T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Segün DOĞRU YAŞAR

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

KÜÇÜK İLETKENLİKLİ MEKANOSENSİTİF İYON KANALI (MscS)'NIN ANTİBAKTERİYEL İLAÇ HEDEFİ OLARAK YAPISAL DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Segün DOĞRU YAŞAR

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Segün DOĞRU YAŞAR

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

KÜÇÜK İLETKENLİKLİ MEKANOSENSİTİF İYON KANALI (MscS)'NIN ANTİBAKTERİYEL İLAÇ HEDEFİ OLARAK YAPISAL DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Segün DOĞRU YAŞAR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-5602 proje numarası ile desteklenmiştir.

"Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir"

2023-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Öncelikle bilimsel çalışmalarımızı yapabilme özgürlüğü sunan, bilgiyi akıl ve mantık ile kullanabilmenin önemini vurgulayan ulu önder Mustafa Kemal Atatürk'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Akademik hayatımın en önemli dönemi olan doktora dönemimde, yurtiçi ve yurtdışında tüm doktora tez çalışmalarımın yürütülmesi için almaya hak kazandığım TÜBİTAK 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı'nın sağlamış olduğu maddi destek ve katkılarından dolayı TÜBİTAK'a,

Akademik hayatımın başlangıç evresi olan doktora tez projesi kapsamında danışmanlığımı üstlenen, konu seçiminden araştırmanın yürütülmesine kadar fikirlerime saygı duyan ve her daim desteklerini esirgemeyen danışmanım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA'ya,

Doktora tez projesi kapsamındaki çalışmalarımın yürütülmesinde deneyimlerini paylaşan ve her daim katkılarını sunmaktan çekinmeyen, tüm emeği ve katkısı için Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nazmi YARAŞ'a,

Doktora tez projesi kapsamında tek partikül Kriyo Elektron Mikroskobu (KriyoEM) deneylerini yürütmek üzere The Rockefeller Üniversitesi'nde bulunduğum süreçte mentorluğumu üstlenen, bilimsel değerler açısından verimli ve çok yönlü bir eğitim süreci geçirmemi sağlayan, laboratuvarında eğitimime başladığım günden bugüne çok önemli bir yol kat etmemi sağlayan Prof. Dr. Thomas Walz'a,

Doktora tez projesi kapsamında tez deneylerimi tamamlamak üzere desteklerini esirgemeyen ve pandemi dönemine rağmen doktora tez çalışmama sağladığı önemli katkılarından dolayı Prof. Dr. Paul Blount ve ekibine,

Her daim bana destek olan ve sahip olduğum tüm öz değerleri bana öğreten, başarılarımın görünmez kahramanları olan annem, babam ve abime destek ve fedakarlıkları için,

Ve son olarak çok kıymetli eşim, aynı zamanda meslektaşım Dr. Ekrem YAŞAR'a bana inandığı, tüm yoğun zamanlarımda desteklerini esirgemediği ve bu yolda benimle yürüyeceğine dair verdiği sözü tüm samimiyetiyle devam ettirdiği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterilerindeki küçük iletkenlikli mekanosensitif (MS) iyon kanalı (EcMscS), çözünen maddeleri serbest bırakmak ve artan sitoplazmik basıncı azaltmak için porlarını açarak lipid çift tabakada artan gerilime yanıt veren heptamerik integral membran proteinidir. Bu nedenle MS iyon kanallarının antibakteriyel ilaç hedefi olarak bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Fakat EcMscS'den geçen solütlerin hücreye erişim mekanizması henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Doktora tez projesinde amacımız, antibakteriyel ilaç hedefi olarak EcMscS'nin yapısal değişimlerini belirlemek ve kanal geçiş mekanizmalarının biyokimyasal, yapısal biyoloji ve in-silico teknikler kullanılarak multidisipliner bir yaklaşımla açıklamaktır.

Yöntem: MscS iyon kanalı bulunan ve bulunmayan *E. coli* suşlarında viyomisinin hücre canlılığına etkileri konsantrasyon bağımlı olarak karşılaştırıldı. Nanodisk rekonstitüsyonu ile elde edilen McsS:MSP1E3D1:(16:1), Kriyo Elektron Mikroskobu (KriyoEM) tekniği ile çözdürüldü. MD simülasyon teknikleri ile viyomisinin EcMscS'den hücre içine geçişi modellendi ve elde edilen MD simülasyon bulguları KriyoEM sonuçları ile kıyaslandı.

Bulgular: MscS içeren hücrelerde konsantrasyona bağlı olarak viyomisinin hücre canlılığını azalttığı belirlendi. KriyoEM tekniği ile EcMscS:MSP1E3D1:(16:1) (1:10:500)'nin 3.4 Å çözünürlükte kapalı konformasyona sahip yapısı elde edildi. Aynı lipid türü (DYPC 16:1) kullanılarak 100 ns MD simülasyon boyunca kanalın kapalı formunu koruyabildiği gözlemlendi. Viyomisinin EcMscS'ye bağlanma bölgeleri tespit edildi.

Sonuç: Viyomisinin MscS içeren *E.coli* suşunda hücre canlılığını etkilediği ve kanaldan geçebilecek bir potansiyele sahip olabileceği gözlemlendi. KriyoEM ve MD deneyleri sonucunda EcMscS'nin kapalı konformasyonunda PC:16 lipid türünün etkili olabileceği düşünüldü. MscS'nin üç boyutlu konformasyonel yapısı ve bu yapıdaki lipid türlerinin işlevleri hakkındaki bilgimiz arttıkça MscS'nin antibakteriyel ilaç hedefi olma potansiyeli de artacaktır.

Anahtar Kelimeler: MscS, Viyomisin, Hücre canlılığı, KriyoEM, MD simülasyon

ABSTRACT

Objective: The small conductance mechanosensitive (MS) ion channel (MscS) in *Escherichia coli* (*E. coli*) (EcMscS) is a heptameric integral membrane protein that responds to increased tension in the lipid bilayer by opening its pores to release solutes and reduce the increased cytoplasmic pressure. Therefore, MS ion channels are thought to have potential as antibacterial drug targets. However, the mechanism of cellular access of solutes passing through EcMscS is not clear yet. The aim of our thesis project is to determine the structural changes of EcMscS as an antibacterial drug target and to explain the gating mechanisms with a multidisciplinary approach using biochemical, structural biology and in-silico techniques.

Method: The effects of viomycin on cell viability in E. coli strains with and without MscS ion channel were compared in a concentration-dependently. EcMscS:MSP1E3D1:(16:1) obtained by nanodisc reconstitution was resolved by Cryo Electron Microscopy (CryoEM) techniques. The transition of viomycin from EcMscS was modeled by MD simulation techniques and the findings were compared with the CryoEM results.

Results: It was determined that viomycin decreased cell viability in MscS-expressed strains in a concentration-dependently. The structure of EcMscS:MSP1E3D1:(16:1) (1:10:500) with a closed conformation at 3.4 Å resolution was obtained by CryoEM methods. It was observed that the channel was able to maintain its closed form throughout the 100 ns MD simulation for the same lipid type (DYPC 16:1). Also, the binding sites of viomycin to EcMscS were identified.

Conclusion: It was observed that viomycin affected cell viability in MscS-containing E.coli strains and may have a potential to pass through the channel. As a result of cryoEM and MD experiments, it was thought that the PC:16 lipid types may be effective in the closed conformation of EcMscS. As our knowledge is deepened about the three-dimensional conformational structure of MscS and the functions of lipid types, the potential of MscS as an antibacterial drug target will increase.

Key words: MscS, Viomycin, Cell viability, CryoEM, MD simulations.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

İÇİNDEKİLER iii

TABLOLAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vi

SİMGELER ve KISALTMALAR vii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Mekanotransdüksiyon 3

2.2. Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Mekanik Kuvvetin Önemi 4

2.3. Mekanosensitif İyon Kanalları 6

2.4. Mekanosensitif İyon Kanallarının Geçiş Mekanizmaları 7

2.4.1. Filamentten Gelen Kuvvet 8

2.4.2. Lipidten Gelen Kuvvet 10

2.5. Membran Lipidlerinin Mekanosensitif İyon Kanalları için Önemi 11

2.6. Mekanosensitif İyon Kanallarının Sınıflandırılması 12

2.6.1. Ökaryotik Mekanosensitif İyon Kanalları 13

2.6.2. Bakteriyel Mekanosensitif İyon Kanalları 19

2.7. EcMscS İyon Kanalına Multidisipliner Yaklaşımlar 26

2.7.1. Tek Partikül Kriyo Elektron Mikroskobu (KriyoEM) Çalışmaları 26

2.7.2. Antibakteriyel İlaç Hedefi Olarak EcMscS 30

2.7.3. Moleküler Dinamik Simülasyon Çalışmaları 32

3. GEREÇ VE YÖNTEM 34

3.1. Hücre Canlılığı Testleri 34

3.1.1 *Escherichia coli* Suşlarının Hazırlanması 34

3.1.2. Antibiyotik Uygulamaları 34

3.2. KriyoEM Yapısal Çalışmaları 35

3.2.1. *Escherichia coli* Hücrelerinin Hazırlanması 35

3.2.2. MscS Protein Ekspresyonu ve Pürifikasyonu 37

3.2.3. MSP1E3D1 Protein Ekspresyonu ve Pürifikasyonu 38
3.2.4. MscS Nanodisk Rekonstitüsyonu 40
3.2.5. Kriyo Elektron Mikroskobu 40
3.3. Hesaplamalı Teknikler 42
3.3.1. Ligand ve İyon Kanalı Yapılarının Hazırlanması 42
3.3.2. Moleküler Kenetleme 43
3.3.3. Moleküler Dinamik Simülasyonlar 43
4. BULGULAR 45
4.1. Hücre Canlılığı Testleri 45
4.2. EcMscS'nin Tek Partikül KriyoEM Değerlendirilmesi 46
4.3. MD Simülasyon Bulguları 53
5. TARTIŞMA 59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 63
KAYNAKLAR 65
ÖZGEÇMİŞ 74

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. EcMscS-Viyomisin ligand protein etkileşimleri 58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Hücrede mekanosensasyon prosesleri	5
Şekil 2.2.	Mekanosensitif iyon kanallarının geçiş mekanizmaları	8
Şekil 2.3	K2P iyon kanallarının sınıflandırılması	14
Şekil 2.4	E. coli'de mekanik duyarlı iyon kanalları MscS ve MscL'nin fonksiyonları	20
Şekil 2.5	*M. tuberculosis* ve *E. coli'*ye ait MscL yapısal modelleri	23
Şekil 2.6	MscS'nin transmembran alanları	25
Şekil 2.7	MscS'nin kapalı ve açık konformasyonel yapıları	28
Şekil 2.8	Nanodiske gömülü EcMscS'nin lipid yapıları ve konformasyonel değişimlerinin incelenmesi	30
Şekil 2.9	MS iyon kanallarının antibakteriyel ilaç hedefi olarak potansiyeli	31
Şekil 3.1	Viyomisin ligandının kimyasal yapısı	42
Şekil 4.1.	MscS içeren (Frag1; $MscS^{+}$) ve içermeyen (MJF 612; ΔMscS) hücrelerinde artan konsantrasyonlarda viyomisin antibiyotiğinin karşılaştırılması	46
Şekil 4.2.	EcMscS için pürifikasyonun değerlendirilmesi	48
Şekil 4.3.	MscS: MSP: PC16 nanodisk sonuçları	50
Şekil 4.4.	MscS'nin tek partikül KriyoEM analizi	53
Şekil 4.5.	EcMscS-Nanodisk kompleks yapısı	54
Şekil 4.6.	EcMscS-Nanodisk kompleks yapısının RMSD değişim grafikleri	55
Şekil 4.7.	EcMscS lipid çift tabaka kompleks yapısı	56
Şekil 4.8.	EcMscS-Viyomisin kompleks yapısı	57

SİMGELER ve KISALTMALAR

MscS : Küçük İletkenlikli Mekanosensitifi İyon Kanalı

KriyoEM : Kriyo Elektron Mikroskobu

E coli : Escherichia coli

EcMscS : Escherichia coli'ye ait Küçük İletkenlikli Mekanosensitif İyon Kanalı

MS : Mekanosensitif

3D : Üç boyutlu

MD : Moleküler Dinamik

MscL : Büyük İletkenlikli Mekanosensitif İyon Kanalı

EcMscL : Escherichia coli'ye ait Büyük İletkenlikli Mekanosensitif İyon Kanalı

TM :Transmembran

S. aureus : Staphylococcus aureus

K2P : İki Domaine Sahip Potasyum

TWIK : Tandem Por Alanı Zayıf İçe Doğru Düzeltici Potasyum Kanalı

TREK : TWIK ile İlgili Potasyum Kanalı

TASK : TWIK ile ilgili Aside Duyarlı Potasyum Kanalı

TALK : TWIK ile İlgili Alkali pH ile Aktive Olan Potasyum Kanalı

THIK : Tandem Por Alanı Halotanın Engellediği Potasyum Kanalı

TRES : TWIK ile İlgili Omurilik Potasyum Kanalı

TRP : Transient Reseptör Potansiyel Kanalı

nS : Nanosiemens

TbMscL : Mikobakterium tüberkülozis'e ait MscL

DDM : β-dodesilmaltozid

β-CD : β-siklodekstrin

IPTG : İzopropil β-d-1-tiogalaktopiranosid

c-di-GMP : Siklik Diguanilat Monofosfat

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat

MscM : Mini İletkenlikli Mekanosensitif İyon Kanalı

G113 : Glisin113

1. GİRİŞ

Mekanosensitif (MS) iyon kanalları, mekanik kuvvetlere karşı yanıt olarak iyonların hücre membranından hücre içine girişine izin veren membran proteinleridir. Hücre membranındaki mekanik etkilere karşı özelleşmiş protein konformasyonlarının en iyi örneğini sunan biyolojik kuvvet algılama sistemleridir (Haswell ve ark., 2011). MS iyon kanallarının mekanik kuvvetlere karşı yanıt oluşturmanın yanı sıra ozmoregülasyon, işitme, dokunma ve propriyosepsiyon gibi birçok önemli rolü bulunmaktadır. MS iyon kanalları mekanik kuvvetlere karşı yanıtlarını milisaniyelik bir zaman ölçeğinde gerçekleştirmektedir. Bu nedenle bakteriyel ve ökaryotik MS iyon kanalları mekanik strese karşı değişebilen farklı duyarlılıklara sahip oldukları bilinmektedir (Murthy ve ark., 2017; Ridone ve ark., 2019). Bakterilerdeki MS iyon kanalları ise hipoozmotik şokta artan turgor basıncını azalttığı ve hücrelerin patlamasını önlediği için hücrelerin canlılıklarını devam ettirmelerinde oldukça hayati önem taşımaktadırlar. Bu nedenle bakteriyel MS iyon kanalları acil durum tahliye valfi olarak hareket etmektedirler.

Bakteriyel MS iyon kanallarının birbirinden farklı protein yapılarının olduğunun anlaşılması ve mekanik strese karşı duyarlılıklarının karşılaştırılabilmesi, tek bir iyon kanalının elektriksel akımının ölçülmesini sağlayan "patch clamp" yönteminin keşfi ile sağlanmıştır. Ayrıca bakteriyel MS iyon kanal çalışmaları, mekanosensör fizyolojisinin anlaşılmasında katkıları bulunmaktadır. Günümüze kadar yapılan MS iyon kanalı çalışmaları hızla artmış olmasına rağmen mekanosensör transdüksiyon sinyalleri altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Booth ve ark., 2012).

Bakterilerdeki MS iyon kanallarının birer antibakteriyel ilaç hedef olduğu ve biyofilm oluşumuna aracılık ettiği düşünülmektedir. MS iyon kanallarının bazı antibiyotiklerin hücre içindeki etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Bakterilerin antibiyotik kaynaklı membran stresine MS iyon kanallarını açarak antibiyotik toleransını destekleyebildiği belirlenmiştir (Carniello ve ark., 2020). Daha önce yapılan çalışmalar, *Escherichia coli* (*E. coli)*'ye ait küçük iletkenlikli mekanosensitif iyon kanalı (EcMscS)'de viyomisinin hücrenin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir.

MscS'nin, hiperozmotik basınç altındaki koşullarda oluşan ozmotik membran stresine karşı hücreyi korumak için ilk tepki veren MS iyon kanalı olduğundan antibakteriyel ilaç hedefi olma potansiyeli oldukça fazla görünmektedir, bu nedenle MscS ile ilgili bu konuda yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (Sidarta ve ark., 2022).

Bakteriyel MS iyon kanalllarından biri olan büyük iletkenlikli mekanosensitif iyon kanalı (MscL) ilk kez 1994 yılında *E. coli* hücrelerinden klonlanmıştır (Sukharev S. I. ve ark., 1994). *E. coli*'ye ait büyük iletkenlikli mekanosensitif iyon kanalı (EcMscL) ve EcMscS'nin klonlanması, üç boyutlu (3D) kristal yapılarının belirlenmesi MS iyon kanallları ile ilgili yapısal çalışmalara katkı sağlamıştır. EcMscS'nin bilinen kristal yapısı X-ışını kristalografi yöntemi ile elde edilmiştir. EcMscS, her bir monomeri (transmembran) (TM)1, TM2 ve TM3 olarak adlandırılan domainlere sahip homoheptamer yapıdan oluşmaktadır (Reddy ve ark., 2019). Moleküler Dinamik (MD) simülasyon çalışmaları, EcMscS iyon kanalının 'lipidler önce hareket eder' ilkesine bağlı olarak kapalı pozisyondaki EcMscS iyon kanalının membranda meydana gelen gerilim ile lipidlerin hidrofobik ceplerden çekildiğini ve böylece TM1-TM2'nin eğilerek kanalın açık pozisyona geçtiğini gösteren moleküler bir model sunmaktadır (Pliotas ve ark., 2015). EcMscS'nin açık ve kapalı konformasyonel yapılarında görev yapan por lipidleri, kapı tutucu lipidler ve cep lipidleri tanımlanmıştır. EcMscS'nin yarı iletken ve duyarsız durumlarında bu lipidlerin farklı fonksiyonları olduğu belirlenmiştir. EcMscS'nin kapalı durumdan diğer durumlara geçişinde farklı lipid türlerinin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. EcMscS iyon kanalının açık ve kapalı pozisyonları hakkında birçok çalışma olmasına rağmen membran geriliminin nasıl düzenlendiği hala tam olarak aydınlatılmamıştır (Zhang Y. ve ark., 2021; Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022).

