm oranının yükselmesiyle, azalmanın ise hücre proliferasyonunun artmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Yamogenin'in tek başına uygulandığında OTOP1 ekspresyonunda belirgin bir artış oluşturmadığı, buna karşın laktik asidin OTOP1 düzeylerini artırdığı belirlenmiştir. Yamogenin ve laktik asidin birlikte uygulanması ise OTOP1 ekspresyonunda tek başına uygulamalara kıyasla daha güçlü ve sinerjistik bir artışa yol açmıştır.



Şekil 4.27. Yamogenin, laktik asit ve stimülasyon sonrası yamogenin uygulamasının sürelerinde OTOP1 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi. A) Standart eğrisi B) 24 saat yamogenin uygulaması sonrası OTOP1 ekspresyon miktarları C) 24 saat laktik asit uygulaması sonrası OTOP1 ekspresyon miktarları D) 24 saat laktik asit ile stimülasyon ardından 24 saat yamogenin uygulaması sonrası OTOP1 ekspresyon miktarları E) 24 saat yamogenin uygulaması sonrası OTOP1 ekspresyon miktarlarının one way ANOVA ile karşılaştırılması F) 24 saat laktik asit uygulaması sonrası OTOP1 ekspresyon miktarlarının one way ANOVA ile karşılaştırılması ($p < 0,0436$) G) 24 saat laktik asit ile stimülasyon ardından 24 saat yamogenin uygulaması sonrası OTOP1 ekspresyon miktarlarının one way ANOVA ile karşılaştırılması (* $p < 0,0160$; *** $p < 0,0004$).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Yamogenin'in KRK hücrelerinde OTOP1 proteini aracılığıyla Caco-2 kolon adenokarsinoma hücreleri üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, Yamogenin'in OTOP1 proteini ile güçlü bir afiniteye sahip olduğunu (-8.10 kcal/mol) ve bağlanmayı özellikle Met599 kalıntısı üzerinden kurduğunu göstermektedir. Bununla birlikte ELISA sonuçları tek başına yamogenin uygulamasının OTOP1 protein ekspresyonu üzerinde bir değişikliğe neden olmadığını ancak asit stimülasyonundan sonra yamogenin uygulamasının OTOP1 proteininin ekspresyonunu laktik asit dozuna bağlı olarak modüle ettiğini göstermiştir. Ayrıca tüm OTOP proteinleri arasında yamogenin merkezi cepte en yüksek bağlanma affinitesini OTOP2 proteini üzerinden göstermiştir. Bu da antiproliferatif etkisini OTOP2 proteini üzerinden gerçekleştiriyor olabileceğini göstermektedir. Şimdiye kadar OTOP2'nin çeşitli gastrointestinal tümörlerde ve KRK hücre hatlarında ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Qu ve ark., 2019). Bununla birlikte Caco-2 hücre hattında ekspresyonuna veya yamogeninle tedavisine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut ilaçlar için yeni hedeflerin hesaplamalı olarak belirlenmesi, ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarında son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Bu yaklaşımın *de novo* ilaç geliştirme yöntemlerine göre daha düşük risk, daha az maliyet ve daha hızlı ilerleme gibi önemli avantajları bulunmaktadır. Bu süreci kolaylaştırmak amacıyla geliştirilen sanal tarama sunucuları, ilaç-hedef etkileşimlerinin hesaplamalı olarak tahmin edilmesini, mevcut bileşiklerin yeni terapötik hedeflerle eşleştirilmesini ve böylece ilaç yeniden konumlandırma süreçlerinin hızlandırılmasını sağlamaktadır (Gan ve ark., 2022). Çalışmamızda sanal tarama yöntemiyle OTOP1 proteine yüksek affinite ile bağlandığını bulduğumuz yamogenin bileşiği lipofilik karakteri ve büyük bir bileşik olması (Grayu Erişim Tarihi: 17 Ekim 2025) nedeniyle merkezi cebe yapılan doking sonucunda da yüksek bağlanma enerjisi göstermiştir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda yamogeninin çeşitli kanser hücre hatlarında güçlü sitotoksik ve antikanser etkiler gösterdiği bildirilmiştir. 2009 yılında yayınlanan bir çalışmada yamogenin, HepG2 (karaciğer), A549 (akciğer), MCF-7 (meme) ve MGC-803 (mide) kanseri hücrelerinde $25-35$ $\mu\text{g/mL}$ aralığında sitotoksik etki saptamıştır (Lu ve ark., 2009). Yamogeninin antikanser kapasitesini araştıran başka bir çalışmada HeLa