Doktora tez projesi kapsamında, EcMscS antibakteriyel ilaç hedefi olma potansiyelini araştırmak ve kanal mekanizmasının yapısını/işlevini açıklamak için multidisipliner bir yaklaşım uygulandı. Viyomisin uygulanan EcMscS iyon kanalına bağlı canlılık testleri biyokimyasal yöntemlerle belirlendi. Nanodisk yapısındaki EcMcsS proteinine uygulanan lipid türüne bağlı konformasyonel yapı tek partikül KriyoEM teknikleriyle gösterildi. EcMscS iyon kanalına bağlanabilen ve hücreye erişebilecek antibiyotik viyomisinin geçme potansiyeli MD simülasyon çalışmaları ile değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mekanotransdüksiyon

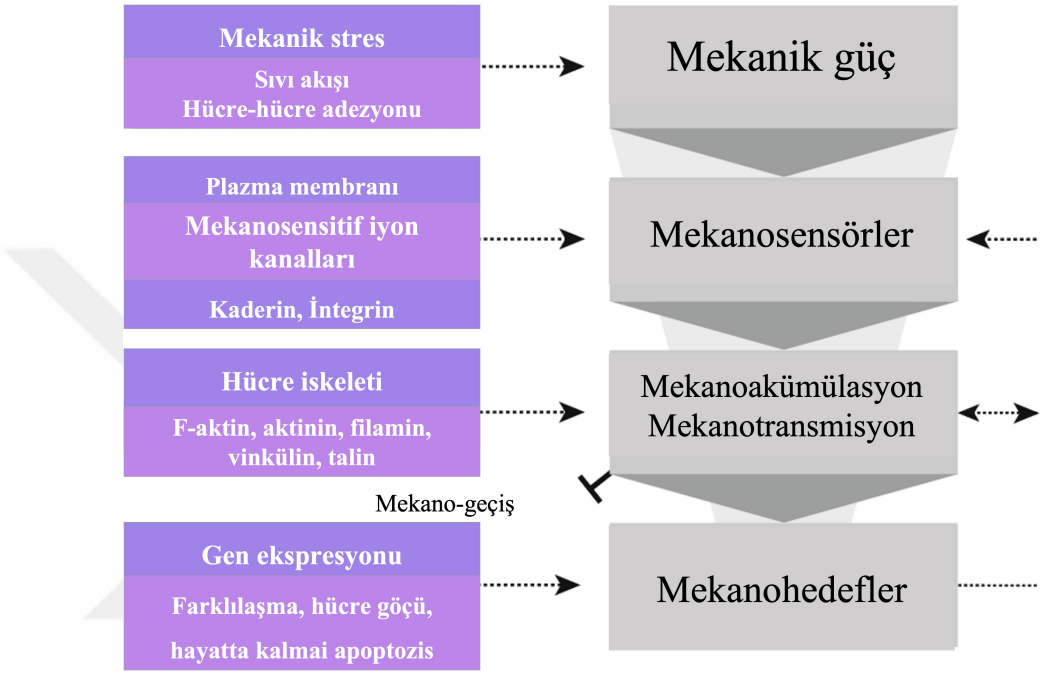
Mekanotransdüksiyon, hücrelerin mekanik uyaranlara karşı oluşan genetik ifadenin düzenlenmesi, hücresel davranışların değişmesi, protein fonksiyonlarının modifikasyonu gibi farklı tepkilerin elektriksel veya biyokimyasal hücre içi sinyallere dönüştürüldüğü biyolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Tüm canlı hücrelerin sitoplazma bütünlüğünü korumak amacıyla membranın hücreyi çepeçevre sarması ve daha gelişmiş canlılardaki ekstraselüler matriksin dışarıdan gelen mekanik etkilere karşı geliştirdiği adaptif kompartımanlar olduğunu göstermektedir (Dunn ve ark., 2016). Bununla birlikte, hücrelerin sıkıştırılma, itme-çekme, kesme gibi basınç oluşturan olaylara karşı oldukça hassas bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Sıvı ortamdaki bakteri ve diğer prokaryotik canlıların hücre içine su girişinin patlayacak kadar olması ve gelişmiş bir omurgalı canlının derisine uygulanan hafif dokunmaya karşı verdiği irkilme tepkisi düşünüldüğünde ilk ataların da mekanik güçlere karşı yanıtın olması oldukça muhtemel görünmektedir. Bu nedenle, ligandlar ve reseptörler arasındaki kilit uyuma aracılık eden özelleşmiş iyon kanalları ile donatılmıştır. Tüm canlıların mekanosensör transdüksiyon süreçlerinde meydana gelen mekanik kuvvetlerden doğrudan etkilenen çok çeşitli moleküllerin olduğu ve hücresel yapılar bulunduğu bilinmektedir. Bakterilerin hücre yüzeyinde adezinler gibi ya da hücre dışı ortama uzanan flagella gibi mekanosensör proteinler de mekanosensitivitelerinin olduğunu göstermektedir. Yakın dönemde keşfedilen MS iyon kanalları, tüm canlı hücreler için mekanosensör fizyolojisini ve biyokimyasal süreçlerini destekleyen birincil sinyal öğeleri olarak evrimleşmiş muhtemelen en eski duyusal transdüksiyon moleküllerini temsil ettiğini göstermektedir (Dufrêne ve ark., 2020). Bununla birlikte, bakteriler doğada tatlı su gibi sıvı ortamlarda yaşadıklarından mekanik koşullara adaptasyonda oldukça zor koşullar altında kalabilmektedirler. Bu nedenle daha çok biyofilm oluşturma eğilimindedirler. Biyofilm, sıvı yüzeyinde olan bakterilerin polimer ve proteinlerin oluşturduğu bir matrikste birbirine bağlı olarak oluşturdukları topluluklar olarak bilinmektedir. Biyofilmlerin dışarıdan gelen mekanik etkilere tepki verebildiği düşünülse de bu konunun tam anlamıyla aydınlatılamadığı bilinmektedir (Persat, 2017).

Bakterilerde ve bitkilerde, mekanotransdüksiyon süreçleri en çok ozmoregülasyon ile ilişkilendirilmektedir (Booth ve ark., 2012). MS iyon kanallarının keşfi ile ilk prokaryotik hücrelerin karşılaştığı ozmotik zorluklara yanıt vermek için en kolay ve en hızlı mekanizmayı sunduğu bilinmektedir (Reddy ve ark., 2019). İnsanlarda ve diğer memeli canlılardaki mekanotransdüksiyon daha çok duyusal sistemlerin aktif hale gelmesi, hücre göçü ve hücre farklılaşması başlıca tepkisel süreçlerdir. Bakterilerin hücre içi ve hücre dışı tepki verdiği, hücre şekli ve hücre sınırlarını düzenlediği bilinse de ökaryot canlılardaki mekanotransdüksiyon süreçleri hakkında çok daha fazla bilgi bulunmaktadır. Bakteriyel ve ökaryotik hücrelerin mekanik etkileri nasıl algıladığı ve hücre içinde bu etkileri nasıl yönlendirdiğine dair çalışmalar arttıkça, multidisipliner bir yaklaşımla fiziksel ve biyolojik mekanizmalar kullanıldığında mekanotransdüksiyon hakkındaki bilgilerimizin daha da artacağı düşünülmektedir (Dunn ve ark., 2016).

2.2. Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Mekanik Kuvvetin Önemi

İnsanlarda yaşamsal faaliyetler beş duyu organı, özellikle işitme ve dokunma ile duyusal nöronların algıladığı titreşim ve basınç gibi dış mekanik kuvvetlerin fonksiyonları ile sağlanmaktadır. Vasküler endotel hücrelerde yüzey gerilimi, böbrek ve üriner sistemde ozmotik kuvvet, kulaktaki tüy hücreleri (Pruitt ve ark., 2014), propriyosepsiyon algısı (Ridone ve ark., 2019), akciğer ve bağırsaklardaki gerilme mekanik kuvvetlerin etkisi ile düzenlenmektedir. Mekanik etkilerin algılanması için hücre içi ve hücre dışında özelleşmiş mekanosensörler bulunmaktadır. İnsan ve diğer gelişmiş ökaryotik canlılar, ozmotik basıncı algılamanın yanı sıra çevresel faktörleri algılamak için mekanik sinyalleri sinir sistemleri tarafından işlenmek üzere elektriksel sinyallere dönüştüren özelleşmiş duyusal hücrelerden oluşmaktadır. Mekanotransdüksiyon adı verilen bu süreç, MS iyon kanalların açılmasını sağlayan lipidler ve yardımcı elemanları içeren ara yüzden oluşmaktadır. Evrimsel süreç, membran lipidlerinin etkileşim halinde olduğu yüzeyin daha karmaşık hale gelmesine neden olmuştur. Bununla birlikte, hücre duvarı ve lipid çift tabaka membranla birlikte hücre dışı matriks, hücre iskeleti ve MS ile ilişkili proteinler, mekanik uyaranları iyon akışına dönüştürmek için MS iyon kanallarının açılmasında görevlidir. Ökaryotik canlılarda hücre membranında oluşan mekanik etkinin hücre içinde mekano-hedefe iletilmesindeki işleyiş mekanizması Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi mekanik etki, mekanosensörler, mekanoadaptörler, mekanotransmisyon ve mekano-hedef

şeklinde meydana gelmektedir. Bu işleyiş mekanizmasında mekanosensör; hücre membranı ve MS iyon kanalları, mekanoadaptör; aktin/miyozine bağlı proteinler, G proteinine bağlı reseptörler, protein kinazlar ve fosfatazlar; mekanotransmisyon (sitoplazma); aktin (hücre iskeleti), mekano-hedef ise gen düzeyindeki değişiklikler, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve/veya göçü şeklinde meydana gelmektedir (Pruitt ve ark., 2014; Bavi ve ark., 2017).



Şekil 2.1. Hücrede mekanosensasyon prosesleri. Dışarıdan gelen mekanik etkiler mekanosensörler tarafından algılanarak hücre iskeleti aracılığıyla mekanohedeflere ulaşmaktadır. Bu mekanohedefler hücre göçü, hücre proliferasyonu, apoptosiz gibi yaşamsal faaliyetleri etkilemektedir (Bavi ve ark., 2017).

Bakteriyel hücre içi sinyal iletiminde mekanik tepkilere verilen yanıt ve bu tepkilere uyum sağlanması yaşamının devamlılığı için zorunlu bir faktördür (Bavi ve ark., 2017; Gordon ve ark., 2019). Bakteriyel hücre yapıları genel olarak 1 µm büyüklüğünde olduğu için hücre yüzeyinin tamamının veya önemli bir kısmını gerektiren herhangi bir mekanik etkiye duyarlılığı ~1 µm ölçeğinde olacak şekilde duyarlı olması gerekmektedir. Bakteriler mekanik etkilere yanıt olarak aktif motorları ve zarf proteinlerinin mekanosensörler olarak görev yaptığı bilinmektedir (Gordon ve ark., 2019). Bununla birlikte, hücre membranına uygulanan gerilim, itme-çekme gibi kuvvetler MS iyon kanalları tarafından algılanmaktadır (Dufrêne ve ark., 2020). Hücre içi sinyal mekanizmasında siklik diguanilat monofosfat (c-di-GMP) ve siklik adenozin monofosfat

(cAMP) değişikliklerinin mekanoadaptörleri olabileceği düşünülmektedir. Mekano-hedefleri ise boyutlarındaki değişiklikler ve biyofilm oluşturma eğilimleri mekano-hedefleri olabileceğini düşündürmektedir (Gordon ve ark., 2019). Bununla birlikte *E. coli* ve *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*)'un yüzey sertliğine tepki verdiği gösterilmiş, ancak altında yatan mekanizma henüz aydınlatılamamıştır (Kolewe ve ark., 2015). Bakteriyel hücre içi sinyal mekanizmaları hakkında oldukça sınırlı veriler bulunmakla birlikte insanlarda yapılan çalışmalardan çok daha az çalışma bulunmaktadır (Bavi ve ark., 2017; Gordon ve ark., 2019). Bakteriyel MS iyon kanallarının insanlarda hücre içi mekanizmalarının aydınlatılması bakteriyel enfeksiyonları ve kontaminasyonları engellemede onların yaşamsal faaliyetlerini kontrol etmek veya yararlı süreçleri teşvik etmek için yeni yaklaşımların ve araştırmaların olacağı ve ayrıca ilaç tasarımı alanlarında daha fazla katkı sunacağı düşünülmektedir (Gordon ve ark., 2019).

2.3. Mekanosensitif İyon Kanalları

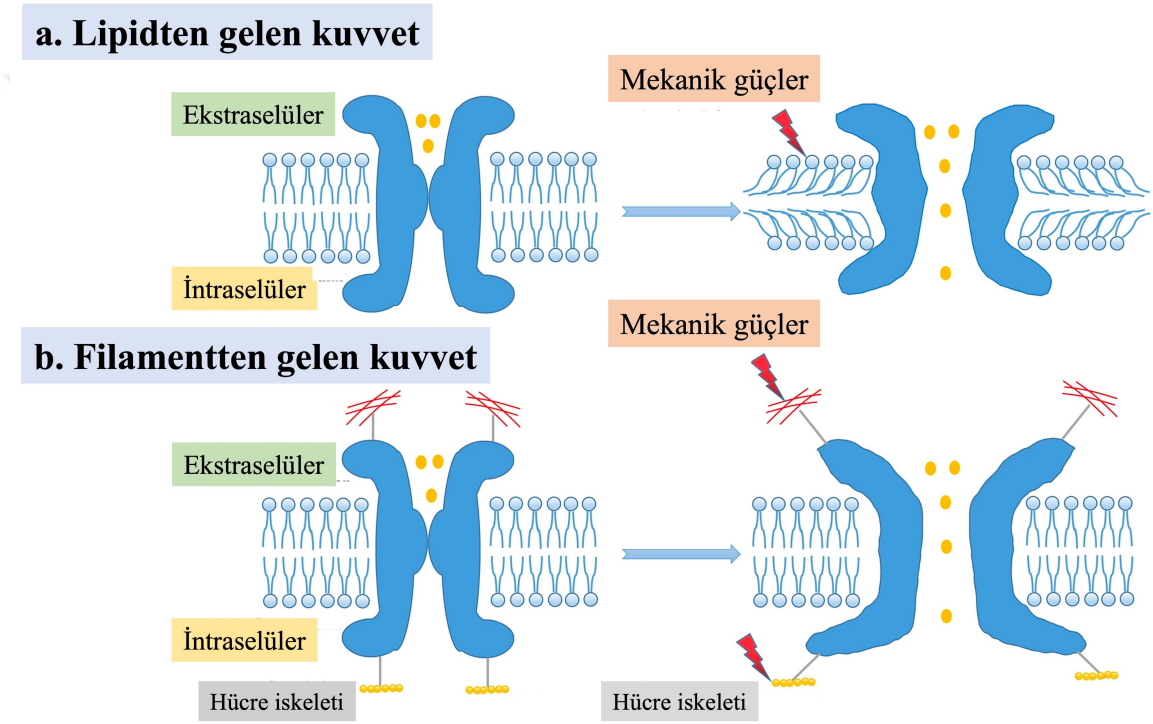
Tüm canlı organizmalar, dışarıdan gelen kimyasal ve fiziksel sinyalleri algılama ve bu sinyallere uyum sağlama yeteneklerine bağlı olarak hayatta kalabilmektedir. MS iyon kanalları, hücre içi ve hücre dışında meydana gelen basınç, esneme veya dokunma gibi mekanik etkilere karşı membranda oluşan gerilimi iyon akışına dönüştürebilen integral membran proteinleridir. Bakteri, bitki, hayvan hatta insanlar da dahil olmak üzere tüm canlılarda, MS iyon kanalları mekanik uyaranları birincil dönüştürücüleri olarak işlev gören iyonotropik kuvvet sensörleri olarak hareket etmektedir. Dokunma, propriyosepsiyon, sıcaklık-soğukluk, yerçekimi ve ozmotik basınç gibi mekanik uyarıcılara yanıt veren MS iyon kanalları ökaryotik ve prokaryotik tüm canlıların yaşamsal faaliyetlerinin devam edebilmesi için hayati önem taşımaktadır (Eyckmans ve ark., 2011). Ligandların G protein bağlı reseptörlere bağlanmasıyla sağlanan görme, koku ve tat alma gibi duyuların işleyiş mekanizması hakkında çok daha fazla araştırma bulunmaktadır. Tüm canlı organizmaların karmaşık membran yapıları incelendiğinde, lipid çift tabakanın, hücre iskeletinin, hücre duvarının ve/veya hücre dışı matriksin mekanik duyarlı kanal aracılı mekanotransdüksiyonda oynadığı rolün çözülmesi, kesin cevapları bekleyen temel sorulardan biridir, ancak mekanosensasyonun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam anlamıyla bilinmemektedir (Hamill ve ark., 2001).

Hücrelerin elektriksel kuvvetlere karşı yanıt verebildiği ilk kez Characean alglerinin hücrelerinde gösterilmiştir (Wayne, 1994). "Patch clamp" tekniğiyle izole edilen hücreden tek bir iyon kanalının elektriksel akımının ölçümü MS iyon kanallarının keşfini hızlandırmıştır (Booth ve ark., 2012). Hayvan MS iyon kanalları ilk kez embriyonik civciv iskelet kası (Guharay ve ark., 1984) ve kurbağa kasında (Brehm ve ark., 1984) keşfedilmiştir. Canlı hücrelerdeki gelişmiş hücre iskelet yapıları, fokal adezyonla ilişkili moleküller, G proteinine bağlı reseptörler ve diğer iyon kanalları gibi birçok protein mekanik kuvvetlerin algılanmasında ve bunlara yanıt verilmesinde görevlidir, ancak MS iyon kanalları lipid çift tabakasına veya bununla ilişkili membran dışı bileşenlere uygulanan streslerle doğrudan aktive edilebilmektedir (Pruitt ve ark., 2014). Bununla birlikte, çok düşük mekanik stresler de dahil olmak üzere bazı özelleşmiş MS iyon kanalları fiziksel uyaranları elektrik sinyallerine çevirerek duyu hücrelerinin bir milisaniye içinde yanıt vermesini sağlayabilmektedir (Bavi ve ark., 2017; Gordon ve ark., 2019).

2.4. Mekanosensitif İyon Kanallarının Geçiş Mekanizmaları

MS iyon kanalları, membrana herhangi bir kuvvetin etki etmediği durumlarda iletken olmayan 'kapalı' olarak isimlendirilen pozisyonda kalmaktadır. Ancak, membranda basınç/kuvvet etkisi uygulandığında MS iyon kanalları 'kapalı' pozisyondan 'açık' pozisyona geçmektedir. MS iyon kanallarının açık pozisyondaki durumu, membrandan iyonlar geçebildiği için 'iletken' pozisyon olarak isimlendirilmektedir (Ridone ve ark., 2019). MS iyon kanallarının iletken durumları ve geçiş mekanizmaları Şekil 2.2 gösterildiği gibi filamentten gelen kuvvet ve lipidten gelen kuvvet olarak iki gruba ayrılmaktadır. MS iyon kanallarının iletken durumları ve geçiş mekanizmaları için ilk olarak 'filamentlerden gelen kuvvet' paradigması önerilmiştir. Bakteriler üzerinde yapılan ilk çalışmalar, membranda bulunan lipidlerin algıladığı kuvvet sayesinde MS kanallarının aktif hale geldiği gösterilmiştir (Bavi ve ark., 2017). Bu paradigma 'lipidlerden gelen kuvvet' mekanizması olarak isimlendirilmektedir ve kanal aktivasyonundan sorumlu kuvvetin, hücre membranıyla ilişkili harici moleküllere ve yapılara ihtiyaç duymadan yalnızca membran yoluyla iletildiği anlamına gelmektedir. MS iyon kanallarının geçiş mekanizmaları hakkında prokaryotik küçük iletkenlikli mekanosensitif iyon kanalı (MscS) ve büyük iletkenlikli mekanosensitif iyon kanalı (MscL) ile yapılan çalışmalar,

bakteriyel MS iyon kanallarının lipidlerden gelen kuvvet paradigmasına, ökaryotik iki domaine sahip potasyum kanal (K2P) tipi ve diğer kanalların filamentten gelen kuvvet paradigması ile açıldığını göstermektedir (Brohawn, 2015). Ancak, insanlarda bulunan Piezo1 kanallarının lipidlerden gelen kuvvet paradigmasına göre açıldığı gösterilmiştir (Cox ve ark., 2016). Bununla birlikte, diğer memeli MS iyon kanallarına ve OSCA1.2 (Murthy ve ark., 2018), MCA2 (Li ve ark., 2020) ve MSL kanallarına sahip bitkilerin de lipidlerden gelen kuvvet ilkesine göre açıldığı bilinmektedir (Guichard ve ark., 2022). Bununla birlikte, prokaryotik ve ökaryotik tüm canlılar için MS iyon kanallarının geçit mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 2.2. Mekanosensitif iyon kanallarının geçiş mekanizmaları. A) Lipidten gelen kuvvet ilkesi, B) Filamentten gelen kuvvet ilkesi (Jia ve ark., 2022).

2.4.1. Filamentten Gelen Kuvvet

Ekstraselüler matriks veya hücre dışı yardımcı proteinlere uygulanan bir kuvvet MS iyon kanalına 'doğrudan' veya 'dolaylı' olarak hücre iskeleti ve hücre iskeleti ile ilişkili proteinlere bağlayan 'tether' denilen bir bağ/ip aracılığıyla iletilmektedir. Bu mekanizmaya 'filamentten gelen kuvvet' veya 'bağdan gelen kuvvet' denilmektedir (Martinac Boris ve ark., 1990). Bu hipotez, MS iyon kanalları üzerindeki mekanik etki,

spesifik hücresel lokalizasyon ve hücre iskeleti yapısal proteinleri, kuvveti kompanse eden yardımcı proteinler değiştirilebilmektedir. Bu nedenle, bir hipotez olarak kabul gören 'filamentten gelen kuvvet' paradigması, bağlanma moleküllerinin mekanik hassasiyeti nasıl düzenlediği ve bu mekanik süreçte dinamik etkileşimleri nasıl ilettiğini açıklamaktadır. Filamentten gelen kuvvet için bağlayıcı (tethering) faktörleri, homodimerik sarmal-sarmal (coil-coil) proteinleri ve multimerik bağ kompleksleri olarak iki gruba ayrılmışlardır. Sarmal-sarmal bağ yapıları, uzun sarmal-sarmal alanlarla birbirine bağlanan iki büyük globüler baş yapısına sahip, hidrofilik ve homodimerik yapıdaki proteinler olarak bilinmektedir. Multimerik bağ komplekslerinden daha büyük bir yapıya sahip olan sarmal-sarmal bağ proteinleri 200 nm'den daha uzun mesafedeki veziküllere tutunabilme özelliğine sahiptir. Multimerik bağ kompleksleri ise, yaklaşık 250-800 kDa molekül ağırlığında olup, her bir subünitesi maksimum 10 alt birimden meydana gelmektedir. Multimerik bağ kompleksleri maksimum 30 nm uzaklıktaki veziküllerle etkileşime girebilmektedir (Bröcker ve ark., 2010). Memeli canlılardaki işitme duyu sisteminin tüy hücrelerinin stereocilia ucu, mekanik etkilerle gerildiğinde filamentler tarafından bir mekano-elektriksel transdüksiyon aracılığıyla elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü bilinmektedir (Cunningham ve ark., 2019).

Hücre duvarına sahip olmayan tüm canlı hücrelerin membranları, doğrudan çevredeki moleküllerden ve ekstraselüler matriksten gelen tüm mekanik uyaranlara karşı savunma mekanizması oluşturmak zorundadır. İntegrinlerin kolajen, laminin ve fibronektin gibi hücre dışı proteinler için bir reseptör gibi yardımcı görevi olduğu gösterilmiştir, ancak integrinlerin filamentten gelen kuvvet modeli hakkında oldukça az bilgi bulunmaktadır (Martino ve ark., 2018). Fakat, integrin proteinlerinin ekstraselüler matriksi hücre iskeletine ve ekstraselüler matriks ile fokal adezyonlara aracılık ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, somatosensöriyel nöronların, dokunma duyu hissi için nöronal plazma membranını ekstraselüler matrikse bağlamak için ve bazal laminayı yeniden düzenlemek amacıyla üretilen bağlayıcı proteinler salgıladığı gösterilmiştir (Das ve ark., 2022). Piezo1 kanalının açılma mekanizmasında ekstraselüler matriksin önemli bir etken olduğu ve bu kanalların hücre içi ve dışından iletken duruma geçirildiği gösterilmiştir (Gaub ve ark., 2017). β-katenin ve F-aktin kompleksi ile etkileşime girdiği gösterilen Piezo1 kanallarının mekanik duyarlı açılma mekanizmasını doğrulayan bir çalışmada e-kaderin

bağlanmasının kritik bir rolü olduğu belirlenmiştir. Piezo1 kanallarının biyokimyasal ve fizyolojik olarak aktin hücre iskeletine bağlı olarak mekanotransdüksiyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir (Wang J. ve ark., 2022). Transient Reseptör Potansiyel Kanalı (TRP)V4'nın da aktin hücre iskeletine bağlı olduğunu gösteren ve dışlayan çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte, TRPV4 iyon kanalları da dahil olmak üzere tüm TRP süper ailesinin açılma mekanizmalarının aydınlatılması için daha çok çalışma yapılması gerekmektedir (Nikolaev ve ark., 2020). Filamentten gelen kuvvet paradigması ile ekstraselüler matriks ilişkili hücre iskeleti kuvvet paylaşımı modeli, mekanosensasyon süreci hakkındaki ekstraselüler matriks ve MS iyon kanalı arasındaki ilişki hakkında daha detaylı bilgiye ulaşılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerle birlikte yeni biyofiziksel modellerin ve yaklaşımların multidisipliner çalışmalarla daha verimli olacağı belirtilmektedir. Mekanosensörlerin fizyolojik ve fonksiyonel mekanizmalarının altında yatan mekanizmalar aydınlatıldıkça mekanikle ilgili klinik patolojik bozukluklar için yeni terapötik stratejiler sağlanacağı düşünülmektedir (Chuang ve ark., 2022).

2.4.2. Lipidten Gelen Kuvvet

Biyolojik membranın önemli bileşenleri olan fosfolipidler, sfingolipidler ve steroller amfipatik maddelerdir. Tüm yaşam formlarında, hücre membranları için temel bileşen olmalarının nedeni su ile etkileşim halinde hücrelerle 'hidrofobik etki' oluşturabilme özelliğinden kaynaklanmaktadır (Chandler, 2005). Lipid çift tabakalı membran tam anlamıyla rijit olmamakla birlikte sıkıştırılabilir bir yapıya da sahip olmadığından mekanik gerilmeler hidrofobik bir düzensizlik oluşturmaktadır. Normal şartlarda kapalı pozisyonda kalan bir MS iyon kanalının kapalı/açık dengesini de değiştirmektedir. Bununla birlikte, kanalın sarmal eğimini ve dolayısıyla MS iyon kanalı geçişini etkileyebilecek uygun boyut ve şekle sahip lipidlerle çevreleyerek çift tabaka üzerindeki mekanik gerilimi en aza indirme eğiliminde olacağı düşünülmüştür. Yaklaşık 30-35 yıl önce *E. coli* dev sferoplastlarında bulunan amfipatik maddelerin bakteriyel MS iyon kanallarının iletken konuma geçtiği gösterilerek ilk kez 'lipidlerden gelen kuvvet 'modeli önerilmiştir. Bu model 'lipidler önce hareket eder' ilkesi olarak da bilinmektedir (Martinac Boris ve ark., 1990). *E. coli*'ye ait büyük iletkenlikli mekanosensitif iyon kanalı (EcMscL) saflaştırıldıktan sonra lipidlerle yeniden yapılandırılmıştır ve bu lipidlerin

EcMscL iyon kanalının mekanik kuvvetle açılması/aktif hale gelmesi için yeterli olduğu gösterilmiştir. “Patch clamp” tekniği, saflaştırılan proteinlerin lipidlerle rekonstitüsyonu ve iyon kanallarının mekanosensitifliğinin incelenmesi ‘altın standart’ tekniği olarak kabul görmüştür (Sukharev S. I. ve ark., 1994). Ökaryotik canlılarda lipidten gelen kuvvet ilkesine göre TWIK ile İlgili Potasyum Kanalı (TREK)1, araşidonik asitle uyarılan K^+ kanalı (TRAAK) ve Piezo1 gibi çeşitli MS iyon kanallarının açıldığı gösterilmiştir (Maingret ve ark., 2000; Chandler, 2005). MS iyon kanalları olarak prokaryotik MscS ve MscL iyon kanalları ile yapılan araştırmalarla lipidten gelen kuvvet ilkesi aydınlatılmıştır ancak K2P-tipi MscS iyon kanalları olarak bilinen TREK1/2 ve TRAAK ile TRPV4 kanallarında da lipidten gelen kuvvet ilkesine dayalı çalışmalar yapılmaktadır (Nikolova-Krstevski ve ark., 2017). Bununla birlikte, lipidlerden gelen kuvvet ve filamentten gelen kuvvet modelleri rijit bir şekilde birbirini dışlamayacağı düşünülmektedir (Cox ve ark., 2017, 2019). Piezo1 iyon kanalının hücre iskeleti proteinlerinin ekstraselüler matriks bileşenleriyle iletişimleri bilinmektedir. Bununla birlikte lipid çift katmanlı membranla da etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir (Cox ve ark., 2016; Bavi ve ark., 2019).

2.5. Membran Lipidlerinin Mekanosensitif İyon Kanalları İçin Önemi

MS iyon kanallarının fonksiyonları, membran lipidlerinin biyokimyasal ve rijitlik özelliklerine göre açık-kapalı pozisyonları düzenlenebilmektedir (Guichard ve ark., 2022). Lipidler ile MS iyon kanalları arasındaki etkileşimler moleküllerin özelliklerine ve spesifik kimyasal etkileşimlere bağlı olarak değişebilmektedir. Membrandaki lipid molekülleri, lipid-protein etkileşimlerindeki afinitesi ve/veya avidite, membran proteinlerinin ve lipidlerinin işlevlerini doğrudan etkilemektedir (Zhong ve ark., 2013). MS iyon kanallarında membrandaki gerilimin algılanması için tanımlanan ‘lipidten gelen kuvvet’ ilkesine göre, lipid çift tabakanın MS iyon kanallarıyla doğrudan etkileşime girebildiğini ve tüm biyolojik hücre membranlarının tek başına lipid çift tabakası yoluyla iletilen mekanik kuvvetin neden ve nasıl bir mekanik duyarlılıkla açabileceğini açıklamak için kullanılan evrimsel olarak korunmuş bir fizikokimyasal ve biyokimyasal bir ilke niteliği taşımaktadır (Booth ve ark., 2011; Pliotas ve ark., 2017). Bu paradigmaya bağlı olarak hücre membran kalınlığı, membran akışkanlığı, membran eğrilik miktarı, membrandaki hidrofobik etkileşimler gibi birçok özelliği nedeniyle MS iyon kanalından maddelerin geçişlerini değiştirebileceği savunulmaktadır. Lipidler ve MS iyon kanalları

da dahil olmak üzere tüm integral membran proteinleri ile membran lipidleri arasındaki etkileşimlerin yapısal çalışmalarda daha belirgin olarak tespit edilmesi, saflaştırılmış MS iyon kanalları için aynı özelliklere sahip bir ortam sağlamak, farklı yük, şekil ve doymamış lipidlerin dahil edilerek çalışmaların daha detaylı yapılması önerilmektedir (Cox ve ark., 2019).

MscL iyon kanalının spesifik lipid türlerine seçici davrandığı belirlenmiştir. Amonyum taşıyıcı trimer B (AmtB) ve aquaporin Z (AqpZ) karşılaştırıldığında, AmtB > AqpZ > MscL şeklinde bir seçiciliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Zhong ve ark., 2013; Pliotas ve ark., 2017). MscL'nin hidrofobik lipid zincir bağlama cebi gösterilmiştir. Bununla birlikte, MscL iyon kanalının belirli bir ana grup ve/veya lipid zincir uzunluğu için güçlü bir afinite olmadığı ve seçici davranmadan lipidleri bağlayabildiği gösterilmiştir (Zhong ve ark., 2013). Bununla birlikte, herhangi bir lipid çeşidinin bağlanmasının önemli bir rijidite sağladığı gösterilmiştir (Pliotas ve ark., 2017). MscS 'hook/kanca lipid' bağlanması gibi kuvvet algılamada rol oynayan spesifik lipidlerin ve lipid-protein etkileşim bölgelerinin önemli rolü olabileceği bilinmektedir. EcMscS'de açık/kapalı konformasyonları taklit eden lipidlerin çeşitli karmaşık rolleri olduğu gösterilmiştir (Zhang Y. ve ark., 2021). MscS ailesinin lipid çift tabakasıyla en dinamik etkileşimi gösteren muhtemel integral membran proteinleri olduğu düşünülmektedir (Booth ve ark., 2011).

2.6. Mekanosensitif İyon Kanallarının Sınıflandırılması

İyon kanalları sekans ve fonksiyonel olarak farklılıklar göstermektedir. Tüm iyon kanallarının en belirgin ortak özellikleri iki veya daha fazla transmembran (TM) alana sahip oldukları bilinmektedir. MS iyon kanalları endojen hücrelerde çok düşük ekspresyon seviyelerine sahiptirler. MS iyon kanallarının tanımlanabilmesi için ortaya konulan ayırıcı özellikler diğer iyon kanallarına kıyasla tanımlanmaları açısından oldukça geç dönemde olmuştur (Árnadóttir ve ark., 2010). Bununla birlikte, TM alana sahip olan bir iyon kanalının mekanosensör bir organ içinde ekspresyonunun olması ve hücre olgunlaşması/bütünlüğü için zorunlu olması MS iyon kanallarının tanımlanması için ilk kuraldır. Hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin devam ettirilmesinde zorunlu olması ve hücrede bulunmaması durumunda mekanik uyarımlara yanıt vermenin engellenmesi ikinci tanımlama kuralıdır. İyon kanalına ilişkin gen ekspresyonundaki mutasyonlar ile

mekanik tepkilerin değişmesi iyon kanalı için üçüncü tanımlama kriteridir. MS iyon kanalı proteininin heterolog ekspresyonunun konakçı hücrelerde güçlü mekanosensör yanıtlarla sonuçlanması ise dördüncü tanımlama kriteridir (Árnadóttir ve ark., 2010; Martino ve ark., 2018; Jin ve ark., 2020). MS iyon kanallarının sekans benzerliği veya topolojisine göre sınıflandırılması oldukça zordur. Bu sebeple, MS iyon kanalları ökaryotik ve bakteriyel MS iyon kanalları olarak fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaktadır (Martinac Buechner ve ark., 1987).

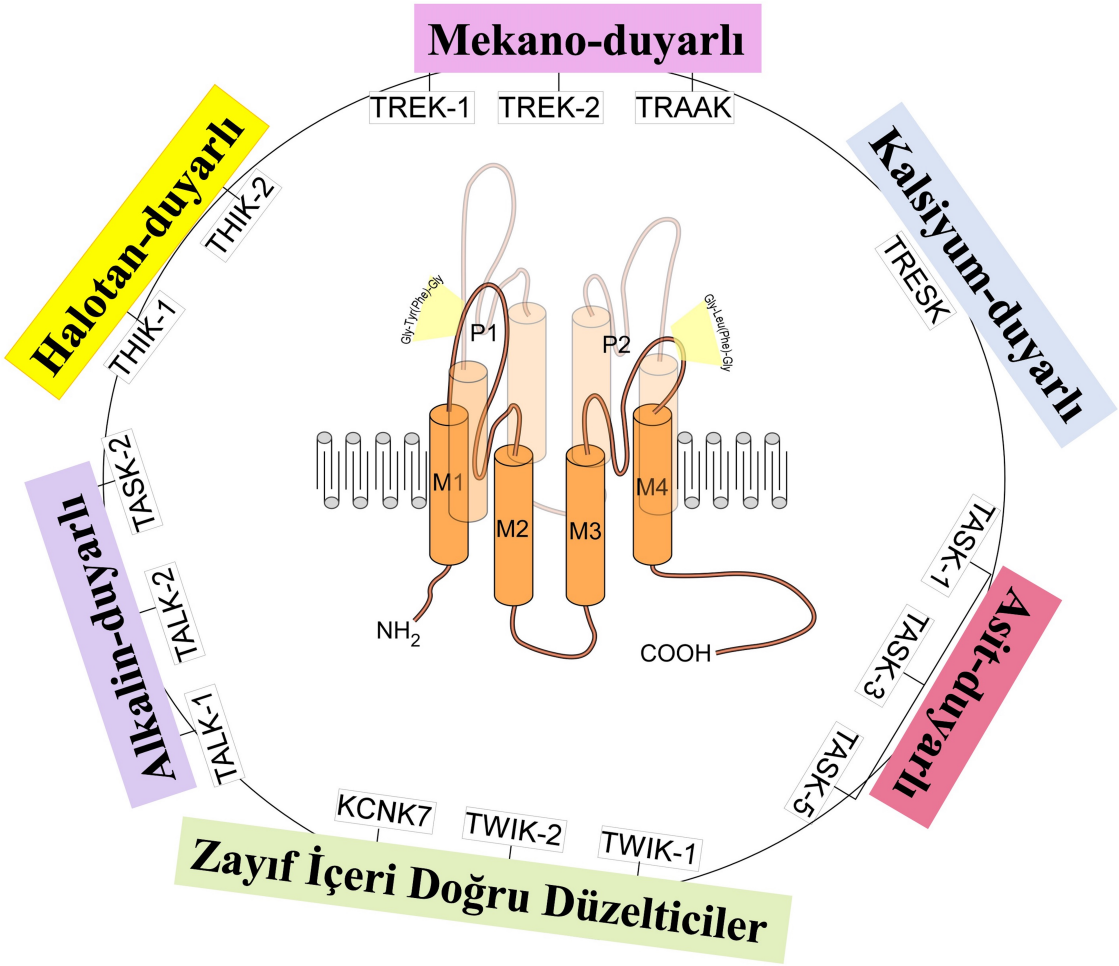
2.6.1. Ökaryotik Mekanosensitif İyon Kanalları

Dokunma, duyma, propriyosepsiyon, ozmotik gradyanlar, hücre içine su girişi, gravitropizm ve hücresel turgorun kontrolü gibi faktörlerin düzenlenmesi ökaryotik MS iyon kanallarının fizyolojik etkileri ile mekanotransdüksiyonun düzenlenmesiyle ilgili olduğu bilinmektedir. Ökaryotik MS iyon kanallarından en çok çalışılan kanallar; K2P süperailesi, TRP süperailesi ve Piezo süperailesi gibi oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip olduğu bilinmektedir (Hamill ve ark., 2001).

İki Domaine Sahip Potasyum MS İyon Kanalları

K2P iyon kanalları bir alt birim içinde dört TM segmentine sahiptir ve 2 asimetrik por oluşturan halka (P1 ve P2) içermektedir. Bu iki domain N ve C uçlarının sitozole baktığı dimerler olarak görev yapmaktadır. K2P alt birimleri KCNK genleri tarafından kodlanmaktadır.

Hücre membranında K^+ taşınmasıyla bilinen ve benzer membran topolojisi, moleküler işleyiş, elektrofizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara sahip olmasıyla karekterize integral membran proteinleridir (Lolicato ve ark., 2017; Nematian-Ardestani ve ark., 2020). K2P kanallarının TM segmentleri oldukça korunmuş durumdadır. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi, K2P kanalları sekans benzerliği ve işlevsel özelliklerine göre TWIK (Tandem Por Alanı Zayıf İçe Doğru Düzeltici Potasyum Kanalı), TREK, TASK (TWIK ile İlgili Aside Duyarlı Potasyum Kanalı), TALK (TWIK ile İlgili Alkali pH ile Aktive Olan Potasyum Kanalı), THIK (Tandem Por Alanı Halotanın Engellediği Potasyum Kanalı) ve TRES (TWIK ile İlgili Omurilik Potasyum Kanalı) olarak altı subfamilyaya ayrılmıştır (Enyedi ve ark., 2010).



Şekil 2.3. K2P iyon kanallarının sınıflandırılması. K2P bir alt birim içinde dört TM alana sahiptir. P1 ve P2 olarak iki tane asimetrik gözenek oluşturan halka içermektedir (Djillani ve ark., 2019).

K2P kanallarının on beş üyesi, dinamik ve polimodal düzenlemelerinin hücresel uyarılabilirliği belirlediği ve gen ifadesinin en çok insan hücrelerinde yüksek olduğu belirlenmiştir (Enyedi ve ark., 2010). K2P subfamilyaları düşük bir sekans benzerliğe sahip olmakla birlikte % 30'dan daha az bir amino asit sekans benzerliğine sahiplerdir. Bununla birlikte, tüm K^+ kanallarında görülen iki domainli alt birimlerinin dimerizasyonu ile bir araya getirilen dört domaine sahip TVGYG benzeri sekansları potansiyel K^+ kanalının ayırıcı özelliğine de sahiptir (Lolicato ve ark., 2017). K2P alt birimleri, tüm membran potansiyel değerlerinde zorunlu olmayan ancak K^+ geçişlerinde primer olarak görev yapan membran proteinleriyle ve/veya diğer özel moleküller ile iş birliği yaparak sekonder olarak K^+ sızıntısının önlenmesine yardımcı olan kanallardır (Nematian-Ardestani ve ark., 2020). Hücre membran potansiyelini düzenleyen ve hücresel

uyarılabilirliği ayarlanmasında K^+ bağımlı diğer K^+ kanal moleküllerle ve taşıyıcı proteinlerle bağlantıları olduğu bilinmektedir (Enyedi ve ark., 2010; Lolicato ve ark., 2017). K2P kanallarında subfamilya üyelerinin farklı fizikokimyasal faktörler ve hücre içi sinyal mekanizmaları bulunmaktadır.