(serviks) ve SKOV-3 (ovaryum) kanseri hücrelerinde yaklaşık 10–16 $\mu\text{g/mL}$ aralığında IC_{50} değerleriyle belirgin sitotoksikite rapor edilmiştir (Stefanovic ve ark., 2021). Ayrıca ilerleyen dönemlerde bu bileşiğin SKOV-3 hücrelerinde G_1 fazında hücre döngüsü durdurduğu, kaspaz aktivasyonu sağladığı ve apoptozu indüklediği gözlenmiştir (Stefanovic ve ark., 2022). Ayrıca HCT116 (kolorektal) ve AGS (mide) kanseri hücrelerinde sırasıyla yamogeninin IC_{50} değeri 60 $\mu\text{g/mL}$ ve 18.5 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Bu hücrelerde oksaliptatin ile sinerjistik etkisine bağlı olarak kemoduyarlılaştırıcı olduğu bildirilmiştir (Stefanovic ve ark., 2024). Bizim bulgularımız da yamogeninin KRK hücrelerinde 30 $\mu\text{g/mL}$ 'de IC_{50} değeri belirlenmiş, bu dozda güçlü antiproliferatif etki gösterdiği ve hücre migrasyonunu 3. saatte belirgin şekilde engellediği saptanmıştır. Bununla birlikte hem MTT sonuçlarında hem de migrasyon analizinde çözücü kontrol olarak kullanılan etanolün hücreleri apoptoza götürdüğü saptanmış. Çözücü kontrol grubunda migrasyon deneyinin 3. saatinde hücreler apoptoza sürecine girmiş 6. saatten itibaren normal morfolojilerine dönmüştür. Yamogenin grubunda ise hücre ölümü devam etmiştir. Bu durum anastazis ile açıklanabilmektedir. Anastazis, hücrelerin ölmek üzereyken tekrar hayata dönebildiği, doğal bir hücresel iyileşme süreci olarak tanımlanmaktadır. Apoptozun indüklenmesi için farklı hücre hatları için farklı dozlarda etanol uygulaması gerekmektedir. Örneğin HeLa hücrelerinde %3.9 etanol uygulaması apoptozu indüklerken Caco-2 hücrelerinde %5'in üzerinde etanol uygulaması apoptozun indüklenmesine neden olmuştur (Tang ve ark., 2018; Asai ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda ise %3 etanol ile hücreler apoptoz sürecine girmiştir. Üstelik etanol ortamdan uzaklaştırılmamasına rağmen durum tersine çevrilmiştir. Bu etanolün uçması ile açıklanmıştır. Yamogenin'in IC_{50} değerinin HCT116 hücre hattı üzerinde daha önce bildirilen değerlerden (60 $\mu\text{g/mL}$) düşük bulunması, bu bileşiğin Caco-2 hücrelerine karşı daha güçlü bir sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Stefanowicz-Hajduk ve ark., 2024). Ancak, bu etkinin OTOP1 proteini aracılığıyla gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır. Laktik asitle kombinasyonu durumunda OTOP1 proteini üzerinde meydana gelişen değişikliğin daha iyi anlaşılabilmesi için Western blot, immünohistokimya gibi ileri analizlere ihtiyaç bulunmaktadır.

Laktik asit, zayıf organik asit yapısı sayesinde hücre zarını geçebilir ve hücre içi pH düşüşüne neden olabilmektedir (Sladkov ve Koleskinov, 2024). Bu durum hem Warburg

etkisinin bir sonucu olarak tümör hücrelerinin kendi metabolizmasıyla oluşturduğu asidik ortamı taklit etmektedir (Wang ve ark., 2020). Warburg etkisi, tümör hücrelerinin oksijen varlığında bile glikolizi tercih etmesi sonucu meydana gelen bir metabolik değişim olup LDH enziminin etkisiyle yüksek düzeyde laktik asit birikimine yol açmaktadır. Bu da hücre dışı pH'nın düşmesine ve asidik mikroçevre oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Wang ve ark., 2019). Üstelik laktik asit tat reseptör hücrelerinde ekşi tadı algılayan proton kanalı OTOPI'yi aktive eden doğal bir uyarıcı görevi görmektedir. Hücre zarını doğrudan geçse bile OTOPI varlığı olmadan laktik asitin ekşi tadı algılanamamaktadır (Sladkov ve Koleskinov, 2024). Günümüzde, laktik asidozun kendisi kanser tedavilerinde doğrudan hedeflenen bir mekanizma haline gelmiştir. "Laktozis", *in vitro* koşullarda ekstrasellüler laktat konsantrasyonunun 15 mM'nin üzerine çıkması durumunu tanımlar. "Asidoz", ekstrasellüler pH'nın 5.8–6.7 aralığında olması durumunu ifade etmektedir. "Laktik asidoz" ise hem laktozis (yüksek laktat) hem de asidoz (düşük pH) durumlarının birlikte görülmesini tanımlamaktadır (Daverio ve ark., 2023). Tümör mikroçevresinde laktik asit konsantrasyonları 10–30 mM gibi oldukça yüksek değerlere ulaşabilmektedir. Buna karşılık, normal fizyolojik koşullarda laktik asit düzeyi genellikle 1.5–3.0 mM aralığındadır. Bu yüksek laktik asit birikimi sonucunda, tümör çevresindeki pH değeri 6.0–6.5 seviyelerine kadar düşebilmektedir. Çalışmamızda oluşturduğumuz ortam laktik asidozis taklit edilerek OTOPI'in laktik asidozisin önlenmesinde önemli bir proton kanalı olabileceği ön görülmüştür. Laktik asit aynı zamanda fermente gıdalarda da yüksek oranda bulunmaktadır (Frank ve ark, 2022; Wang ve ark., 2020). Bu bağlamda, laktik asidin hem tat algısı hem de TME'sinde ortak bir moleküler uyarıcı olarak görev almaktadır. Asidik TME, normalde toksik olabilecek koşullarda bile kanser hücrelerinin proliferasyon ve invazyon yeteneklerini artırabilen adaptif mekanizmaların gelişmesine zemin hazırlamaktadır (Li ve ark., 2023). Bu adaptasyonlardan biri, proton taşınımını düzenleyen OTOPI gibi iyon kanallarının yeniden programlanmasıdır. Bu çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonunda düşük doz laktik asitle beraber gözlemlenen proliferasyon artışı da bu adaptasyonun sonucunda gerçekleşmektedir. Bununla beraber asidik koşullar uzadığında veya yamogenin uygulaması ile bu süreci tersine çevirerek hücre canlılığını ve migrasyon yeteneğini baskılamıştır. Daha önce acı tat reseptörü olan TRPV-1'in asidik

koşullar (pH 6.4) altında IL-8 üretiminin artmasına ve hücre proliferasyonunun indüklenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Nakanishi ve ark., 2016).