TWIK iyon kanallarına ait TWIK1 iyon kanalının insanlarda ilk klonlanan K2P kanalı olduğu ve ventriküler miyosit, atriyumda ve beyinde gen ekpresyonunun oldukça fazla olduğu rapor edilmiştir (Haswell ve ark., 2011). TWIK kanalları pH değişikliklerine oldukça hassastır (Ellinghaus ve ark., 2005) TWIK ailesi kalp dokularında yaygın olarak bulunduğundan TWIK kanallarının kalp fizyolojisinde önemli bir rol oynadığını gösteren önemli bilgiler de bulunmaktadır. TWIK ile ilgili K^+ kanallarının tamamının, voltaja bağlı bir aktivasyon eşiği göstermeyen, ani ve inaktive olmayan K^+ akımları üretmesi, bunların, dinlenim membran potansiyelinin üretimi ve modülasyonunda yer alan sızıntı K^+ kanalları olduğunu göstermektedir. Bu sebeple, TWIK ailesi üyeleri (TWIK-1 ve TWIK-2) zayıf temel K^+ akımları üretmektedir. Zayıf iletkenlikli kanallar olmaları onların beyin, kalp, bağışıklık sisteminin hücrelerinde ve birçok dokuda K^+ iletkenliklerini kontrol edebileceğini göstermektedir (Lengyel ve ark., 2021).

TREK alt ailesinin üyeleri hücre içi N-terminali, ikinci ve üçüncü TM segmentler arasındaki kısa ilmek bölgesi ve C-terminal kısmında genişletilmiş (tipik olarak 120-220 amino asit civarında) hücre içi kuyruk bölgesi ile tanınmaktadır. TREK subfamilyası TREK1, TREK2 ve TRAAK mekanik duyarlı iyon kanalları olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bu kanalların mekanik etki altında iletken konuma geçmesi, fizyolojik koşullar altında dışa doğru K^+ akımıyla sonuçlanmaktadır. TREK subfamilyası üyeleri, membranın fosfolipid çift tabakasının geriliminden doğrudan etkilenmektedir. Bunlar, TREK1, TREK2 ve TRAAK, K2P 4TMS/2P yapılarına sahip kanallardır. TREK-TRAAK K^+ kanalları, araşidonik asit tarafından güçlü bir şekilde aktive edilebilmektedir (Fink ve ark., 1998; Brohawn ve ark., 2014). TRAAK kanallarının membran gerilimi 0,5–12 mN/m olduğunda aktif hale gelmektedir (Brohawn ve ark., 2014). TREK/TRAAK kanalları ise 0.01 ve 0.3 mN/m arasında membranın dinlenme durumundaki geriliminden de düşük bazal aktiviteye sahip olduğundan membrandaki en küçük gerilimlere karşı oldukça hızlı cevap vermektedir (Le Roux ve ark., 2019). Bununla birlikte, TREK/TRAAK kanal

proteinleri ‘filamentten gelen kuvvet ve ‘lipidten gelen kuvvet’ ilkelerine uyumlu oldukları ve doğrudan membran gerilimine tepki verdikleri düşünülmektedir (Lengyel ve ark., 2021).

Transient Reseptör Potansiyel Kanalları

TRP iyon kanalları ışık, ısı, koku, ağrı ve mekanik kuvvetler gibi çok farklı uyaranlara tepki verdiklerinden polimodal sensörler olarak bilinmektedir. TRP ailesi, Ca^{+2} duyarlı katyon geçirgenliğine sahip kanallardır. Günümüze kadar belirlenen TRP süper ailesi, kanonikal (TRPK) yedi alt aileden, TRP vaniloid (TRPV) altı alt aileden, TRP melastatin (TRPM) sekiz alt aileden, TRP polisistin (TRPP) üç alt aileden, TRP mukolipin (TRPML) üç alt aileden ve TRP ankirin (TRPA) olarak bilinmektedir (Montell, 2001). Sekans homolojilerinde farklılıklar olan TRP kanalları yapısal olarak birbirlerine benzemektedir. Tüm TRP kanalları aynı veya homolog tetramerlerden oluşmaktadır. Tetramerdeki dört alt birimin her biri, hücre içi C ve N uçları olan altı TM domainden oluşmaktadır. TM5 ve TM6 domainleri hücre dışı bir halka ile bağlanmaktadır. Bununla birlikte, bu halka yapısı katyon iletim porlarını oluşturmaktadır (Colbert ve ark., 1997).

TRPK ailesi TRPK1, TRPK2, TRPK3, TRPK4, TRPK5, TRPK6 ve TRPK7 olmak üzere yedi gruba ayrılmaktadır. Her bir TRPK tipi iyon kanalı altı TM sarmal, bir hidrofobik por oluşturan halka, üç ile dört ankirin tekrarından oluşmaktadır. N ve C uçlarında sarmal-kıvrımlı alanların bulunması ortak özelliklerindendir. Bununla birlikte, C terminal bölgesinde prolin açısından zengin bir alanları bulunmaktadır. Membrandaki üyeleri Ca^{+2} seçiciliği ile bilinen TRPC subfamilya üyeleri Ca^{+2} geçirgen membran kanalları olarak tanımlanmaktadır (Vazquez ve ark., 2004).

TRPV alt ailesinin yapısal olarak en belirgin özelliği, altı tekrardan oluşan N-terminal ankirin tekrar alanının ve diğer alt birimlerden gelen ankirin tekrarları sitoplazmik boşluğu çevreleyen karakteristik bir alanda bir araya gelmesidir. C terminal domaini, N terminal domaininden iki β-şeritli antiparalel bir β-tabaka oluşturan bir β-sarmalı içermektedir. TRPV ailesi sekans homolojilerine ve fonksiyonlara göre ikiye ayrılmaktadır. Isıya ve ağrıya olan duyarlılıkları ile bilinen TRPV1-4 iyon termo-TRPV kanalları olarak adlandırılmaktadır. TRPV5 ve TRP6 iyon kanalları ise klasik olarak sitozolik Ca^{+2} seçici kanallar olarak bilinmektedir (Pumroy ve ark., 2020).

TRPM ailesi TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 ve TRPM8 olmak üzere 8 subfamilyadan oluşmaktadır. Sekans benzerliklerine göre TRPM1/3, TRPM4/5 ve TRPM/6,7 ve TRPM2/8 olarak dört gruba ayrılmışlardır. Bununla birlikte, TRPM4 ve TRPM5 yalnızca Na^{+} veya K^{+} hücre içi Mg^{+2} homeostazını sağlayan TRPM6 ve TRPM7 sadece +2 değerlikli Mg^{+2} iyonlarını geçirerek oldukça istisna özelliğe sahip MS iyon kanalları olarak tanımlanmışlardır (Huang Y. ve ark., 2020).

TRPP ailesi otozomal baskın polikistik böbrek hastalığına neden olan TRPP1'deki (Pkd 2 geni) mutasyonlar araştırmaları sırasında tanımlanmıştır. Sekans homolojisine göre PKD1 ve PKD2 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Hanaoka ve ark., 2000).

TRPML ailesi TM domain topolojisi TRP kanallarına benzemektedir. TRP kanallarında görülen belirgin ve büyük N ve C terminal alanları ve motifleri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, TRPML ailesi çevresel Ca^{+2} ve proton konsantrasyonunu algılamak için membranda içeriden dışarıya doğru çıkıntı oluşturan S1 ve S2 arasında geniş bir ekstrasitozolik/lümen alanlarının bulunmaları bu ailesinin oldukça spesifik ayırıcı özelliği olarak görülmektedir. TRPML kanalları endozomlara ve lizozomlara lokalize olarak bulunmaktadır. TRPML1 fonksiyon bozukluğu lizozomal depo hastalığı olan mukolipidoz tip IV'e neden olduğu bilinmektedir (Bargal ve ark., 2000).

TRPA ailesinin, 17 ankirin tekrarından oluşan uzun bir N-terminal kuyruğuna sahip olmasıyla oldukça belirleyici bir sekans özelliği bulunmaktadır. Bu ailenin tek üyesi olan TRPA1 hardal yağı, wasabi ve sarımsak gibi uyaranlara yanıt verdiğinden wasabi reseptörü olarak isimlendirilmektedir. Nosiseptif nöronlarda ve epitel hücreleri gibi nöronal olmayan hücrelerde bol miktarda bulunmaktadır. Farmakolojik ağrı sendromu, astım ve öksürük gibi çalışmalarda oldukça dikkat için hedef bir kanaldır (Zhang H. ve ark., 2022).

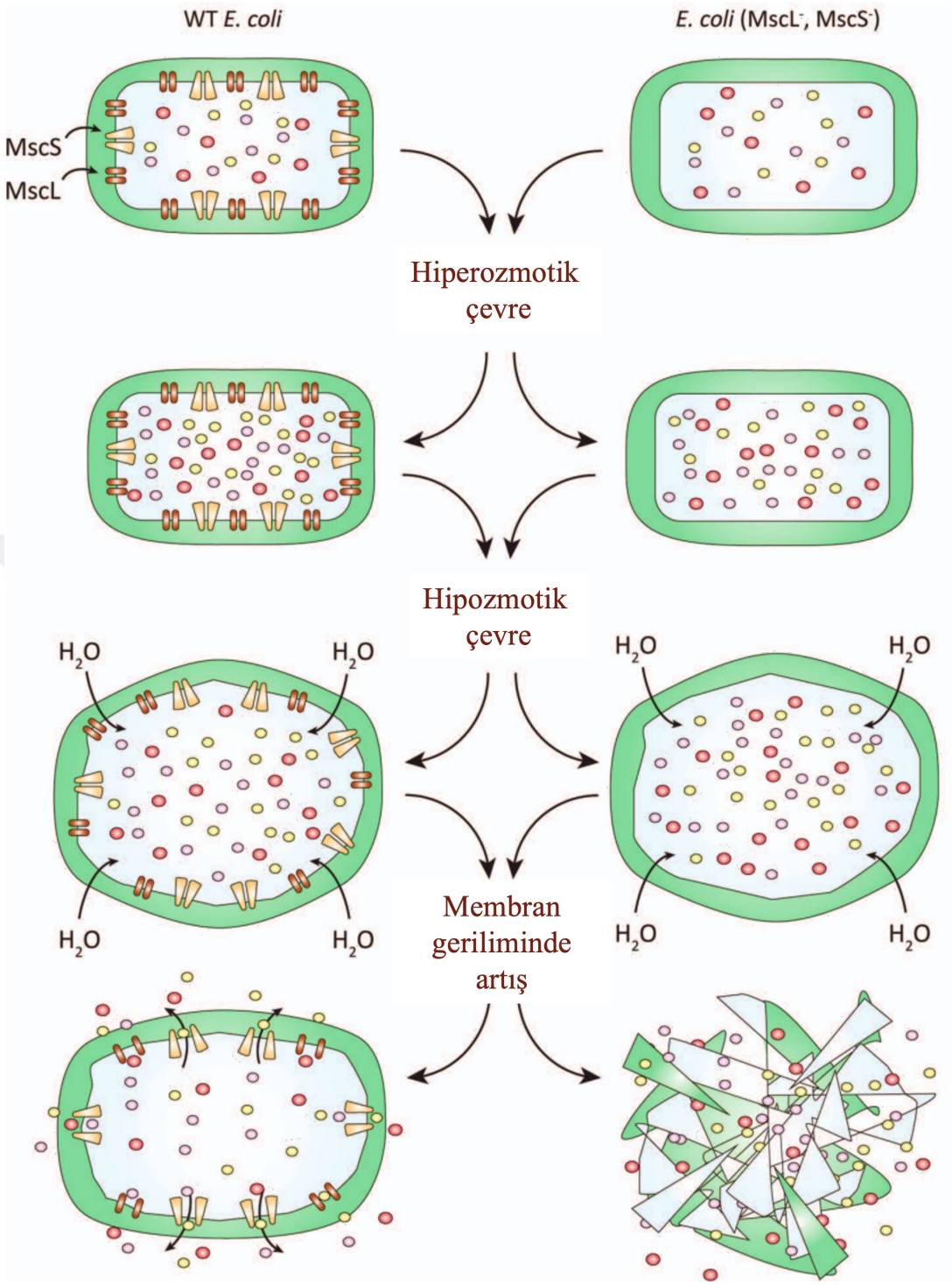
Piezo Kanalları

Piezo ailesinin üyeleri ~30-40 TM domaine sahip integral membran proteinleridir. Bir triskelion veya üç kanatlı pervaneye benzer şekilde görünen büyük homotrimerik yapıya sahiplerdir. Piezo kanallarının mekanik olarak duyarlı çok farklı hücre tiplerinde eksprese edildiği bilinmektedir. Sıvı akışı, çekme, ultrasonik kuvvetler, baroreseptör refleksi gibi farklı kuvvetlere yanıt olarak iyon geçişleriyle aktivite göstermektedir. Piezo ailesinin memelilerde Piezo1 ve Piezo2 olarak iki üyesi bulunmaktadır (Coste ve ark., 2012; Coste ve ark., 2015). Yunanca "píesi=basınç" kelimesinden esinlenerek isimlendirilmiştir. Piezo1 ve Piezo2 sırasıyla Fam38A ve Fam38B genlerinden kodlanmaktadır. İnsan Piezo1 kanalı, 16. kromozomda bulunmaktadır ve 2521 amino asitten oluşmaktadır. İnsan Piezo2 kanalı ise 18. kromozomda bulunmaktadır ve 2752 amino asitten oluşmaktadır. Piezo1 ve Piezo2 homotrimer yapıları birbirlerine benzediği yönünde çalışmalar olsa da detaylı incelemelerde pek çok yönüyle yapısal farklılıkları olduğu gösterilmiştir (Coste ve ark., 2010; Coste ve ark., 2015). Fare Piezo1 ve Piezo2 üç boyutlu yapısı KriyoEM ile gösterilmiştir, ancak insan Piezo1 ve Piezo2'nin yapıları tam olarak bilinmemektedir. Piezo1, çevresel mekanotransdüksiyon modülü ve merkezi iyon iletimi por modülü olarak ikiye ayrılmaktadır. Periferik modül, hücre dışı distal kanatlardan, periferik helislerden, TM çapalarından ve hücre içi ışınlardan oluşmaktadır. Merkezi por modülü, C-terminal hücre dışı alanlarını, iç ve dış TM sarmalları ve hücre içi C-terminal alanlarını içermektedir (Jiang ve ark., 2021). Piezo1 ve Piezo2'nin Kriyo Elektron Mikroskop (KriyoEM) yapıları, Piezo1'in merkezi porunun genişlediğini, Piezo2'nin TM merkezi porlarının ise kapalı olduğunu göstermektedir. Piezo2'nin ara düzlem açıklıklarının çapı, derinliği ve maksimum yansıtılan alanı 24 nm, 9 nm ve 250 nm'dir. Piezo1 ile ilgili parametreler ise sırasıyla 18 nm, 9 nm ve 120 nm'dir (Wang L. ve ark., 2019). Piezo1'in in vitro olarak lipid moleküllerinden gelen yanal gerilimin mekanik duyarlılığı aktive ettiği belirlenmiştir. Piezo kanallarını aktive etmek için hücre dışı mekanik uyaranların hücre zarındaki lipid moleküllerinden gerilime dönüştürülebileceği düşünülmektedir. Piezo1, Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi katyonlar ile iletken hale gelmektedir fakat Ca^{+2} için çok daha az seçici olarak iletken hale geldiği bilinmektedir. Piezo2 seçici olmayan katyonik iletkenlik özelliğine sahiptir (Coste ve ark., 2010). Piezo kanalları aktif hale getirildiğinde Ca^{+2} iyon akışıyla Piezo kanalları hücresel bir sinyal kaskadı

başlatmaktadır. Piezo kanallarının, hücresel mekanotransdüksiyonda mekanik sinyallerin biyokimyasal sinyallere dönüştürülmesinde görevli olduğu bilinmektedir. 2021 Nobel Ödülüne layık görülen Piezo1 ve Piezo2 mekanoreseptörlerinin mekanik kuvvetin tüm canlı türlerdeki önemli rolü nedeniyle mekanobiyolojideki çalışmalara ilgiyi ve merakı artırmaktadır. Bununla birlikte, mekanokanalopatiler hakkında yeni tedavilerin geliştirilmesi için bu kanalların potansiyel hedefler olduğu düşünülmektedir (Martinac Boris, 2022).

2.6.2. Bakteriyel Mekanosensitif İyon Kanalları

Mekanik duyarlılık adaptasyonu bakteri hücrelerinin hayatta kalması için oldukça zorlu bir süreçtir. Evrimsel olarak bir bakteri hücresinin değişken konsantrasyona sahip sulu ortamlar ve toprak koşulları membran bütünlüğünü koruması için ozmotik duyarlılıklarının çok daha gelişmiş olduğunu düşündürmektedir (Bavi ve ark., 2017). Hipotonik ortam kaynaklı ani ozmotik basınç değişimi, bakterilerin hücre içerisine hızlı bir su akışının meydana gelmesi ve protoplastın şişmesine neden olmaktadır (Gordon ve ark., 2019). Şekil 2.4'te gösterildiği gibi ozmotik patlamanın önüne geçmek için MS iyon kanalları, hücre içine iyon girişini sağlayarak turgor basıncındaki değişiklikleri dengelemektedir. Bu nedenle, bakteriyel MS iyon kanalları acil durum tahliye valfleri olarak işlev yapmaktadır (Booth ve ark., 2012). Bununla birlikte, hiperozmotik stres sırasında hücrenin su kaybını engellemek için bakteri hücreleri ozmolitik maddeler biriktirmektedir. Bakterilerde bulunan ozmolitler, amino asitler ve türevleri olan glutamat, glutamin, aspartat, prolin, betainler, şeker türevi olan sükroz ve trehaloz ile polioller olarak gliserol, arabitol ve inositol 'ozmoprotektan' olarak görev yapmaktadır. Bu organik bileşikler, hücresel süreçlere müdahale etmezler ancak yüksek oranda çözünür oldukları için ozmolitik dengeyi sağlayabilmektedirler (Hoffmann ve ark., 2011). Hipotonik koşullar altında, bakteriyel MS iyon kanallarının glisin betain, glutamat ve trehaloz gibi ozmolitleri de hücre dışına bıraktığı gösterilmiştir (Hoffmann ve ark., 2008; Wenzel ve ark., 2014). Bakteri hücreleri, hücre göçü, hücre büyümesi ve hücre bölünmesi için yüksek bir hücre turgoruna sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte, Şekil 2.4'te gösterildiği gibi ozmotik basınç düştüğünde hücrenin turgor dengesini sağlayan MscS ve MscL olmak üzere iki birincil bakteriyel MS kanalı tanımlanmıştır (Bavi ve ark., 2017).



Şekil 2.4. *E. coli'*de mekanik duyarlı iyon kanalları MscS ve MscL'nin fonksiyonları. Hiperozmotik ortamda maddelerin hücre içerisine girmesini sağlarlar. Hipoozmotik koşullarda önce MscS ardından MscL hücre içi ozmolitlerin dışarı akmasına izin vererek hücresel parçalanmayı önler ve ozmotik dengeyi sağlar (sol panel). Bakteriyel MS iyon kanallarının yokluğunda ise hipoozmotik koşullarda membran gerilimindeki artış engellenemediğinden bu artış kontrolsüz kalır ve hücre parçalanmasına neden olur (sağ panel) (Blount ve ark., 1999).

İlkel proto-hücrelerdeki ozmotik dengenin bakteriyel MS iyon kanallarıyla sağlandığı düşünüldüğünden MscL ve MscS'nin ilk MS kanalları olduğu düşünülmektedir. MscL oldukça büyük bir por açıklığına sahiptir ve mikroorganizmalara özgü olduğu bilinmektedir. Türler arasında bilinen en büyük kapılı gözeneği açan MscL, çapı ~30 Å olan moleküllerin geçişini sağlamaktadır (Booth ve ark., 2012). Mikroorganizmalarda yüksek oranda korunmuş olan MscL ve çoğu patojen dahil olmak üzere gram negatif ve gram pozitif türlerin büyük çoğunluğunda bulunan bir MS iyon kanalıdır. Bununla birlikte, MscL neredeyse tamamen bakteriyel ve arkeal türlerle sınırlı gibi görünürken, MscS benzeri kanallar türler arasında daha yaygın olarak dağılmaktadır ve bitkilerde, bazı mantarlarda ve çok sayıda ökaryotik insan parazitinde, özellikle *Toxoplasma* ve *Plasmodium'*da bulunmaktadır (Pivetti ve ark., 2003).