OTOP1'i aktive/inhibe eden ligandlar, günümüze kadar karvakrol, Zn^{2+} iyonları, HMFOP ve protonların kendisi olarak araştırılmıştır (Saotome ve ark., 2019; Hu ve ark., 2024). Ayrıca tez yazım sürecinde yayımlanan trisiklik antidepresanların kimyasal yapısına benzerlik gösteren C.2.2 kimyasalı da yüksek potansiyeli olan bir bileşik olarak çalışılmıştır (Burendei ve ark., 2025). Ancak yamogenin gibi büyük, hidrofobik ve biyolojik olarak aktif bir bileşiğin OTOP1 ile etkileşimi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle yamogenin, OTOP1 için alternatif bir bitkisel bileşik adaydır. Üstelik güncel çalışmada belirtildiği gibi yamogeninin de yüksek lipofilik özellikleri bulunmaktadır. Yamogeninin OTOP1 ile etkileşimini araştırarak ileri çalışmalar OTOP1'in mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Özellikle yamogenin'in OTOP1'in merkez ve dış bölgeye bağlanması, bu bölgelerin proton iletimi sırasında yapısal modülasyonun merkezi olabileceği çalışmasını desteklemektedir. Son olarak C domain küçük bileşikler için daha uygun bir bölgeyken yamogenin yapısı ve moleküler ağırlığı oldukça fazladır.

Tez çalışmasında KRK hücrelerinin seçilmesinin temel nedeni, araştırmanın odak noktası olan OTOP1 proteininin ekşi tat reseptörü olarak bilinen proton kanalı olması ve bu proteinin asidik ortamlara duyarlı bir yapıya sahip bulunmasıdır. Laktik asit, zayıf ve organik bir asit olarak ekşi tat algısının en belirgin şekilde hissedildiği bileşiklerden biridir. Bu nedenle, OTOP1'in laktik asit varlığında gösterdiği yanıtın incelenmesi, proteinin fonksiyonel özelliklerini anlamak açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, laktik asit fermente gıdalarda doğal olarak bulunan bir bileşiktir ve bu durum, ekşi tat algısının evrimsel süreçte çevresel adaptasyonla şekillenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bağırsak mikrobiyotası da benzer şekilde laktik asit bakterileri bakımından zengindir ve bu bakteriler, fizyolojik koşullarda laktik asidi KZYA'ya dönüştürmektedir. Ancak Warburg etkisi sonucu, sağlıklı kolonositler enerji kaynağı olarak bütiratı kullanmaktan glikoza yönelir ve bunun sonucunda artan laktik asit üretimiyle asidik bir mikroçevre oluşmaktadır. Bu çalışma, ekşi tat reseptörleri ve OTOP1 kanallarının KRK, hatta tüm kanserler, bağlamında ilk kez incelendiği ve OTOP1'in KRK hücrelerinde eksprese

edildiğini gösteren ilk çalışmadır. OTOPI'in hem tat hücrelerinde hem de gastrointestinal sistemde eksprese edilmesi (Hu ve ark., 2024), bu proteinin yalnızca gustatuvar bir işlevi olmadığını, aynı zamanda bağırsak epitelinde pH algılama ve iyon homeostazında da görev aldığını göstermektedir. Bu durum, fermente gıdalarda bulunan organik asitlerin ve mikrobiyal metabolitlerin OTOPI'yi aktive etmesiyle bağırsak epitelyumunda hücrel sinyalleşmenin etkilenebileceğine dair ön bulgular sağlamaktadır.

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. İlk olarak, moleküler doking analizleri ligandın proteine anlık bağlanma durumunu göstermekte olup bağlanmanın gerçekten stabil olup olmadığını doğrulamak için moleküler dinamik simülasyonlarının yapılması planlanmaktadır. Ayrıca, yamogeninin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin sağlıklı hücrelerde de gözlenip gözlenmediğinin belirlenmesi amacıyla, sağlıklı kolon enterosit hücre hattında etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra, farklı kolon kanseri hücre hatlarında yamogeninin antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmektedir. OTOPI proteininin ekspresyonundaki değişimlerin, Western blot (WB), immünohistokimya ve RT-qPCR gibi ileri düzey tekniklerle doğrulanması planlanmakta olup, bu analizler hem KRK hem de sağlıklı hücre hatlarında gerçekleştirilecektir. Ayrıca, laktik asidin hücrel stimülasyon üzerindeki etkisinin farklı inkübasyon sürelerinde değerlendirilmesi planlanmaktadır.

Moleküler doking sonuçlarında OTOPI2 ve OTOPI3 proteinleri için elde edilen anlamlı bağlanma afinitelerinin deneysel olarak doğrulanması da planlanmaktadır; bu kapsamda OTOPI2 ve OTOPI3 ELISA analizlerinin yapılması hedeflenmiştir. Çalışmadan elde edilen verilerin ilerleyen dönemlerde *in vivo* modellerde doğrulanması gerekmektedir. Son olarak, OTOPI proteiniyle ilgili mevcut biyoinformatik veri sayısının sınırlı olması, bu konuda yapılabilecek kapsamlı analizlerin önündeki başlıca kısıtlayıcı faktördür.

Yamogeninin KRK hücreleri üzerinde anlamlı bir anti-proliferatif etki gösterdiği ve hücre migrasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Yapılan ELISA deneyleri sonucunda, yamogenin'in bu etkisinin OTOPI proteini üzerinden gerçekleşmediği, ancak laktik asit stimülasyonu sonrası OTOPI aracılığıyla etkili olduğu hem *in vitro* hem de *in silico* olarak gösterilmiştir. Ayrıca, yamogenin'in OTOPI2 ve OTOPI3 proteinlerinin merkezi cebine

yüksek bağlanma affinitesiyle bağlandığı belirlenmiştir. Elde edilen tüm bu veriler, çalışmada belirlenen tez amaçlarının başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tezde elde edilen bulgular, yamogenin'in asidik TME'de OTOP1 ekspresyonunu modüle ederek KRK hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonun baskılanmasına aracılık ettiğini göstermektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda:

1. Yamogenin, OTOP1 proteini ile *in silico* olarak güçlü etkileşimler kurmaktadır.
2. OTOP1'in asidik mikroçevre koşullarında değişen ekspresyonu, proton taşınımı ve hücre içi pH dengesiyle ilişkili olabilir.
3. Asidik ortam, yamogenin'in sitotoksik etkisini artırarak bileşiğin terapötik potansiyelini güçlendirmektedir.

Öneriler:

- Gelecekte yapılacak çalışmalarda, yamogenin'in farklı kanser hücre hatlarında ve *in vivo* modellerde etkisinin araştırılması önerilmektedir.
- OTOP1 proteinin kanser hücrelerinde ekspresyonu western blot veya immünohistokimya gibi bir yöntemle doğrulanmalıdır.
- OTOP1 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yamogenin'in epigenetik etkilerinin incelenmesi, mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Abushukair HM, Azhar Saeed IHS, Anwaar S, and Jordan. Correlation of Exploration of Immune Profile and Genomic with Microsatellite Stable/ Tumor Mutational Burden-Low Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2025;42: 213.
- Asai K, Buurman WA, Reutelingsperger CPM, Schutte B, Kaminishi M. Low concentrations of ethanol induce apoptosis in human intestinal cells. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38(11); 1154–1161.
- Eşiyok A, Seven Ö, Eymur G, Tatar GB, Erden DD, Yelekçi K, Yurter H, and Demir AS. Aryl Butenoic Acid Derivatives as a New Class of Histone Deacetylase Inhibitors: Synthesis, in Vitro Evaluation, and Molecular Doking Studies. *Turk J Chem*. 2014;38: 338–44.
- Berry M, Burtram F, and Junaid G. Practical Considerations in Virtual Screening and Molecular Doking. *Emerg Trends Comput Biol Bioinf Syst Biol*. 2015;14; 487–502
- Bian Y, Ye G, Chaojing L, Bo T, Lei X, Han L, Yanhui Z, Xun Z, Siwei Z, Kangkang W, Jun Z, Zhaoshen L, Hezhong C, and Luowei W. Genome-Wide Methylation Profiling Identified Methylated KCNA3 and OTOP2 as Promising Diagnostic Markers for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Chin Med J*. 2024;137(14); 1724–35.
- Bignold Leon P. The Cell-Type-Specificity of Inherited Predispositions to Tumours: Review and Hypothesis. *Cancer Lett*. 2004;216(2); 127–46.
- Brenner H, Heisser T, Cardoso R. ve ark. Reduction in colorectal cancer incidence by screening endoscopy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024;21; 125–133.
- Brinck JE, Sinha AK, Laursen MF ve ark. Intestinal pH: a major driver of human gut microbiota composition and metabolism. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2025;22; 639–656.
- Burendei B, Kaplan JP, Orellana GM. Ve ark., Structure-guided discovery of Otopetrin 1 inhibitors reveals druggable binding sites at the intrasubunit interface. *Nat Commun*. 2025;16;9362.
- Chen, P, GHX, Ming L, Jia-Yuan Z, Jie C, Cheng-Fu L, and Li-Tao Y. Yamogenin Exhibits Antidepressant-like Effects via Inhibition of ER Stress and Microglial Activation in LPS-Induced Mice. *ACS Chem Neurosci*. 2023;14(17); 3173–82.