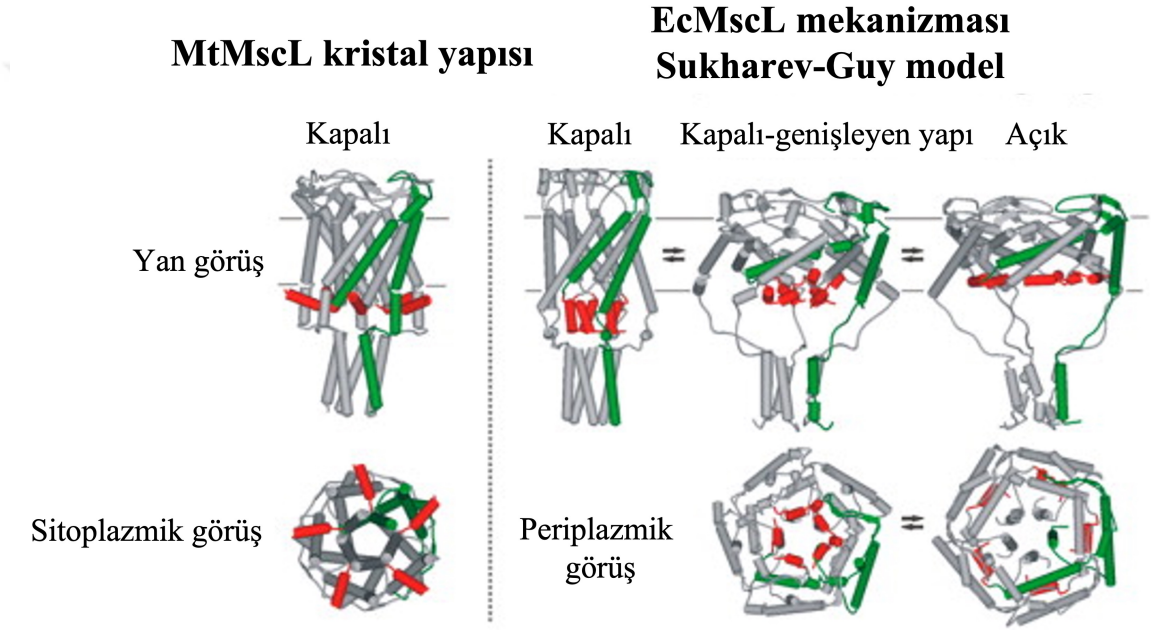
"Patch clamp" yöntemi ile *E. coli* sferoplastlarında EcMscL ve EcMscS klasik biyokimyasal yaklaşımlarla kesin olarak tanımlanmıştır. Bu önemli çalışma, membran proteinlerinin deterjan bazlı çözülmesi, proteinlerin fraksiyonlarına ayrılması, proteinin rekonstitüsyon aşaması ve her fraksiyon için "patch clamp" yapılması ile MscL ve MscS olmak üzere iki farklı kanal aktivitesinin tanımlanmasını sağlamıştır (Cox ve ark., 2014). MscL genini doğrulamak için, knockdown gen ifadesi, genin trans olarak eksprese edilmesi ve maya membranlarında heterolog olarak ekpresyonu yapılmıştır. MscL'nin, tek gen ekpresyonu ile açık/kapalı mekanizması ve por oluşturucu özelliği belirlenmiştir (Sukharev S. I. ve ark., 1994).

MscL için yaklaşık 3 nS ve MscS için 1 nS iletkenliğe sahip olduğu bilinmektedir ve çoğu ökaryotik iyon kanalından yaklaşık 2 kat daha fazla iletken olduğu gösterilmiştir (Cox ve ark., 2014). MscL ve MscS'yi kodlayan genler ve ileri genomik çalışmalar ile MscS'nin mutant yapıları ve altı MscS homoloğu keşfedilmiştir. MscS süper ailesinin yapı ve işlev bakımından çok çeşitli olduğu bilinmektedir. Bu ailen üyelerinin sekans dizileri, boyutları ve topolojileri oldukça çeşitlilik göstermektedir. MscS benzeri olan ve alt ailesi olarak tanımlanmış yeni bir iyon kanalı olarak mini iletkenlikli MS iyon kanalı (MscM) belirlenmiştir. Bu nedenle, bakteriyel MS iyon kanalı sınıflandırılması MscL, MscS ve düşük iletkenliğe sahip MscM ile üç gruba ayrılmıştır (Sukharev S. I. ve ark., 1994).

EcMscL

MscL ilk kez *E. coli*'de keşfedilmiştir ve bugüne kadar türler arasında en iyi anlaşılan MS iyon kanalıdır (Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022). MscL, iki yüksek hidrofobik bölgeye sahiptir ve her bir subünitesi 136 amino asitten meydana gelmektedir. MscS ile karşılaştırıldığında, MscL ailesi yapı ve fonksiyon açısından türler arasında oldukça korunmuştur. 15 kDa ağırlığında olan EcMscL, gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerde yüksek oranda korunmuştur. MscL homologları bulunmaktadır. MscL'nin, *E. coli*'de ozmoregülasyonda rolü olduğu için çoğu bakteri türleri arasında korunduğu düşünülmektedir. *E. coli'*de heterolog olarak eksprese edilen diğer türlerdeki bazı homologlarının açılıp kapanma mekanizması için farklı kinetiklere sahip olduğu bilinmektedir (Sukharev S. I. ve ark., 1994; Chang ve ark., 1998). Homopentamerik kompleks olan MscL yaklaşık 30 Å çapında bir por oluşturabildiği bilinmektedir. EcMscL yaklaşık olarak 3 nS mekanik duyarlı iletkenliğe sahip olup, iyon geçirgenliği açısından seçici bir kanal değildir. MscL çift tabakası yüksek membran geriliminde açılmaktadır (Sukharev S. I. ve ark., 1994). Mycobacterium tuberculosis'e ait bir MscL (TbMscL) homoloğu olan TbMscL, EcMscL'ninkinden daha büyük bir gerilimle açılma eşiğine sahiptir. Bu farklı işlevsel özelliklerin, farklı lipid ortamlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Perozo ve ark., 2003). Bununla birlikte, *E. coli*'de MscL geni, hipoozmotik şok koşulları altında büyüme ve hayatta kalma için gerekli olmadığı düşünülmektedir. MscL aktivitesinin, diğer mekanik duyarlı kanallar tarafından telafi edilebileceği gösterilmiştir (Sukharev S. I. ve ark., 1994). Farklı türler üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde, hipoozmotik şoktan çıkmak için MscS ailesinin daha aktif olduğu düşünülmektedir. Ancak, MscL'nin genellikle tüm organizmalarda bir ozmotik acil durum tahliye valfi olarak MscS ve benzeri MS iyon kanalları ile ortak bir işlevsel fonksiyonu olduğu düşünülmektedir (Wahome ve ark., 2006). Bu nedenle, MscL genellikle deniz organizmalarında (Booth ve ark., 2015) ve bitkilerde (Haswell, 2007) bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda, iki bakteriyel ve yalnızca biri arkeal organizma olmak üzere üç MscL yapısı, X-ışını kristalografisi ile çözülmüştür. İlk yapı olarak MscL, 3.5 Å çözünürlükte kapalı bir konformasyonda çözdürülmüştür (Chang ve ark., 1998). İlk kristal MscL yapısı olan TbMscL, *E. coli*'de (Moe ve ark., 2000) heterolog olarak eksprese edildiğinde fizyolojik aralıklarda işlevsiz olduğu görülmüştür.

TbMscL monomerinin, iki α-sarmal TM domaininden, TM1 ve TM2'den, sitoplazmik N ve C terminal alanlarından ve bir merkezi periplazmik alandan oluştuğu belirlenmiştir. Birçok bakteri türünde üretilmeyen fakat Mycobacterium tuberculosis'de bulunan lipid olarak fosfatidilinositolün TbMscL ile normal mekanik uyarımlarda iyon geçişlerinin olduğu belirlenmiştir (Zhong ve ark., 2013). TbMscL, bir TM alanı ve bir homopentamerik komplekse birleştirilmiş bir sitoplazmik alandan meydana gelmektedir. TbMscL kanalının her bir alt birimin iki TM alan içerdiği bir homopentamer olduğu gösterilmiştir; N ve C terminal bölgelerinin sitoplazmik olduğu belirlenmiştir (Dunn ve ark., 2016).



Şekil 2.5. *M. tuberculosis* (sol) ve *E. coli'*ye ait MscL (sağ) yapısal modelleri. MscL'nin *M. tuberculosis* ve *E. coli* için N-terminal bölgesi kırmızı ile gösterilmiştir. Tek bir alt birim ise yeşil ile gösterilmiştir. *M. tuberculosis* için kapalı formda yan (sol üst panel) ve üstten sitoplazmik görünüm modellenmiştir (Sol alt panel). *E. coli* MscL için önerilen Sukharev-Guy (SG) modelinden kapalı, kapalı-genişletilmiş ve açık durumlar gösterilmektedir (sağ üst panel). Yandan periplazmik görünüm (sağ alt panel) modellenmiştir (Iscla ve ark., 2008).

TbMscL için yayınlanan ilk yapıda N-terminal bölgesi henüz çözülmemiş bir kristal yapıdır. C terminalinde kısa bir α-sarmalı, por altında sitoplazmaya ulaşan bir demet oluştuğu görülmektedir (Chang ve ark., 1998). Delesyon deneyleri, sitoplazmik demetin kanal aktivitesi için gerekli olmadığını göstermiştir (Perozo ve ark., 2003). Disülfit trapping MD çalışmaları ile EcMscL için Şekil 2.5'te gösterildiği gibi ayrıntılı bir model

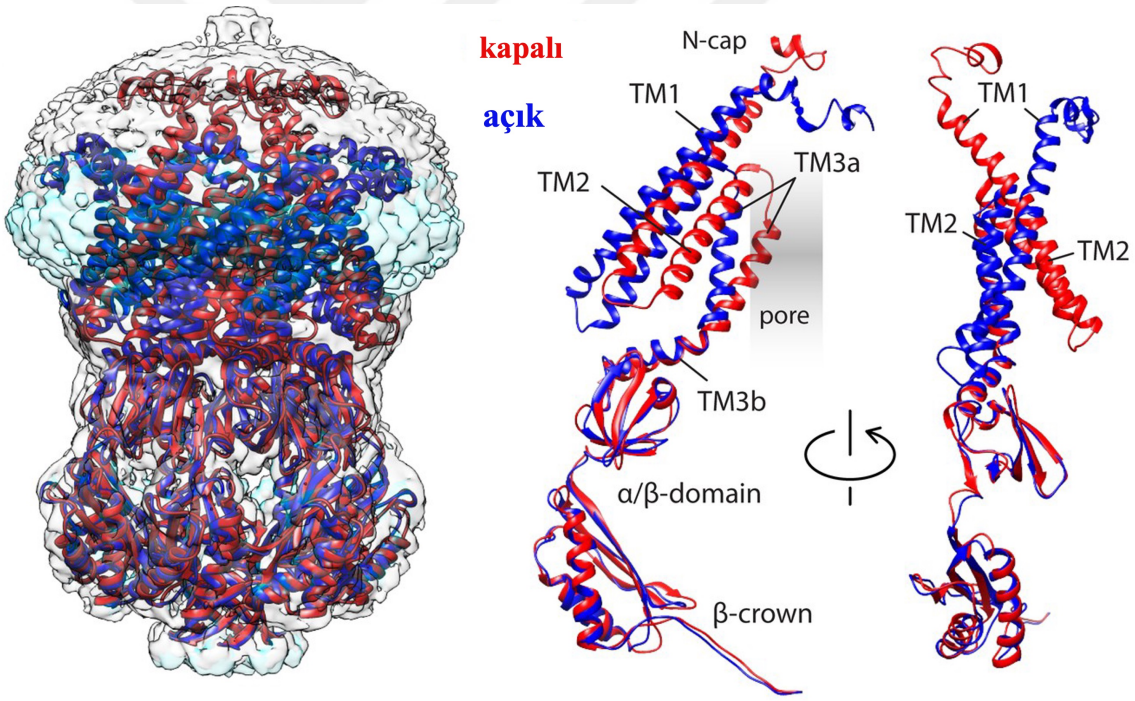
olarak Sukharev-Guy modeli önerilmiştir. Bu modelde, kanal kapalı durumdayken ikinci bir kapı yapısı gibi görülen demet sarmal yapısı oluşturduğu önerilmiştir. EcMscL kapalı konumdan açık konuma geçerken genişleyen kanalın büyük bir kısmı tamamlana kadar işlev yaptığı gösterilmiştir (Sukharev S. ve ark., 2001a; Sukharev S. ve ark., 2001b).

EcMscL sitoplazmik domaini (EcMscL-CTD) için en iyi yapı 108-136 kalıntıdan oluşan 1.45 Å çözünürlüğe sahip X-ışını kristalografisi yöntemi ile elde edilmiştir. Bugüne kadar işlevsel olarak en iyi karakterize edilmiş MscL homoloğu olan EcMscL, 29 rezidü alanı pentamerik α-helikal (Thr116-Ser136) ile düzensiz ve daha geniş bir bölge (Glu108-Pro115) olarak iki yapısal alana ayrılmıştır. Belirlenen yapıdaki coil-coil yapısının ve TM2 ile helikal yapının MtMscL'ye benzerliği olduğu düşünülmektedir (Walton ve ark., 2013).

EcMscS

EcMscS 31 kDa ağırlığında ve her bir alt birimi 286 amino asitten oluşan homoheptamerik yapıda bir integral membran proteinidir. EcMscL ile benzer fonksiyonlara sahip olan EcMscS yapısal olarak çok farklı özelliklere sahiptir. MscS'nin bir homoheptamer yapıda olması, TM ile sitozolik alan olarak ikiye ayrılması ve üç TM'ye sahip olmasıyla farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, membrandaki lipid moleküllerinin çeşitliliği ve dağılımı, MscS'nin konformasyonel durumlarının değiştirilmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. EcMscS için ilk kristal yapı 3.9 Å çözünürlükte kapalı konformasyon durumundayken elde edilmiştir (Bass ve ark., 2002). EcMscS, EcMscL iyon kanalından daha düşük membran gerilimlerinde ~13 Å çapında bir por oluştururak açılmaktadır (Wang W. ve ark., 2008). Şekil 2.6'da gösterildiği gibi, X-ışını kristalografisi ve KriyoEM metotlarıyla elde edilen EcMscS yapıları, TM1, TM2 ve TM3 olmak üzere üç tane TM alandan meydana geldiğini göstermektedir (Pliotas ve ark., 2015; Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022). EcMscS'nin N terminali periplazmaya bakacak şekilde TM1 (29-57), TM2 (68-91), TM3 (96-127) üç helikal alandan oluşmaktadır (Bass ve ark., 2002; Wang W. ve ark., 2008). TM1 ve TM2 helezonları, çift tabakada meydana gelen gerginliği algılayan, rijit bir gövde olarak hareket ettiği öngörülen bir heliks çifti oluşturmaktadır. TM1 ve TM2 heliksleri, her bir alt üniteleri için "sensör pedalı" olarak adlandırılan ana hatları içermektedir ve saç tokası denilen 'hairpin' yapısına

benzemektedir. TM1-TM2 yapısı hem TM3a'ya hem de membran düzlemine göre eğimi değiştiğinden açık-kapalı pozisyonlarında açısal veriler alınmaktadır (Pliotas ve ark., 2015; Zhang Y. ve ark., 2021). TM3a yedi protomeri içeren üçüncü merkezi bir por oluşturmaktadır. Por kaplama heliksi olan TM3a, MscS süper ailesi içinde yüksek oranda korunduğu bilinmektedir (Pivetti ve ark., 2003). TM3b ise; G113 rezidüsündeki bir bükülme ile sitozolik tarafta dışa doğru uzanan ve bir vestibülü çevreleyerek sitozolik alana yayılmış büyük bir fener şeklinde yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Bu kısmın, β-tabaka (sheet) ile α-heliks ve β-tabaka (sheet) (αβ-domain) olmak üzere yan alanlara sahip olduğu gösterilmiştir. C-terminalinde, kanal için bir başka alan olan β-barrel bulunduğu gösterilmiştir. TM3a hem dar hem de hidrofobik rezidüler içerdiğinden suyun ya da çözünen maddelerin geçmesi muhtemel değildir. Dolayısıyla iyonlar ve diğer çözünen maddeler, β ve αβ bölgeleri arasındaki yan alanları kullanarak TM porundan geçebilmektedirler.



Şekil 2.6. MscS'nin transmembran alanları. (A) Solda, MscS'nin PC14:1 lipid nanodisklerindeki (mavi alanlar) açık yapısını göstermektedir. PC18:1 nanodisklerinde (PDB ID 6PWN ve EMD-20508) belirlenen kapalı durum (kırmızı alan) iç içe geçirilerek gösterilmiştir. Bununla birlikte, KriyoEM yoğunluk haritaları (sırasıyla şeffaf mavi ve gri yüzeyler) gösterilmiştir (Park ve ark., 2023).

TM3a helezonlarının kapalı durumdan açık duruma geçişi için bir por yapısı oluşturmak üzere TM1-2 heliks çiftinin yapısal değişikler meydana getirdiği düşünülmektedir (Bass ve ark., 2002; Anishkin Andriy ve ark., 2004). Sitozolik alan ve sitozolik alanla ilişkili özellikle TM3b gibi alanların kanal açık pozisyona geçerken değişmediği bilinmektedir. Bu durum kanalın açık pozisyondayken homoheptamerik yapının korunarak, TM3b gibi daha stabil kalan yapıların istenmeyen iyon, su vs. sızıntılarını önlediği düşünülmektedir (Bass ve ark., 2002; Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022).

Kanalın açık-kapalı-geçişinin, üç TM sarmalının iris benzeri hareketiyle etkinleştirildiği öne sürülmüştür (Wang W. ve ark., 2008). Bununla birlikte, MscS çalışmaları sadece *E. coli*'de yapılan EcMscS proteini ile kısıtlı değildir. *E. coli* genomuna ait MscS proteini olan 286 amino aasitten meydana gelen EcMscS'nin yanı sıra 1120 amino asitle MscK, 415 amino asitle YbdG, 343 amino asitle YnaI, 741 amino asit YbiO ve 1107 amino asit YjeP olmak üzere altı tip MscS homoloğu bulunmaktadır (Levina ve ark., 1999). *E.coli* çalışmaları, EcMscS'nin yanısıra homologları ile ilgili X-ışını kristalografi, KriyoEM ve diğer biyokimyasal çalışmalar devam etmektedir (Levina ve ark., 1999; Anishkin Andriy ve ark., 2004; Wang W. ve ark., 2008; Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022).