- Chen Q, Weizhong Z, Ji S, Xiao-chen B, and Youxing J. Structural and Functional characterization of an Otopetrin Family Proton Channel. *ELIFE* 2019;8; e46710.
- Choi J, Sungnam K, Hyunsoo A, Donghyo K, Sung WC, Sanguk K, and Jae HL. Genetic Analysis of Non-Syndromic Peg Lateralis Using Whole-Exome Sequencing. *Front Gen.* 2025;16.
- Daverio Z, Balcerzyk A, Rautureau GJP, Panthu B. How Warburg-Associated Lactic Acidosis Rewires Cancer Cell Energy Metabolism to Resist Glucose Deprivation. *Cancers.* 2023;15; 1417.
- Donald JE, Kulp DW, DeGrado WF. Salt bridges: Geometrically specific, designable interactions. *PROTEINS.* 2011;79(3); 898-915.
- Erfanian N, Saeed N, Adib MF, Hossein S, and Mohammad H. Characterization of Wnt Signaling Pathway under Treatment of *Lactobacillus Acidophilus* Postbiotic in Colorectal Cancer Using an Integrated in Silico and in Vitro Analysis. *Sci Rep.* 2023;13(1); 22988.
- Eslami M, Sadrifar S, Karbalaee M, Keikha M, Kobylak NM, Yousefi B. Importance of the Microbiota Inhibitory Mechanism on the Warburg Effect in Colorectal Cancer Cells. *J Gastrointest Cancer.* 2020;51(3); 738-747.
- Frank HER, Katie A, Michelle T, Paula M, Emily RL, Lauren MN, Kurt S, Paul AS, Breslin, and Robert RD. The Evolution of Sour Taste. *Proc R Soc B.* 2022;289; 1968.
- Fung KYC, Cosgrove L, Lockett T, Head R, Topping DL. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br J Nutr.* 2012;108(5); 820-831.
- Gan N, Weizhong Z, Yan H, Qingfeng C, and Youxing J. Structural Mechanism of Proton Conduction in Otopetrin Proton Channel. *Nat Commun.* 2024;15; 1.
- Gan Jh, Liu Jx, Liu Y. et al. DrugRep: an automatic virtual screening server for drug repurposing. *Acta Pharmacol Sin.* 2023;44; 888–896.
- Ganguly A, Avinash C, Heather T, Shan W, Emily RL, and Craig M. Requirement for an Otopetrin-like Protein for Acid Taste in *Drosophila*. *PNAS.* 2021;118; 51.
- Ghosh D, and Prasad T. Fenugreek. Traditional and Modern Medicinal Uses. Boca Raton: CRC Press. 2022; 474.

- Gonzalez-Cárdenas M, and Víctor T. The Impact of Mutational Hotspots on Cancer Survival. *Cancers*. 2024;16(5); 1072.
- Goswami TK. Character of Sour Taste Receptor: When Mammals Hate Intense Sour Taste How Birds Can Snack It on Its Plate; Whether Preference or Tolerance. *AJSMR*. 2025;4(2); 4–7.
- Grada A, Marta OV, Francisco PC, Zaidal O, and Vincent F. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *JID*. 2017;137(2); e11–16.
- Grayu. Erişim Tarihi; 12 Kasım, 2025. <https://caps.ncbs.res.in/GRAYU/phytochemical/cid/441901>.
- Guo S, ve Sun Y. OTOP2, Inversely Modulated by MiR-3148, Inhibits CRC Cell Migration, Proliferation and Epithelial–Mesenchymal Transition: Evidence from Bioinformatics Data Mining and Experimental Verification. *Cancer Manag Res*. 2022;14; 1371–84.
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12.1; 31-46.
- Herráiz I. Chemical Pathways of Corticosteroids, Industrial Synthesis from Saponins. 15–27.
- Hu J, Yalan H, Anna L, Hao Z, Lifeng T, Huajun C, Beiru X, Ren L, ve Lei L. Gating Elements for Carvacrol Activation of the OTOP1 Proton Channel. *Commun Biol*. 2024;7; 1.
- Huang X, and Junjie H. In Silico Discovery of Novel Androgen Receptor Inhibitors for Prostate Cancer Therapy Using Virtual Screening, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulations. *Sci Rep*. 2025;15(1); 29404.
- Huey R, Garrett MM, Arthur JO, and David SG. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-based Desolvation. *J Comput Chem*. 2007;28(6); 1145–52.
- Hughes I, Jonathan B, Belen H, Eric DG, Robert B, Gerry B, Jennifer M, Baishali M, Nancy H, Morgan P, Pamela T, Alice Y, Arend S, and David MO. Identification of the Otopetrin Domain, a Conserved Domain in Vertebrate Otopetrins and Invertebrate Otopetrin-like Family Members. *BMC Evol Biol*. 2008;8; 1.
- Hughes I, Mitsuyoshi S, Paul HS, and David MO. Otopetrin 1 Activation by Purinergic Nucleotides Regulates Intracellular Calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(29); 12023-8.

- Hurle B, Elena I, Silvia MM, Tomoji M, Xavier R, Isolde T, Ruediger T, and David MO. Non-Syndromic Vestibular Disorder with Otoconial Agenesis in Tilted/Mergulhador Mice Caused by Mutations in Otopetrin 1. *Hum Mol Genet.* 2003;12(7); 777–89.
- Hurle B, Tomas MB, Francesca A, Inna H, Joseph FR, Robert B, Gerry B, Jennifer M, Baishali M, Nancy H, Morgan P, Pamela T, Alice Y, Evan EE, David MO, and Eric DG. Lineage-Specific Evolution of the Vertebrate Otopetrin Gene Family Revealed by Comparative Genomic Analyses. *BMC Evol Biol.* 2011;11(1).
- Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, ve Diaconu, C. Colorectal cancer: from risk factors to oncogenesis. *Medicina.* 2023; 59(9); 1646.
- Islam M, Omi S, Saori YN, Yuko OO, and Soichiro Y. Cibacron Blue 3G-A Is a Novel Inhibitor of Otopetrin 1 (OTOP1), a Proton Channel. *BBRC.* 2023;665; 64–70.
- Islam MM, Sasaki O, Yano-Nashimoto S, Okamatsu-Ogura Y, ve Yamaguchi S. Functional expression of the proton channel OTOP1 in brown adipocytes. *BBRC.* 2025;152835.
- Kaplan JP, Wenlei Y, Heather K, Ziyu L, Anne T, Jingyi C, Chingwen Y, Paul C, and Emily RL. “Epitope Tagging with Genome Editing in Mice Reveals That the Proton Channel OTOP1 Is Apically Localized and Not Restricted to Type III ‘Sour’ Taste Receptor Cells. *J Neurosci.* 2025;45(6); e1560242024.
- Kim E, Krzysztof LH, Judith S, Yunxia WL, Felipe TS, Bechara K, Mark PG, Mark EW, and David MO. Regulation of Cellular Calcium in Vestibular Supporting Cells by Otopetrin 1. *J Neurophysiol.* 2010;104(6); 3439–50.
- Kong X, Jie S, Hanhan Z, Yuan Y, Xinyao L, Yan C, Guoqing L, Huixin X, Youjun W, Zhonghua L, and Cheng T. Preferential Allosteric Modulation of Otop1 Channels by Small Molecule Compounds. *Commun Biol.* 2025;8; 1.
- Kumar P, Arvindhan N, and Pradeep DU. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;6; 469–71.
- Lab of System Pharmacology, China. Erişim tarihi: 1 Kasım 2025
- Lee JH, Junglim C, Sungnam K, Hyunsoo A, Donghyo K, Sung-Won C, and Sanguk K. OTOP1: A New Candidate Gene for Non-Syndromic Peg Lateralis. 2024.

- Li B, Yan W, Alexis C, Courtney N, Zhifei W, Haroon C, Zainab A, Gabriella A, Ulloa YY. The Roles of Two Extracellular Loops in Proton Sensing and Permeation in Human Otop1 Proton Channel. *Commun Biol.* 2022;5; 1.
- Li D, Qinlu L, Feijun L, and Hanqing W. Insights into the Structure, Metabolism, Biological Functions and Molecular Mechanisms of Sialic Acid: A Review. *Foods.* 2024;13; 1.
- Li S, Umar AS, Yili C, and Lijun K. Nematode Homologs of the Sour Taste Receptor Otopettrin1 Are Evolutionarily Conserved Acid-Sensitive Proton Channels. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11.
- Li Z, and Jiuwei C. Targeting the Lactic Acid Metabolic Pathway for Antitumor Therapy. *Mol Ther Oncolytics.* 2023;31; 100740
- Liang Z, Courtney E. W, Bochuan T, Sue C. K, and Emily RL. The Proton Channel OTOP1 Is a Sensor for the Taste of Ammonium Chloride. *Nat Commun.* 2023;14; 1.
- Liu W, Mark G, Susanna H, Jessada T, Xiang J, Jan B, Ann-Sofie B, Kristina LR, and Annika L. Linkage and Association Analysis Define Novel Regions for the Risk of Adenomas and Colorectal Cancer. *Med Res Arc.* 2022;10; 4.
- Lu C, Shuai C, Shasha L, Huimin L, Lin S, and Yan S. Determination of the Immunomodulatory Role of OTOP2 in Colon Adenocarcinoma. *J Cancer.* 2024;15(15); 4838–52.
- Lu Y, Jianguang L, Xuefeng H, and Lingyi K. Four New Steroidal Glycosides from *Solanum Torvum* and Their Cytotoxic Activities. *Steroids.* 2009;74(1); 95–101.
- Malonga T, Vialaneix N, Beaumont M. BEST4⁺ cells in the intestinal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2024;1;326(5); 1345-1352.
- Michl J, White B, Monterisi S, Bodmer WF, ve Swietach, P Phenotypic screen of sixty-eight colorectal cancer cell lines identifies CEACAM6 and CEACAM5 as markers of acid resistance. *PNAS.* 2024;121; 13.
- Moriwaki, S, Hiroki M, Nobuyuki T, Taku U, Keiko T, Shohei H, Nobuaki T, Toshihiko N, Tsuyoshi G, and Teruo K. Yamogenin in Fenugreek Inhibits Lipid Accumulation through the Suppression of Gene Expression in Fatty Acid Synthesis in Hepatocytes. *BBBIEJ.* 2014;78(7); 1231–36.

- Nakanishi M, Morita Y, Hata K, Muragaki Y. Acidic microenvironments induce lymphangiogenesis and IL-8 production via TRPV1 activation in human lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2016;15;345(2); 180-9.
- Oseguera, M., ve Yau, A. A. Lactic acidosis in a patient with cancer. *Clin Med*. 2023;23(6); 615-617.
- Palaniappan A, Sangeetha M, and Arjun S. COADREADx: A Comprehensive Algorithmic Dissection Unravels Salient Biomarkers and Actionable Insights into the Discrete Progression of Colorectal Cancer. 2022.
- Papier K, Bradbury KE, Balkwill A. ve ark. Diet-wide analyses for risk of colorectal cancer: prospective study of 12,251 incident cases among 542,778 women in the UK. *Nat Commun*. 2025;16; 375.
- Parikh K, Antanaviciute A, Fawcner-Corbett D, Jagielowicz M, Aulicino A, Lagerholm C, Davis S, Kinchen J, Chen HH, Alham NK, Ashley N, Johnson E, Hublitz P, Bao L, Lukomska J, Andev RS, Björklund E, Kessler BM, Fischer R, Goldin R, Koohy H, Simmons A. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*. 2019;567(7746); 49-55.
- Park B, Kim JY, Riffey OF. Ve ark. Pyruvate kinase M1 regulates butyrate metabolism in cancerous colonocytes. *Sci Rep*. 2022;12.
- PDB2PQR ** Use PDB2PQR Web Service Directly Instead of This Tool .
- Plumb JA. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. 2004.
- Qu H, Yi S, Lianzhi Y, Hongchao Z, and Chunxia X. Wild-Type P53 Regulates OTOP2 Transcription through DNA Loop Alteration of the Promoter in Colorectal Cancer. *FEBS Open Bio* 2019;9(1); 26–34.
- Ramsey IS, and John AD. Otopetrin-1: A Sour-Tasting Proton Channel. *JGP*. 2018;150(3); 379–82.
- Sağsöz ME, Berk S, Kaan A, Turgut B, Murat Ç, and Nuhan P. Structural, Functional and Molecular Dynamics Examination of a de Novo Cloned Otopetrin-like Proton Channel in Crayfish. *Cell Biochem Biophys*. 2024;82(3); 2029–36.
- Sallinger K, Gruber M, Müller CT, Bonstingl L, Pritz E, Pankratz K, Gerger A, Smolle MA, Aigelsreiter A, Surova O, Svedlund J, Nilsson M, Kroneis T, El-Heliebi A. Spatial tumour gene signature