2.7. EcMscS İyon Kanalına Multidisipliner Yaklaşımlar

2.7.1. Tek Partikül Kriyo Elektron Mikroskobu (KriyoEM) Çalışmaları

Kapalı Konformasyon

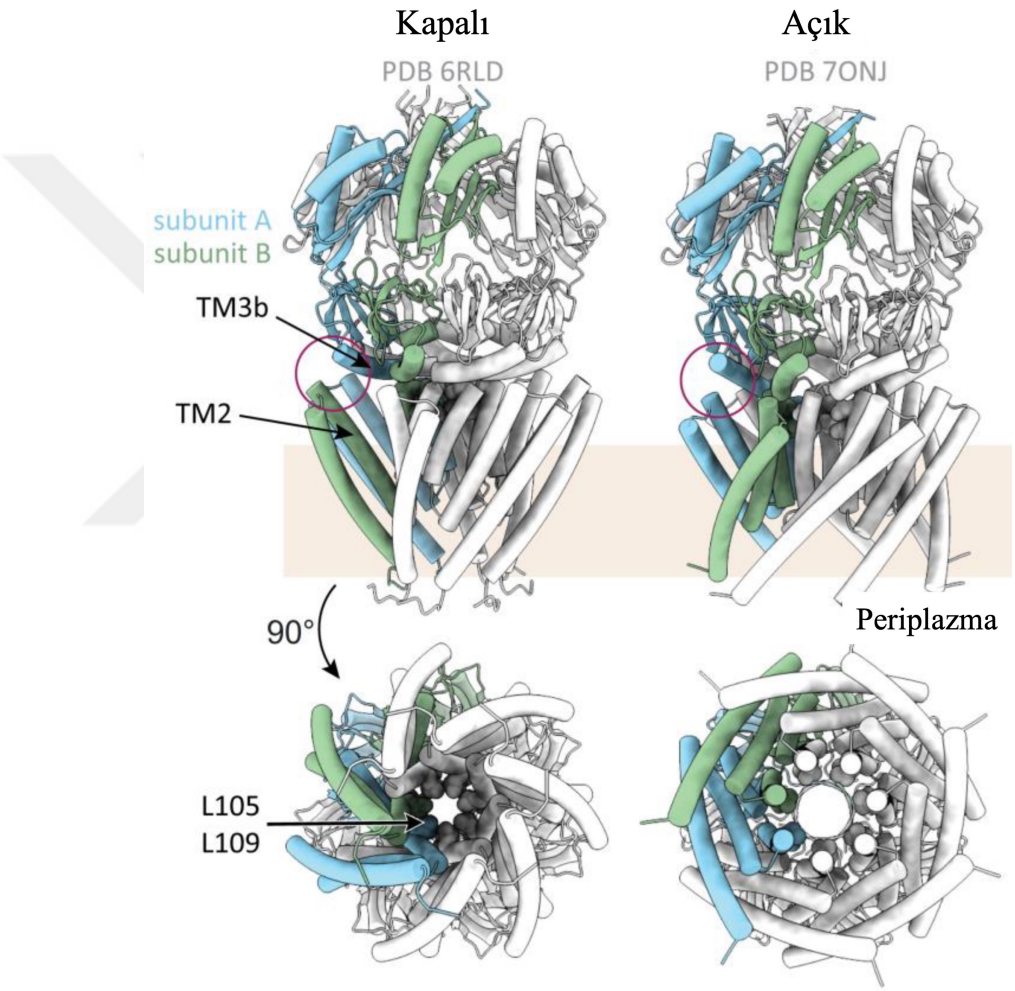
EcMscS'nin ilk kapalı konformasyonu, X-ışını kristalografi yöntemi ile 3.7 Å çözünürlükte elde edilmiştir. Vahşi tip EcMscS proteini deterjan fos-kolin-14 içinde çözdürülmüştür. Bu yapıda, EcMscS'nin giriş kısmı olarak bilinen alanı ~ 40 Å çapında bir odayı çevrelediği ve bir β domaini, bir αβ domaini ve bir C-terminalinden oluştuğu ilk kez gösterilmiştir (Bass ve ark., 2002). X-ışını çalışmaları ile EcMscS'nin vestibülü meydana getiren sitozolik alanı ve TM domainleri 3.9 Å çözünürlükte tanımlanmaya çalışılmıştır. Sitozolik girişin TM alana TM3 heliks aracılığıyla bağlandığı belirlenmiştir. Yedi alt birim G113'teki kıvrımlarla membran düzlemine parelel bir konumda bulunduğu ve por oluşturucu TM3a ve amfipatik TM3b'ye ayrıldığı gözlenmektedir. Bu çalışmalarda, TM domaininin membran çift tabakasına gömüldüğü düşünülmektedir (Bass ve ark., 2002; Steinbacher ve ark., 2007). Bununla birlikte, EcMscS'nin N-

terminalinde yaklaşık 20 rezidü tam anlamıyla çözdürülememiştir (Sotomayor ve ark., 2004; Sotomayor ve ark., 2006). EcMscS'nin KriyoEM çalışmaları, TM domainin sadece periplazmik alanının yarısının membrana gömüldüğünü ve porların büyük kısmının sitozolik tarafta membrandan çıkıntı yaptığını göstermiştir (Bass ve ark., 2002; Reddy ve ark., 2019). İyon geçen kısmın en dar bölge olduğu ve konumu TM3a'nın L105 amino asidi olarak belirlenmiştir (Anishkin A ve ark., 2010). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada KriyoEM yöntemi ile 2.9 Å çözünürlükte EcMscS lipid etkileşimleri gösterilmiştir. Bu çözünürlükte, EcMscS'nin membran disklerine gömülü olduğu belirlenmiştir. Membranın yalnızca MscS'nin sensör kanatlarının parçalarına bağlandığı tespit edilmiştir. Oldukça zor çözdürülmüş olan (Bass ve ark., 2002) N-terminalinin periplazmik membran yüzeyi ile etkileşime girdiği görülmüştür (Rasmussen ve ark., 2019). Şekil 2.7'de MscS'nin kapalı konformasyonunda gösterilen porun iki lösin kalıntısı L105 ve L109'dan oluşan hidrofobik sızdırmazlık halkası belirtilmiştir. MscS açıldıktan sonra sensör kanatçıkları membran düzlemindeki eğimlerini artırdığı ve por sarmalı TM3a'nın dışarı doğru kaydığı belirlenmiştir (Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022).

Açık Konformasyon

EcMscS açık konformasyonu ilk kez A106V nokta mutasyonu ile 3.45 Å çözünürlükte elde edilmiştir. Mutant tip EcMscS proteini deterjan fos-kolin-14 içinde çözdürülmüştür. TM1 ve TM2 heliksleri, saat yönünde yaklaşık 45° açı yaparak rijit bir yapıyla keskin bir şekilde dönerek yapı eğimini ~15° artırdığı hesaplanmıştır. TM3a helikslerinin G113 rezidüsünden kanalın merkez eksenine doğru dışarı çıktığı belirlenmiştir. TM3a'nın G113 etrafındaki dönüşüyle kapalı pozisyonda sızdırmaz rezidü oluşturduğu bilinmektedir (Bass ve ark., 2002). Sızdırmaz rezidüler olarak bilinen TM3a'da konumlanan L105 ve L109 por ekseninden çekilerek kanalı açık hale getirmektedir. Bununla birlikte, EcMscS heptamerik yapıdaki tüm TM3a sarmalları membrana paralel konumda olduğu ve diyagonal olarak düzenli bir konumda sıralandıkları görülmüştür. EcMscS'nin açılma mekanizmasında TM3 sarmallarının oldukça önemli olduğu ve açılma mekanizmasının irise benzer şekilde olduğu belirlenmiştir (Wang W. ve ark., 2008). MscS konformasyonu için protein expresyonu, pürifikasyonu ve rekonstitüsyonu prosedürlerinde kullanılan deterjan, kristalizasyon koşulları ve protein sekansındaki değişikliklerin önemli olduğu

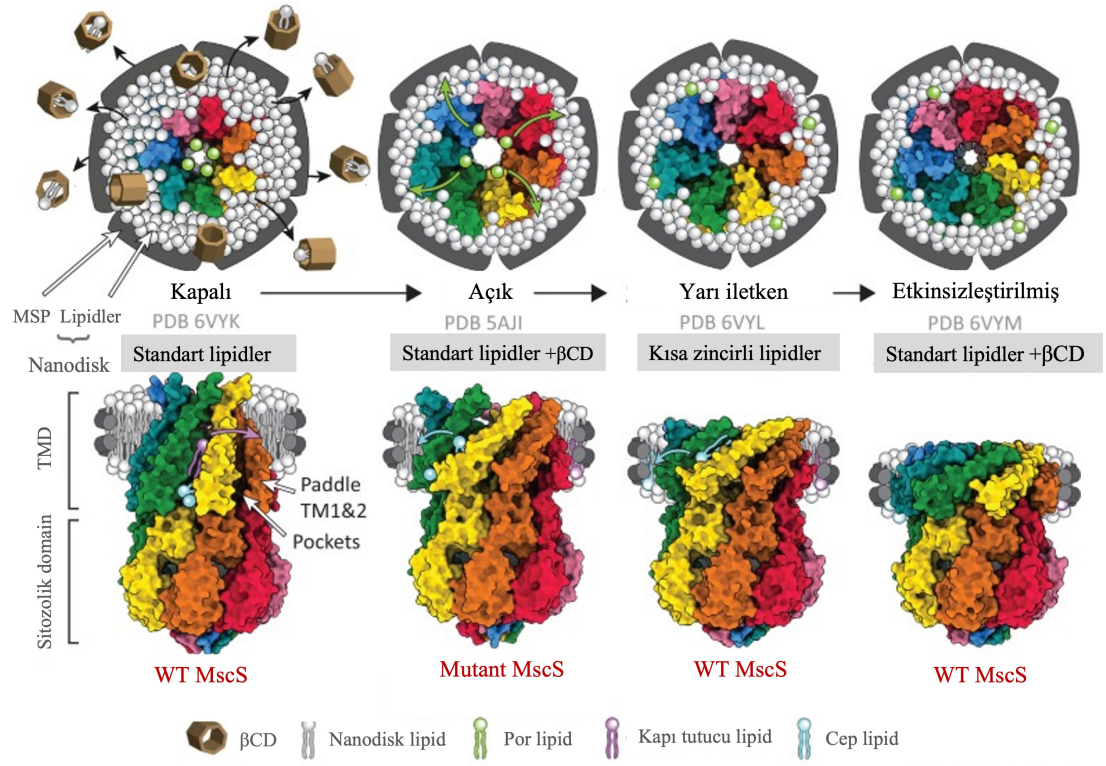
bilinmektedir ve bu alandaki çalışmalar devam etmektedir. Deterjan olarak β-dodesilmaltosid (DDM) kullanılarak elde edilen vahşi tip EcMscS proteininin açık konformasyonel yapı gösterdiği belirlenmiştir. Vahşi tip EcMscS'nin DDM'de çözdürülerek elde edilen protein yapısının 4.44 Å çözünürlükte açık bir konformasyon göstermiştir (Lai ve ark., 2013). Bununla birlikte, EcMscS'nin açık konformasyonlarının delipidasyonu ile elde edilebileceği ve lipidlerin tekrar eklenmesi durumunda kanalın tekrar kapalı konuma geçebileceği paradigması doğrulandığı düşünülmektedir (Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022).



Şekil 2.7. MscS'nin kapalı ve açık konformasyonel yapıları. Yapısal düzeyde MscS'nin iki farklı konformasyonel durumu gösterilmiştir; kapalı durum (sol; PDB 6RLD (Rasmussen ve ark., 2019)) ve açık durum (sağ; PDB 7ONJ (Flegler Vanessa Judith ve ark., 2021a)). Membran açık kahverengi dikdörtgenle gösterilmiştir. İki yapı, yandan (üst panel) veya periplazmik taraftan (alt panel) por ekseni boyunca bakıldığında, bir alt birim yeşil ve bir mavi ile aynı yönde gösterilmiştir. Porun iki lösin kalıntısı L105 ve L109'dan oluşan hidrofobik sızdırmazlık halkası top şeklinde gösterilmiştir. Açıldıktan sonra sensör kanatçıkları membran düzlemindeki eğimlerini artırmakta ve por sarmalı TM3a dışarı doğru kaymaktadır (Flegler Vanessa Judith ve ark., 2022).

Yarı İletken ve Duyarsızlaştırılmış Konformasyonlar

EcMscS'nin açık ve kapalı konformasyonları dışında elektrofizyolojik deneylerle desteklenen ve 'adaptasyon' olarak adlandırılan konformasyonel durumları önerilmiştir. Bu süreçler, Şekil 2.8'de gösterildiği gibi duyarsızlaştırma ve etkisizleştirme olarak tanımlanmıştır (Levina ve ark., 1999). Duyarsız hale getirilen kanalların daha büyük bir basınç ile uyarılarak açılabileceği düşünülmektedir (Akitake ve ark., 2007). Etkisizleştirilmiş kanalların bir basınç olmadığında birkaç dakikalık dinlenme süresinden sonra tekrar etkin hale getirilebileceği öne sürülmüştür (Koprowski P ve ark., 1998). EcMscS'nin membrandaki lipid komposizyonlarının ve çeşitlerinin kanalın açık/kapalı/subkonduktif/etkinsizleştirilmiş konformasyonlarını etkilediği belirlenmiştir. EcMscS kanalı, kısa zincirli bir lipid olan didekanoil fosfotidilkolin (PC-10) kullanılarak nanodisk haline getirilmiştir. EcMscS, 3.4 Å çözünürlükte KriyoEM yöntemi ile görüntülendiğinde TM1-TM2 eğiminin 56° olduğu belirlenmiştir. Bu eğim kapalı (32°) ve açık (50°) konformasyonları ile uyumlu olmadığında PC-10 ile rekonsititüsyon edilen EcMscS konformasyonel yapısı subkonduktif 'alt/yarı iletken' olarak tanımlanmıştır (Zhang Y. ve ark., 2021). Bununla birlikte, por çapı ölçümleri yapıldığında kanalın kapalı (5 Å) ve açık (14 Å) konformasyonlarından farklı olarak 10 Å hesaplanmıştır. EcMscS'nin açılması için membran gerilimini artırması gerekmektedir. Bu çalışmada çift tabakalı membranda gerilim için β-CD kullanılmıştır. Bununla birlikte, β-CD membranda kalan nanodisk yapıdan lipidlerin çıkarılmasını (delipidasyon) sağlamaktadır. TM1'in membran normaline eğim açısı 67°'ye arttığı gösterilmiştir. Bu durum, ilişkili lipidlerin tükenmesiyle bağlantılıdır (Levina ve ark., 1999). Delipidasyon için nanodiskler ile β-CD bir araya gelerek mekanosensasyon sırasında EcMscS'nin açık/kapalı konformasyonları membran gerilimini taklit etmek için yeni bir yaklaşım sağladığı düşünülmektedir (Levina ve ark., 1999; Flegler Vanessa J ve ark., 2021b).

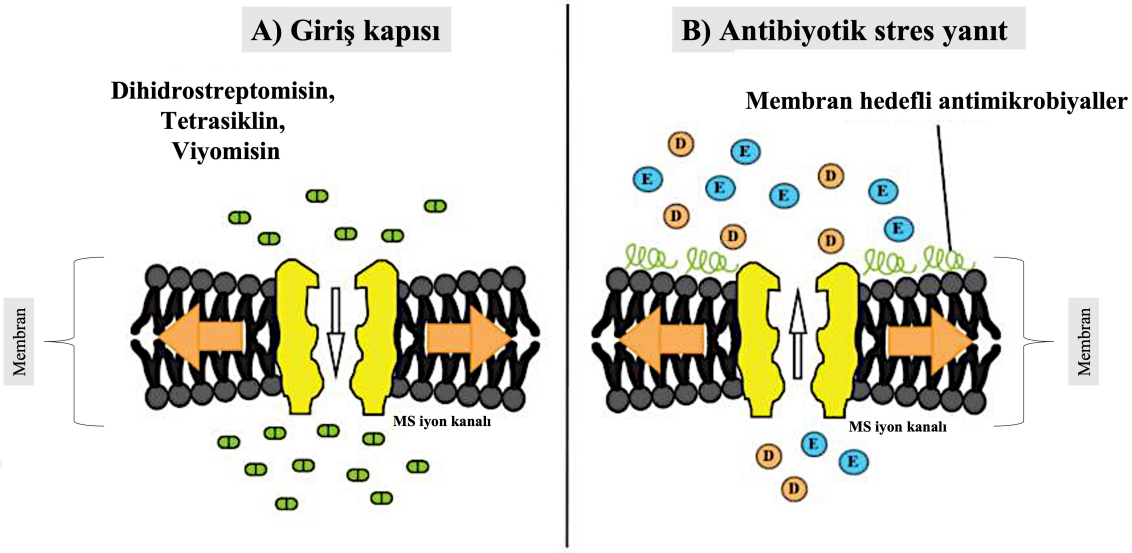


Şekil 2.8. Nanodiske gömülü EcMscS'nin lipid yapıları ve konformasyonel değişimlerinin incelenmesi Nanodisklere gömülü EcMscS'nin yedi monomeri farklı renkler kullanılarak açık/kapalı ve adaptasyon konformasyonları ile gösterilmiştir. Nanodiskler, nanodiskin boyutunu belirleyen membran yapı iskeleti proteinlerinden (MSP (Membrane Scaffold Proteini), koyu gri) ve lipidlerden (beyaz) oluşmaktadır. TM domaini simetri ekseni boyunca (üstte) ve tüm kanal yandan (altta) gösterilmiştir. MscS yapıları vahşi tip (kapalı, yarı iletken ve etkinsizleştirilmiş yapı) ve mutant tip (açık yapı) olarak verilmiştir. Kapalı durumda, por lipidleri (üstte, açık yeşil) iyon iletimini engellemektedir. Kapı tutucu (altta, mor) ve cep lipidleri (altta, açık mavi), kürekler arasındaki oluklarda bulunmaktadır. Membran gerilimi ile tutucu lipidleri yapıdan ilk ayrılan lipidler olarak bilinmektedir. Por lipidleri açık durumda por çevresine hareket etmektedir. Gerilimin devam ettiği durumlarda, por lipidleri dışarı çıkmaktadır. Yarı iletkenlik ve etkinsizleştirilmiş duruma gelmektedirler. Açık (mutant MscS) ve etkinsizleştirilmiş (vahşi tip) konformasyonlar, β-siklodekstrin (β-CD, kahverengi silindirler) eklenerek elde edilmiştir. Yarı iletkenlik konformasyonu için, kısa zincirli lipidler içeren nanodisklerde gözlenmiştir (Flegler Vanessa J ve ark., 2021b).

2.7.2. Antibakteriyel İlaç Hedefi Olarak EcMscS

EcMscS iyon kanalının geçitleme mekanizması ve madde geçirgenliğinde homoheptamer yapının yapısal değişkenliği oldukça önemlidir. EcMscS iyon seçiciliği için herhangi bir por kalıntısının dahil olmadığı belirlenmiştir (Zhang X. ve ark., 2012). Bununla birlikte, zayıf anyon seçiciliğinin olduğu "patch clamp" tekniği ile gösterilmiştir (Wang W. ve ark., 2008). EcMscS'nin anyon seçiciliğinin kanaldan geçen katyonlarla etkileşime giren portalların yakınındaki negatif yüklü kalıntılarla bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Cox ve ark., 2013). EcMscS'nin yapısı, geçiş mekanizmaları ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmıştır (Kung ve ark., 2010; Booth ve ark., 2012; Zhang Y. ve ark., 2021). Bununla

birlikte, EcMscS ile hücre içerisine geçen maddeler için seçicilik hakkında yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (Iscla ve ark., 2014; Wray ve ark., 2016; Wray ve ark., 2021).



Şekil 2.9. MS iyon kanallarının antibakteriyel ilaç hedefi olarak potansiyeli. (A) Antimikrobiyallerin bakteri hücrelerine giriş kapısı olarak MS iyon kanalları. Membran gerildiğinde (turuncu oklar), MS iyon kanalları açılmaktadır ve aminoglikozidler dihidrostreptomisin, spektinomisin, kanamisin ve ayrıca tetrasiklin, viyomisin ve nifuroksazid gibi bazı antibiyotik moleküllerinin alınmasına aracılık ettiği belirlenmiştir (Eyckmans ve ark., 2011; Kolewe ve ark., 2015). (B) Antibiyotik stres yanıtının bir parçası olarak MS iyon kanalları. MP196, nisin, gramisidinler ve aureinler gibi membran aktif antimikrobiyal maddelerle antibakteriyel tedavinin sağlanması ve membran gerilmesini taklit eden bu maddelerin ozmoprotektif amino asitlerin (E = glutamat, D = aspartat) salınımını tetikleyerek ozmotik membran stabilizasyonu ve azalmış antibiyotik duyarlılığına katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Sidarta ve ark., 2022).