- discriminates neoplastic from non-neoplastic compartments in colon cancer: unravelling predictive biomarkers for relapse. *J Transl Med.* 2023;5;21(1); 528.
- Saotome K, Bochuan T, Che CT, Wen HL, Yu HT, Joshua PK, Mark SP, Emily RL, and Andrew BW. Structures of the Otopetrin Proton Channels Otop1 and Otop3. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(6); 518–25.
- Sasaki O, Saori YN, and Soichiro Y. A Proton Channel, Otopetrin 1 (OTOP1) Is N-glycosylated at Two Asparagine Residues in Third Extracellular Loop. *J Cell Physiol.* 2024: 239; 9.
- Sedlak JC, Yilmaz ÖH, ve Roper, J. Metabolism and colorectal cancer. *Annu Rev of Pathol.* 2023;18(1); 467-492.
- Shah K ve Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med.f* 2016;77(7); 98-101.
- Shehu A, and Lydia EK. Modeling Structures and Motions of Loops in Protein Molecules. *Entropy.* 2012;14(2); 252–90.
- Skuladottir A, Gyda B, Muhammad SN, Hannes PSR, Kristjan HSM, Pall O, Sigurður HM, Anna B, Olafur AS, Gudrun RS, Saedis S, Erna I, Lilja S, Bjarni G, Joseph BM, Kirk UK, David AJ, Lincoln DN, Annette MH, Dan RMS, G BW, Thorgeir ET, Ingileif J, Hilma H, Gudmar T, Daniel FG, Patrick S, Hreinn S, and Kari S. A Genome-Wide Meta-Analysis Uncovers Six Sequence Variants Conferring Risk of Vertigo. *Commun Biol.* 2021;4; 1.
- Sladkov KD, and Kolesnikov SS. Structure and Functions of the OTOP1 Proton Channel. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2024;18(3); 175–87.
- Sousa SF, Pedro AF, and JR. Protein–Ligand Doking: Current Status and Future Challenges. *Proteins.* 2006;65(1); 15–26.
- Stefanowicz-Hajduk J, Piotr G, Anna H, Magdalena G, Anna N, and Rafał H. An In Vitro Study on the Cytotoxic, Antioxidant, and Antimicrobial Properties of Yamogenin—A Plant Steroidal Saponin and Evaluation of Its Mechanism of Action in Gastric Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2024;25; 9.
- Stefanowicz-Hajduk J, Anna H, Magdalena G, Monika C, and Renata O. Yamogenin-Induced Cell Cycle Arrest, Oxidative Stress, and Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cell Line. *Molecules.* 2022;27; 23.

- Stefanowicz-Hajduk J, Barbara KK, Barbara SS, Katarzyna K, Renata O, and Mirosława KB. Cytotoxic Activity of Standardized Extracts, a Fraction, and Individual Secondary Metabolites from Fenugreek Seeds against SKOV-3, HeLa and MOLT-4 Cell Lines. *Pharm Biol.* 2021;59; 422–35.
- Sun Z, Xuefeng H, and Lingyi K. A New Steroidal Saponin from the Dried Stems of *Asparagus Officinalis* L. *Fitoterapia.* 2010;81(3); 210–13.
- Svec J, Onhajzer J, Korinek V. Origin, development and therapy of colorectal cancer from the perspective of a biologist and an oncologist. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2024;204; 104544.
- <https://www.swissadme.ch/index.php> Erişim tarihi: 1 Kasım 2025
- Tanchuk VY, Volodymyr OT, Andriy IV, and Gennady PA. New, Improved Hybrid Scoring Function for Molecular Docking and Scoring Based on AutoDock and AutoDock Vina. *Chem Biol Drug Des.* 2016;87(4); 618–25.
- Tang HM, Tang HL. Anastasis: recovery from the brink of cell death. *R Soc Open Sci.* 2018;5(8); 180442.
- Taruno A, Kengo N, Tsukasa K, Zhongming M, Osamu N, and Kevin F. Taste Transduction and Channel Synapses in Taste Buds. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2021;473; 1; 3–13.
- Teng B, Courtney EW, Yu HT, Narendra RJ, Sue CK, and Emily RL. Cellular and Neural Responses to Sour Stimuli Require the Proton Channel Otop1. *Curr Biol.* 2019;29; 3647-3656.
- Tian L, Shilong HZ, Luo YA, Kamau PM, LL Jingmei, and R L. Vertebrate OTOPI Is Also an Alkali-Activated Channel. *Nat Commun.* 2023;14(1).
- Tu YH, Alexander JC, Bochuan T, Rui BC, Daniel JA, Heather NT, Eric MM, Wenlei Y, Andrew DS, and Emily RL. An Evolutionarily Conserved Gene Family Encodes Proton-Selective Ion Channels. *Science.* 2018;359; 1047–50.
- Tu, YH, Naili L, Cuiying X, Oksana G, and Marc LR. Loss of Otopetrin 1 Affects Thermoregulation during Fasting in Mice. *PLoS ONE.* 2023; 18.
- Tu YH, Alexander JC, Bochuan T, Rui BC, Daniel JA, Heather NT, Eric MM, Wenlei Y, Andrew D. Smith, and Emily RL. An Evolutionarily Conserved Gene Family Encodes Proton-Selective Ion Channels. *Science.* 2018;359(6379); 1047–50.