Birçok organizmada ve MS iyon kanallarında çeşitli antibiyotiklerin etkinliklerini değiştirdiklerine dair çalışmalar yapılmıştır. EcMscS ve EcMscL'nin antibiyotiklere karşı farklı duyarlılıkları olduğu saptanmıştır. Antibiyotiklerin hücre içine alınmasının EcMscL ve EcMscS'ye özgü olup olmadığının belirlenebilmesi için mutant hücre hatları kullanılmıştır. Sadece EcMscL ve/veya EcMscS iyon kanalına sahip *E. coli* hücrelerde dihidrostreptomisin, spektinomisin, viyomisin ve nifuroksazid antibiyotiklerinde hücre canlılığı testleri yapılmıştır. Dihidrostreptomisin, spektinomisin ve nifuroksazidin EcMscL bakteri büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir. EcMscS'ye özgü suşta viyomisin antibiyotiği hücre canlılığı inhibisyonunu anlamlı derecede azaltmıştır, ancak EcMscL üzerinde bir etkisi görülmememiştir (Iscla ve ark., 2014). Sonuç olarak, *E. coli* hücrelerinde dihidrostreptomisin, spektinomisin ve nifuroksazid antibiyotikleri EcMscL'ye, viyomisinin ise EcMscS'ye özgü bakteri büyümesini engellediği

belirlenmiştir. EcMscL'ye uygulanan dihidrostreptomisin antibiyotiğinin belirli bir bölgeye doğrudan bağlandığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, Moleküler Dinamik (MD) simülasyon çalışmaları ile dihidrostreptomisinin hücre sitoplazmasına geçebilmesi için kanalda konformasyonel değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, dihidrostreptomisin-duyarlı ve dihidrostreptomisin-dirençli hücrelerle kıyaslandığında düşük konsantrasyonlu dihidrostreptomisin uygulamaları, EcMscL bakterilerde büyüme geriliği oluştururken, mutant MscL (ΔMscL)'ye ait *E. coli* hücrelerinde büyüme geriliği oluşturmadığı belirlenmiştir.

EcMscL'nin glutamat ve potasyumu hücre dışına bıraktığı belirlenmiştir. Ozmoprotektan olan bu maddelerin hücre dışına verilmesinin, antimikrobiyal duyarlılık için fonksiyonel bir özellik olabileceği vurgulanmıştır (Iscla ve ark., 2014; Wray ve ark., 2016). Bu sebeple, bakteri hücrelerinde antibiyotik duyarlılıkları için EcMscS'nin ve EcMscL'nin seçici özelliklerinden yararlanılabileceği düşünülmektedir (Iscla ve ark., 2014; Sidarta ve ark., 2022). EcMscL ve EcMscS'de yapılan diğer bir çalışmada, antibiyotiklerin transkripsiyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu hücrelerde, ampisilin transkripsiyonu indüklemiştir, ancak norfloksasin, gentamisin ve ofloksasinde bu etki gözlenmemiştir. Farklı ampisilin konsantrasyonlarıyla muamele edilen MscS'nin aşırı ekspresyon gösterdiği ve hücreleri amfisiline karşı koruduğu gözlemlenmiştir. Fakat, antibiyotik uygulamasının EcMscS sitoplazmik alanındaki mutasyon oluşturduğu belirlenmiştir (Koprowski Piotr ve ark., 2015).

2.7.3. Moleküler Dinamik Simülasyon Çalışmaları

EcMscS'nin MD simülasyon çalışmalarda lipid çift tabakaya gömüldüğünde kararsız bir yapıya benzediği ve porun asimetrik bir şekilde çöktüğü gösterilmiştir (Sotomayor ve ark., 2004). Kapalı konformasyon durumunda EcMscS'nin X-ışını kristal yapısında belirlenen giriş kısmının sitozole bağlandığı (Bass ve ark., 2002) MD simülasyonlar ile doğrulanmıştır. Fakat, bu giriş kısmının türe bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Sotomayor ve ark., 2006). EcMscS girişinin lateral portallar olduğu önerisi doğrulanmıştır (Zhang X. ve ark., 2012). MD simülasyon çalışmaları, EcMscS por yapısının tam anlamıyla hidrofobik olduğunu göstermiştir. L105 ve L109'dan sızdırmaz halka rezidülerinin kanalı kapalı tutan bir "buhar kilidi" oluşturduğu birçok çalışmada

gösterilmiştir (Anishkin Andriy ve ark., 2004; Anishkin A ve ark., 2010). KriyoEM ve MD çalışmaları, EcMscS'nin konformasyonel durumlarını lipid moleküllerinin çeşitliliğiyle değiştirdiğini göstermiştir. MD simülasyon çalışmaları, TM3 ve TM1/TM2 arasında bulunan boşluğun kanal geçişi üzerinde önemli bir rolü olduğu belirlenmesinde yardımcı olmuştur. Hücre membranında artan gerilimle birlikte açılan EcMscS'nin açık konformasyon durumundayken ceplerde daha az sayıda lipid olduğu savunulmuştur. EcMscS'nin açıldıktan sonra lipid sayısının azaldığı belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak, membrandaki gerilim sırasında lipidlerin hareketinin kanalın açılmasını tetiklediği ve lipidler arasında bir değiş tokuş olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, EcMscS lokal pozisyonunun kapalı veya açık durumda lokal membran eğriliği yaptığı gösterilmiştir, fakat açık konformasyonda kapalı konformasyona göre membran eğriliğinin daha küçük olduğu belirlenmiştir. EcMscS'ye ait bu lokal membran eğriliğinin MscS geçitlemesinde herhangi bir katkısı olup olmadığı ise henüz saptanamamıştır (Pliotas ve ark., 2015). Bununla birlikte, kapalı-açık durumlarının yanı sıra yarı iletken ve etkinsizleştirilmiş EcMscS konformasyonlarında farklı lipid türlerinin etkili olduğu ve sonrasında cep lipidlerinin ayrılmasına sebep olduğu gösterilmiştir. EcMscS açıldıktan sonra lipidler por çevresine doğru hareket etmektedir (Zhang Y. ve ark., 2021). MD simülasyon çalışmaları, EcMscS por lipidlerinin poru stabil bir şekilde kapatmak için iyonların da önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (Reddy ve ark., 2019; Zhang Y. ve ark., 2021).

EcMscS ve diğer organizmalarda bulunan MS iyon kanalları düşünüldüğünde, farklı tipte ve sayıdaki lipid kompozisyonlarının çoklu zaman ve uzunluk birimleriyle gerçekleştirilen MD simülasyonların yürütülmesinin oldukça zorlaştırdığı bilinmektedir. MD simülasyon çalışmalarında, konformasyonel değişimleri membranda ve ilgili proteinde değerlendirmenin kantitatif düzeyde belirlemenin çok kompleks olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, MD simülasyon çalışmalarında yapılan atomistik değerlendirmelerin de belirli bir kapasitesi olduğundan bu lipid etkileşimlerinin ve değişimlerinin değerlendirilmesi standardize bir düzeyde olmadığı için deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerektiği savunulmaktadır (Zhu ve ark., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Canlılığı Testleri

3.1.1. Escherichia coli Suşlarının Hazırlanması

Hücre canlılığı testleri için *E.coli* suşu olarak Frag1 (F−, rha, gal, thi, lac) (Epstein ve ark., 1971) ve MJF612 (Frag1ΔmscL::cm,ΔmscS,ΔmscK::kan,ΔybdG::apr) suşları kullanıldı. Kullanılan tüm suşlar *E. coli* K12 türevleridir. Frag1, MJF612'deki 4 delesyon için tercih edilen parental suştur. Mutant suş olarak MJ612'nin 168 konumundaki glisinin alanine değiştirilmiş bir pB10b plazmidi olan pB10d vektöründen eksprese edildi (Iscla ve ark., 2008). Bu plazmid, lac UV5 ve lacIq promotörleri ile indüklenebilir. IPTG (İzopropil β-d-1-tiogalaktopiranosid) için uygundur. Ampisilin direnci oluşturmaktadır. MscS geni üzerinde bir C-terminal bir heksahistidin etiketi (6xHis) içermektedir. T7 bakteriyofaj ribozom bağlanma bölgesini kullanmaktadır.

Gen Klonlama ve Transferleri

Tüm DNA dizileri ve delesyon için gerekli olan sekanslar *E.coli* genom dizisine dayanan primerler kullanılarak PCR amplikasyonları ile elde edildi. Frag1 ve MJF612 suşları, Prof. Dr. Paul Blount ve çalışma ekibinden Robin Wray (UT Southwestern Medical Center, Dallas, ABD) tarafından stab (oda sıcaklığında) kültürler olarak temin edildi. Tüm deney prosedürleri literatüre uygun şekilde yapıldı (Iscla ve ark., 2014).

3.1.2. Antibiyotik Uygulamaları

Hücre canlılığı testleri için, vahşi tip ve mutant tip olmak üzere iki tip *E. coli* suşu kullanıldı. Vahşi tip olarak (F·, rha, thi, gal, lacz) genotipine sahip Frag1 *E. coli* suşu (Epstein ve ark., 1971); mutant tip olarak ise (Frag1, ΔmscL::cm, ΔmscS, ΔMscK::kan, ΔybdG::apr) (Schumann ve ark., 2010) genotipine sahip MJF612 *E. coli* suşu kullanıldı. MJF612, Frag1'in mutant tipi olan bir E. coli suşudur.

Tüm deney protokolü boyunca, MJF612 için hazırlanan LB medyum ve LB plakalara ampisiline dirençli olduğu için (100 µg ml-1) ampisilin eklendi. Frag1 suşu için herhangi bir antibiyotik eklenmedi.

Stab kültürde bulunan bakteri üreme alanından steril özenin ucu ile örnek alındı. Frag1 ve MJF612 suşlardan deney prosedüründe kullanılmak üzere, tek koloni düşürmek amacıyla

çizgi halinde ekim yapıldı ve 37ºC etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, her bir *E. coli* suşuna ait LB plakalardan tek bir koloni alınarak 1-2 mililitre (mL) LB besiyerine ekim yapıldı. Yaklaşık olarak 6-8 saat 37ºC etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, LB medyum içindeki hücreler ile gliserol stok (%65 gliserol) kullanılarak 1:1 oranında homojen olacak şekilde karıştırıldı. Elde edilen *E.coli* hücreleri ve gliserol içeren stoklar uzun süreli saklamak için (ortalama 2-3 yıl) kriyo-freeze tüplere alındı. Bunlar, alkol kabına alınarak -80º C sıcaklıkta 24 saat bekletildi. Daha sonra 100 bölmeli plastik stok kaplarına alınarak -80º C'de stoklandı.

Öncelikle -80º C'de kriyo-freeze tüplerde stok halinde bulunan *E. coli* suşları oda sıcaklığında çözülmeden hızlıca çizgi ekim yapıldı. *E. coli* hücreleri (Frag1 ve MJF612) LB agarlara ekim yapılarak 37ºC sıcaklıkta büyümesi için gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah, her bir suş için tek koloni alınarak LB'ye ekim yapıldı. MJF612 için amfisilin (100 μg ml-1) eklendi. Gecelik kültürler, aynı ortamda 1:40 oranında LB medyum ile seyreltildi. Tüm sıvı kültürler 0.4'e ulaşıncaya kadar OD600 'de LB içinde büyütüldü. Her bir kültürden 5 μL alınarak 10^3'ten 10^6 oranında seri olarak seyreltme yapıldı. 1 mM IPTG ve viyomisin içeren veya içermeyen önceden ısıtılmış LB plakalarına yayma ekim yapıldı. Hücre canlılığını belirlemek için birimleri oluşturan koloniler (CFU) sayıldı. %100 değerleri için tipik değerler 6 ile 8 10^7 CFU kabul edildi. Kontrol grubu 100 birim kabul edilerek koloni sayıları karşılaştırıldı.

3.2. KriyoEM Yapısal Çalışmaları

3.2.1. Escherichia coli Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli suşu BL21(DE3) (Genotip/spesifikasyonlar; Escherichia coil BL21(DE3) *Escherichia coli* BL21(DE3) (F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm)) Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad (ABD) protein ekspresyonu (MscS) için konakçı olarak kullanıldı. EcMscS ekspresyon ve klonlama vektörü olarak T7 promotörünü, bir 6xHis kodlama sekansını ve kanamisin direnç genini taşıyan plazmid pET28-b tercih edildi. Konaklar, uygun antibiyotiklerle (final konsantrasyon kanamisin 50 μg mL-1) takviye edilmiş LB medyumda (%1 tripton, %0.5 maya özü ve %1 sodyum klorür) yetiştirildi. Katı besiyeri olarak LB besiyeri kullanıldı.

Host hücreler, LB agar üzerine ekildikten sonra gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah, 2 mL LB medyuma tek bir koloni alınarak sıvı ekim yapıldıktan sonra gece boyunca 37°C, 200 rpm'de inkübe edildi. Bu prekültür, 20 mL LB ortamına aktarıldı ve OD600'de 0.6 absorbans hücre yoğunluğuna kadar büyütüldü. Daha sonra hücreler 4500xg ve 4°C'de santrifüjlendi. Hücreler, 4500xg'de, 4°C'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra oluşan pelet toplandı. Homojen süspansiyon, steril %50 (v/v) gliserol stokla karıştırıldı. Final konsantrasyon %10 (v/v) olacak şekilde ayarlandı. Homojen süspansiyon hücreler steril kriyo tüpleri bölündükten sonra, hücreler sıvı nitrojen içinde donduruldu ve sonraki kullanıma kadar -80°C'de saklandı.

MscS'nin Klonlaması

MscS için gerekli sekans dizileri, ardışık XhoI ve BamHI olmak üzere 5' ve 3' uçlarında iki kısıtlama bölgesi kullanılarak pET28b vektörüne klonlanacak şekilde *E.coli* genom dizisinden tasarlandı. PCR yapılırken Taq polimeraz için uygun primerler seçildi. Kodon optimizasyonu için Gene Bank'tan EcMscS proteini için cDNA'sı kullanıldı ve PCR ile sentezlendi. PCR, template DNA, dNTP karışımı, ileri/geri primer, polimeraz tamponu, DNA polimeraz ve üretici protokolü tarafından istenen 50 µL toplam hacim (Taq DNA polimeraz için PCR Protokolü, New England Biolabs) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra restriksiyon enzimleri ile sindirildi. Klonlama için kullanılacak olan pET28b plazmidi de aynı restriksiyon enzimleri ile kesildi. PCR ürünleri (Gel Extraction Kit) saflaştırma sonrasında restriksiyon enzimleri ile MscS geni ve pET28b plazmid sindirimi oda sıcaklığında 16 saat (Quick Ligation Kit, New England Biolabs) T4 DNA ligaz enzimi ile bağlandı.

Transformasyon

(pET28bMscS) plazmidinin transformasyonu için *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmasında 6xHis MscS proteininin ekspresyonu gerçekleştirildi. Bunun için 1 µL plazmid DNA, buz üzerinde çözdürüldükten sonra önceden alikotlanmış *E. coli* hücrelerine ekildi. Bu karışım 20 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra hücreler 2 dakika 42°C'de inkübasyona bırakıldı. Isı şoku (92-95 °C) uygulandıktan sonra hücreler buz üzerinde 5-10 dakika inkübe edildi. Hücreler LB medyumlara alındıktan sonra 37°C,

200 rpm'de 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücreler LB agara ekildikten sonra LB plakalar gece boyunca 37°C'de inkübe edildi.

3.2.2. MscS Protein Ekspresyonu ve Pürifikasyonu

MscS Protein Ekspresyonu

EcMscS içeren BL21DE3 hücreleri, kanamisin seçici LB plakalara ekildi ve bir başlangıç kültürü üretmek için gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Tek bir koloni, 5 mL sıvı LB kültüründe 1000x kanamisin (Stok konsantrasyonu 50 mg/mL; final konsantrasyon 50 μg/mL) ile yeniden süspanse edilerek prekültür elde edildi. Daha sonra gece boyunca 37°C'de, 200 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Başlangıç kültüre ~4-5 mL prekültür ekilmeden önce 1L LB medyuma 1000x kanamisin eklendi. Bu ana kültür, 37°C'de OD600 0.6-0.8'e kadar inkübe edildi. Ana kültürlerin konsantrasyonları bir NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Ana kültüre 1 mM IPTG (Stok konsantrasyonu 1 M) uygulanarak indükleme işlemi yapıldı. 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Hücreler, 20°C'de 30 dakika boyunca 4500 rpm'de ultrasantrifüjleme yoluyla toplandı ve elde edilen santrifüj tüpündeki peletler her tüpte ~10mL LB ile yeniden süspanse edildi. Karışım, 50 mL'lik bir falcon tüpüne taşındı. 4500 rpm'de 15 dakika boyunca 4°C'de santrifüjlendi. Pelletler pürifikasyon için uzun süreli stok olarak -80° C'de saklandı.

MscS Protein Pürifikasyonu

Hücre peleti ~30-40 mL Parçalama Tamponu (500 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl; pH 7.9, %1 TritonX-100) ve 1x Proteaz Tablet EDTA'sız (cOmplete proteaz inhibitör kokteyli (Sigma-Aldrich)) içinde çözündürüldü. Bu karışım 4°C'de 10 dakika karıştırılarak inkübe edildi. Hücreler, amplitüd = %40, cycle AÇ/KAPA = 3"/7", Süre = 12-15 dakika boyunca sonikasyon yoluyla parçalandı. Karışım, 4°C'de 30 dakika süreyle 18000 rpm'de santrifüjleme yoluyla çöktürüldü. Peletten uzaklaştırılmak üzere süpernatant toplandı. Karışım bir Nikel (Ni) reçinesine yüklenmeden önce son konsantrasyonu 40 mM olacak şekilde imidazol eklendi. Kolon, dengeleme tamponu (500 mM NaCI, 40 mM Tris-HCl pH 7.9, 40 mM, %1 TritonX-100) (10 CV) ile 2 CV (Kolon Hacmi) (~4mL) Ni reçinesi ile dengelendi. Süpernatant, Ni resin üzerine yüklendi. Karışım, 30 dakika 4°C'de 50 mL'lik bir falcon tüpü içinde orta hızdaki bir çalkalayıcıda inkübe edildi. Akış lizatı (FT) toplandı ve resin 10 CV yıkama tamponu (500 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 7.9, 40

mM, %0.05 DDM) ile yıkandı. MscS proteini, 2CV elüsyon tamponu (500 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 7.9, 250 mM imidazol, %0.05 DDM) ile yıkandı. Protein, 30000 MWCO kesme özelliğine sahip bir Ultra 15 mL Amicon yoğunlaştırıcı kullanılarak 1 mL hacme konsantre edildi. Superdex200 10/300 GL, FPLC Tamponu (150 mM NaCI, 40 mM Tris HCI pH 7.9, %0.05 DDM) ile dengelendi. Protein seviyelerini içeren fraksiyonlar toplandı ve SDS-PAGE ile analiz edildi. Saf proteini içeren en iyi fraksiyonlar bir araya getirildi. Protein fraksiyonları > 2 mg/mL'lik bir konsantrasyona kadar bir Ultra 15 mL Amicon yoğunlaştırıcı 30000 MWCO (Millipore Sigma) ile konsantre edildi. DNAaz/RNAaz içermeyen filtre kullanılarak filtre edildi. Numuneler tüp başına ~100-200 µL olarak bölündü ve bölünen numuneler, MscS'nin nanodiskler halinde rekonstitüsyonu için -80°C'de saklandı.

3.2.3. MSP1E3D1 Protein Ekspresyonu ve Pürifikasyonu

Nanodiskler, proteinler, peptitler ve sentetik polimerler dahil olmak üzere amfipatik molekülleri MSP adı verilen membran yapı iskeleti proteinleriyle yaklaşık 8-16 nm çapında lipid çift tabakasının çevrelendiği diskoidal yapıdaki proteinler tanımlanmaktadır. Nanodisk için rekonstitüsyon prosedürü, membran proteininin dahil edilmesini ve homojenliğini sağlamak için iskele proteininin boyutuna ve konsantrasyonuna göre gerçekleştirilir (Bayburt ve ark., 2002; Denisov ve ark., 2004; Bayburt ve ark., 2010). Bir tütün asitleme virüsü (TEV=Tobacco Etch Virus) proteazla parçalanabilen N-terminali 6 Å içeren MSP1E3D1, nanodisk rekonstitüsyonunu gerçekleştirmek için seçilir. MSP1E3D1, yaklaşık 13 nm çapında nanodiskler oluşturur (Ritchie ve ark., 2009).