- Turner HN, and Emily RL. The Cellular and Molecular Basis of Sour Taste. *Annu Rev Physiol.* 2022;84; 41–58.
- Wallis S. The Molecular Basis of Endocrinology. *Surg Endocrinol.* 1993; 5-17.
- Wang F, Lu L, Ma Y, Wenjie W, Iftikhar HB, Yongping B, Kai Z, Yanlin L, Saba S, Dangdang L, Yongchao D, Thomas E, Zheyong X, and Xin H. Advances in Antitumor Activity and Mechanism of Natural Steroidal Saponins: A Review of Advances, Challenges, and Future Prospects. *Phytomedicine.* 2024;128; 155432.
- Wang GX, Kae WC, Maeran U, Chun RH, Siming L, Zoharit C, Acer E, X JXC, Alan R, Saltiel CNL and Lin JD. Otopetrin 1 Protects Mice from Obesity-Associated Metabolic Dysfunction through Attenuating Adipose Tissue Inflammation. *Diabetes.* 2014;63(4); 1340–52.
- Wang SP, Rubio LA, Duncan SH, Donachie GE, Holtrop G, Lo G, Farquharson FM, Wagner J, Parkhill J, Louis P, Walker AW, Flint HJ. Pivotal Roles for pH, Lactate, and Lactate-Utilizing Bacteria in the Stability of a Human Colonic Microbial Ecosystem. *mSystems.* 2020;85(5); e00645-20. ve
- Yang H, Lin W, Jin D, Gan, and Liu H. Association of a Novel Seven-Gene Expression Signature with the disease Prognosis in Colon Cancer Patients. *Aging.* 2019;15; 8710-8727.
- Yang L, Yang J, Kleppe A. ve ark. Personalizing adjuvant therapy for patients with colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2024;21: 67–79.
- Yen CT, Chia-Lin L, Fang-Rong C, Tsong-Long H, Hsin-Fu Y, Chao-Jung C, Shu-Li C, and Yang-Chang W. Indiosides G–K: Steroidal Glycosides with Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities from *Solanum Violaceum*. *J Nat Prod.* 2012;75; 636–43.
- Zhou, Hai-cun, ve ark. Lactic acid in macrophage polarization: the significant role in inflammation and cancer. *Int rev Immunol.* 2022;41.1; 4-18.
- Zhou ZH, Wang QL, Mao LH, Li XQ, Liu P, Song JW, Liu X, Xu F, Lei J, He S. Chromatin accessibility changes are associated with enhanced growth and liver metastasis capacity of acid-adapted colorectal cancer cells. *Cell Cycle.* 2019;18(4); 511-522.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Altınay	Uyruğu	TC
Soyadı	ALTINKAYNAK	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Renk Temel Lisesi	2018
Lisans	Akdeniz Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi-Beslenme ve Diyetetik Bölümü	2023
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	81,25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Daidzein'in tek başına ve 5-Florourasil ile kombine olarak kolon kanseri hücre hattı Caco-2'den salınan Substance P (SP) miktarı üzerine olası sinerjistik etkisinin in vitro ve in silico araştırılması	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)	6 ay

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK 2210A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı

TÜBİTAK-2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı

Yayınlar ve Bildiriler:

Aydemir, İ., Tutkun, G., Akcıt, E.T. ve ark., Combined effects of escitalopram and vitamin E on phoenixin-20 secretion and neuroregulatory mechanisms in glioblastoma cells: a neuro-nutritional perspective. J Neurooncol 175, 789–799 (2025). <https://doi.org/10.1007/s11060-025-05176-w>

Altinkaynak A, Kocak O, Tanyel Akcıt E, Simsek E, Yildirim K, Coban AY. The In Vitro and In Silico Assessment of the Cytotoxic Effect of Daidzein Alone or in Combination with 5-Fluorouracil on Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line Caco-2. J Med Food. 2025 Jul;28(7):647-656. doi: 10.1089/jmf.2024.0132. Vol. 28, No. 7, 2025 Apr 26.

Altinkaynak, A., Şimşek, E., (2024). Kolon Kanseri Hastalarında Beslenme Yönetimi. Beslenme ve Diyetetikte İleri Araştırmalar. Afyonkarahisar. 2024. ss: 83-102

Simsek, E., Yildirim, K., Tanyel Akcıt, E., Atas, C., Kocak, O., Altinkaynak, A., Salehi Moharer M. P., Yazıcı, E., Sisaneci, A., Kalay, M., Tanrioer, G., Uzun, M., Yilmaz Coban, A. (2024). The In vitro evaluation of in silico-designed synthetic peptides

AKVUAM-1 and AKVUAM-2 on human lung fibroblast cell line MRC5 and Mycobacterium tuberculosis isolates. MicrobialPathogenesis. 197. 107027

Altınkaynak, A., Baran, B., Koçak, O., Akçit, E. T., Şimşek. (2023). Daidzein ve Kolorektal Kanser. Sağlık Bilimlerinde Güncel Tartışmalar. Ankara. 2023. ss: 404-417