MSP1E3D1 Protein Ekspresyonu

N-terminal 6xHis etiketli MSP1E3D1, MscS moleküler teknikleri için tarif edildiği gibi *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde eksprese edildi (pMSP1E3D1 plazmiti, ekspresyon için *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde transforme edildi). BL21 hücreleri, kanamisin seçici LB plakalara ekildi ve bir başlangıç kültürü üretmek için gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Tek bir koloni, prekültür oluşturmak için 1000x kanamisin (Stok konsantrasyonu 50 mg/mL; final konsantrasyon 50 µg/mL) ile 4-5 mL sıvı LB kültüründe yeniden süspanse edildi ve gece boyunca 37°C'de, çalkalayıcıda 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı. 1L LB medyuma 1000X kanamisin eklendikten sonra 4-5 mL prekültür eklendi. Bu kültür,

37°C'de ve 200 rpm'de OD600=0.6-0.8'e kadar inkübe edildi (Ana kültürlerin konsantrasyonları, bir NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü). Ekspresyon 3-4 saat boyunca 1 mM IPTG (Stok konsantrasyonu 1 M) ilave edilerek indüklendi. Ardından, hücreler, 20°C'de ve 4500 rpm'de 30 dakika santrifüj ile toplandı (Beckman Avanti). Peletler her tüpte ~10mL LB ile yeniden süspanse edildi. Karışım, 50 mL'lik bir falcon tüpüne taşındı ve 4500 rpm'de 15 dakika boyunca 4°C'de santrifüjlendi. Daha sonra bu peletler bir sonraki kullanıma kadar -80° C'de saklandı.

MSP1E3D1 Protein Pürifikasyonu

Pellet içindeki hücreler, lizis tamponu (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, %1 Triton-X100) ve EDTA içermeyen 1x Proteaz Tablet (cOmplete proteaz inhibitör kokteyli (Sigma-Aldrich)) içinde amplitüd = 40 %, cycle AÇ/KAPA = 3"/7", zaman =12-15' paremetreleri kullanılarak sonike edildi. Protein-hücre karışımı 16000 g'de 30 dakika 4°C'de ultrasantrifüjlendi. Süpernatant bir Ni afinite kolonu ve biyo beadler 20 CV yıkama tamponu (40 mM imidazol, 30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl ve %1 sodyum kolat) ile yıkandıktan sonra sodyum kolat içermeyen aynı tampon 20 CV tekrar yıkandı. Protein karışımı, elüsyon tamponu (250 mM imidazol, 30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl) ile yıkandı. Histidin etiketini çıkarmak için diyaliz havuzuna (bag) doğrudan MSP'ye 1:30 oranında (TEV:MSP) TEV proteaz eklendi. Diyaliz/bölünmeye gece boyunca 4°C'de taze diyaliz tamponu (30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl) içinde devam edildi. Ertesi sabah numune ayrılan His etiketini ve His etiketli TEV proteazı çıkarmak için bir Ni affinite kolonuna yüklendi. MSP içeren karışım, Ultra 15 ml Amicon yoğunlaştırıcı 10000 MWCO kesme santrifüj filtreleri (Millipore Sigma) kullanılarak konsantre edildi. Protein karışımı numunesi, dengeleme tamponu (30 mM Tris-HCl, pH 7.9 ve 150 mM NaCl) ile dengelenmiş bir Superdex200 kolonuna yüklendi (Bu basamaklar FPLC ve enstrümanları kullanılarak gerçekleştirildi). MSP1E3D1 proteinini içeren numuneler birleştirildi ve her biri 500 µL'de fraksiyonlandı. MSP, Amicon Ultra 15 ml 10000 MWCO kesme santrifüj filtreleri (Millipore Sigma) kullanılarak 4.2 mg fraksiyonlara ayrıldı. DNAaz/RNAaz içermeyen filtre kullanılarak filtrelendi. Filtrelenen numuneler, sıvı nitrojen içinde donduruldu ve sonraki kullanımlar için -80°C'de saklandı.

3.2.4. MscS Nanodisk Rekonstitüsyonu

PC:16 lipid (Avanti Polar Lipids) kloroform içinde saklandı. Sürekli bir nitrojen akışı altında kurutuldu. Lipidler (20 mM sodyum kolat, 30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl) çözündürme tamponunda çözdürüldü. Lipid stoklar 20 mM'lik nihai konsantrasyona seyreltildi. Optimal MscS:MSP1E3D1:(16:1) oranı, nanodisk başına lipid ve protein sayısı için 1:10:500 olarak hesaplandı. KriyoEM numuneleri elde etmek için belirtilen ölçekte lipid ve protein, istenen molar oranlarda birleştirildi. 4°C'de 15 dakika boyunca tampon (30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl, %0.05 DDM) ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1 mL karışıma Bio-Beads SM-2 karışımı (Bio-Rad) ilave edilerek deterjanlardan arındırıldı. Karışım, bir gece boyunca 4°C'de düşük hızda sabit döndürücü/çalkalayıcı ile bir gece inkübe edildi. Ertesi sabah Bio-Beads numuneden uzaklaştırılmak üzere 12000g kullanılarak 1 dakika çöktürüldü.

Süpernatant, boş nanodiskleri çıkarmak için bir Ni afinite kolonuna yüklendi. Kolon bir kez 20 CV yıkama tamponu (40 mM imidazol, 30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl) ile yıkandı. Nanodiskler haline getirilen MscS, elüsyon tamponu (250 mM imidazol, 30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl) ile yıkandı ve FT toplandı. Toplanan numune, Amicon Ultra 15-ml 50.000 kDa kesme santrifüj filtreleri (Millipore Sigma) kullanılarak konsantre edildi ve DNAaz/RNAaz içermeyen filtre kullanılarak filtrelendi. Kolon, MscS Nanodisk FPLC tamponu (30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCI) ile FPLC cihazları kullanılarak dengelendi. Numuneler bir Superdex200 kolonuna enjekte edildi. FPLC'den toplanan en iyi tepe fraksiyonları belirlendi. Numune CM10 veya SDS-PAGE ile analiz edildi ve ardından KriyoEM için vitrifiye numuneler yapıldı.

3.2.5. Kriyo Elektron Mikroskobu

Negatif Boyama ve Elektron Mikroskobu

Numuneler (MscS:MSP1E3D1:(16:1)), %0,7 (w/v) uranil format prosedürleri izlenerek negatif boyama ile incelendi.

Uranil Format Negatif Boyama

Karbon gridler 40 mA, 15" parametreleri kullanılarak deşarj edildi. Gridlere protein numunesi (3.5 µL) uygulandı ve 1 dakika süreyle inkübe edildi. Gridler 3 kez dH_2O ile yıkanıp kurutulduktan sonra ızgaralara 30" için bir kez uranil format uygulandı. Gridler

kurutulduktan sonra nanodisk MscS EM (CM10 elektron mikroskobu) incelenmek üzere karanlık odaya alındı. Kontrol için, negatif boyanmış gridler bir Philips CM10 Transmisyon Elektron Mikroskobu üzerinde görüntülendi. Görüntüler, bir dijital kamera kullanılarak 52000x'lik bir nominal büyütme oranında kaydedildi.

KriyoEM için Örnek Hazırlama

İnce tabakalı karbon film, Quantifoil 300 mesh R 1.2/1.3 bakır gridler üzerine sabitlendi ve bakır gridler, orta güçte deşarj edildi. Numune Nanodrop spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) ile ölçüldü ve numune 0,05 mg/mL'ye konsantre edilerek kullanıldı. 4 µl numune, bir Vitrobot Mark VI (Thermo Fisher Scientific) ve bekleme süresi 10 sn, boyama süresi 0,5 sn, boyama kuvveti -2, oda nemi %100 ve oda sıcaklığı 4°C parametreleri kullanılarak bakır gridlere uygulandı. Numune, sıvı nitrojenle soğutulmuş etana daldırıldı. Ardından numuneler KriyoEM görüntüleme için -80°C'de ve/veya nitrojen tankında stoklandı.

Görüntü İşleme ve Tek Partikül Analizi

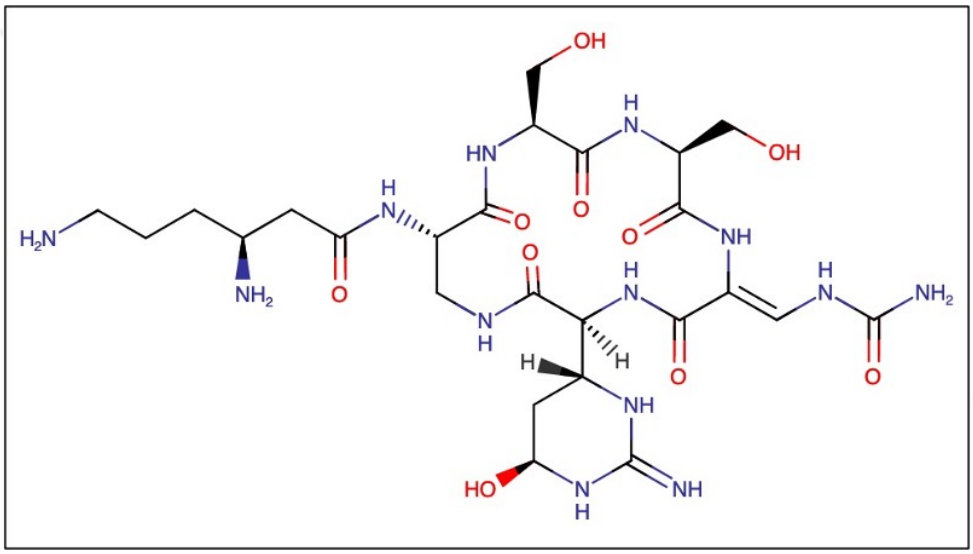
KriyoEM görüntüleme prosedürleri, Titan Krios 300-kV tek partikül KriyoEM kullanılarak The Rockefeller Üniversitesi'ndeki KriyoEM Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi. KriyoEM görüntülerinde elektron ışını kaynaklı numune hareketi MotionCorr237'de düzeltildi. Doz ağırlıklı ve 2x2 piksel olarak gruplandı. Kontrast transfer fonksiyonları (CTF'ler), Relion-339'da gerçekleştirilen Ctffind438 kullanılarak belirlendi. Elde edilen partiküller ilk olarak Gautomatch programı kullanılarak otomatik olarak seçildi. Çıkarılan partiküller normalleştirilerek Relion 3'te 2D sınıflandırıldı. Bazı sınıflar merkez dışı partikül ortalamaları sergilediğinden, kontaminasyon gerçekleştiren 2D sınıflardaki, hasarlı veya çoklu partiküller ve üstten görünümler daha sonraki işlemlerden hariç tutuldu. Parçacıklar ve TM domainler için iyi ortalanmış yan görünümleri 2D gösteren sınıflar, 3D sınıflandırmayı birleştirmek için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Son olarak, elde edilen yoğunluk haritası son işleme ile keskinleştirildi. TM heliksleri için en net yoğunluk ve en çok partikülü içeren en iyi 3D sınıfı için gerçekleştirildi. Nanodisk EcMscS için final çözünürlük 3.4 Å olarak elde edildi.

3.3. Hesaplamalı Teknikler

3.3.1. Ligand ve İyon Kanalı Yapılarının Hazırlanması

Bu çalışmada EcMscS iyon kanalının kapalı konformasyonda bulunan nanodisk yapısı ile kanal dinamiklerinin değişimlerine bağlı olarak lipid çift tabakadan oluşan hücre membranına yerleşik yapıda ise viyomisin ligandının hücre içerisine kanal boyunca geçiş mekanizmaları incelendi.

KriyoEM yöntemi kullanılarak elde edilen kapalı formdaki EcMscS iyon kanalı (PDB kodu: 6RLD) (Rasmussen ve ark., 2019) ve viyomisin (DrugBank kodu: DB06827) ligandına (Şekil 3.1) ait yapılar Protein veri bankası (PDB) (Berman ve ark., 2000) ve DrugBank veri bankasından (Wishart ve ark., 2018) alınarak çalışmamızda kullanıldı.



Şekil 3.1. Viyomisin ligandının kimyasal yapısı.

Kanal yapısındaki tüm eksik kalıntıların tamamı MODELLER web server (Webb ve ark., 2016) kullanılarak tamamlandı. Tüm yapılar için titre edilebilir tüm kalıntıların protonasyon durumları, pH: 7.0 (nötr) ile eşleştirmek için H++ web sunucusu (Anandakrishnan ve ark., 2012) kullanılarak hazırlandı ve eksik hidrojen atomları tamamlandı. H++ web sunucusundan alınan yapılar, moleküler kenetleme işlemleri için kullanıldı.

3.3.2. Moleküler Kenetleme

Moleküler kenetleme çalışmasının temel amacı, kör yerleştirme (blind docking) yaklaşımı kullanılarak protein yapılarına en yüksek bağlanma afinitesine sahip ligand bağlanma pozlarını belirlemektir. Moleküler kenetleme işlemleri için Hızlı Fourier Dönüşümü (FFT) tabanlı bir kenetleme yöntemi olan ClusPro PeptiDock protein-peptit docking programı kullanıldı (Porter ve ark., 2017).

EcMscS iyon kanalının kapalı konformasyondaki yapısına viyomisin ligandı blind docking yaklaşımı kullanılarak kenetlendi ve MD simülasyonlar için ilk docking pozları elde edildi. Yapılan tüm protein-peptit kenetlemelerinden sonra en düşük bağlanma enerjisine sahip yapılar MD simülasyonlar için seçildi. Kenetleme pozları belirlenen ligand ve iyon kanalı arasındaki 2D etkileşimleri belirlemek için de Proteins Plus web sunucusu (Schöning-Stierand ve ark., 2020; Schöning-Stierand ve ark., 2022) kullanıldı.

3.3.3. Moleküler Dinamik Simülasyonlar

MD simülasyonlar için; EcMscS-Nanodisk yapısı, ligand bağlı olmayan Apo-EcMscS lipid çift tabaka yapısı ve kenetleme simülasyonlarından elde edilen EcMscS-Viyomisin protein-ligand kompleks yapısı olmak üzere toplam 3 tane yapı kullanılmıştır.

Viyomisin ligandının iyon kanalına bağlı olduğu ve olmadığı durumlarda kapalı formdaki EcMscS lipid çift tabakadan oluşan membrana yerleştirilmiştir. Ayrıca KriyoEM deneylerinden elde edilen nanodisk yapılarını simüle etmek için EcMscS nanodisk yapıdan oluşan membrana yerleştirilmiştir. Tüm yapıların membrana göre oryantasyonu, Orientations of Proteins and Membranes (OPM) veri tabanının Positioning of Proteins in Membrane (PPM) sunucusu kullanılarak belirlenmiştir (Lomize ve ark., 2012). Ligandın kanala bağlı olduğu ve olmadığı durumlardaki yapılar CHARMM-GUI programının Membrane Builder paketi (Jo ve ark., 2008; Lee ve ark., 2016; Qi ve ark., 2019) kullanılarak 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC) lipid çift tabakasına yerleştirilmiştir. Benzer şekilde EcMscS kanalı MSP tipi MSP1E3D1 olan nanodisk ile 3-palmitoleoil-2-palmitoleoil-D-glisero-1-fosfotidilkolin (DYPC) lipid tabakasına yerleştirilmiştir.

MD simülasyonlar için membrana yerleştirilen yapılarla birlikte oluşturulan ligand-protein-membran kompleks sistemlerinin tümüne TIP3P türü su molekülleri eklendi

(Jorgensen ve ark., 1983) ve 0.15 mM (milimolar) KCl ile nötralize edildi. İyon kanalı ve ligandın yanı sıra her lipid çift tabaka sistemi yaklaşık 265 lipid, ~61,000 su molekülü, 150-200 potasyum (K^+) ve 150-200 klor (Cl^-) iyonu ile toplamda ortalama 100,000 atom içermektedir. Nanodisk lipid tabaka sistemi ise yaklaşık 200 lipid, ~100,000 su molekülü, 296 potasyum (K^+) ve 310 klor (Cl^-) iyonu ile toplamda ortalama 250,000 atom içermektedir.

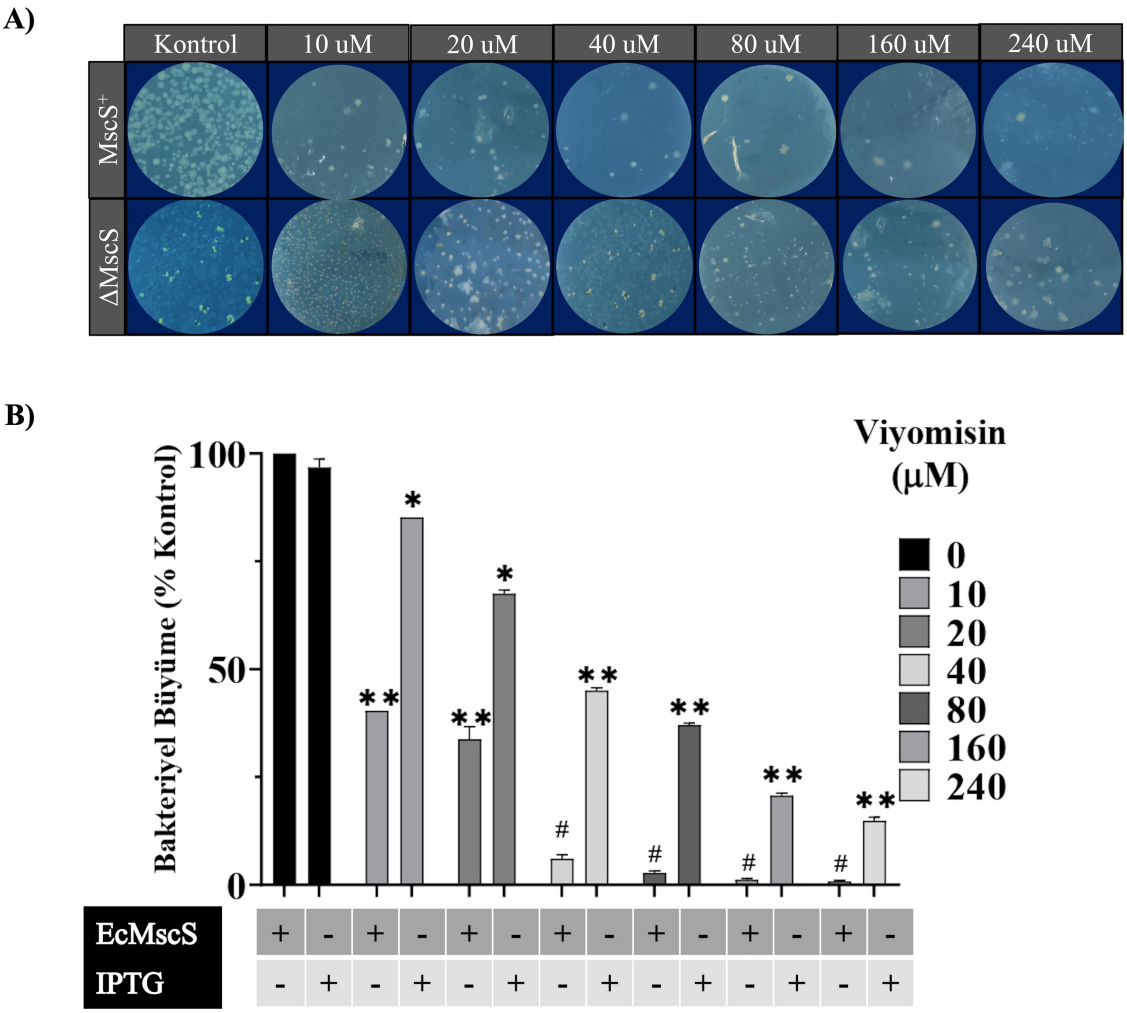
Hazırlanan kompleks yapılar için Charmm36m kuvvet alanı (Huang J. ve ark., 2017) uygulanmıştır ve tüm sistemler GROMACS 2020.1 versiyon yazılım paketi (Abraham ve ark., 2015) ile NVIDIA RTX A400 GPU ekran kartı kullanılarak MD simülasyonlarına tabi tutulmuştur.

MD simülasyonlardan önce, her bir sistem kurulumu 5000 adım eşlenik gradyan minimizasyonu gerçekleştirilerek olası sterik çökmeleri ortadan kaldırmak için gevşetilmiştir. Dengeleme aşamasında, her sistem için harmonik kısıtlama kuvveti sabiti 5 kcal/mol/Å2'ye ayarlanmıştır. Bütün sistemlerde sıcaklık kademeli olarak 0 K'den 303 K'ye yükseltilmiştir ve NVT kısmında 1.0 ps'lik sıcaklık bağlantı sabitine sahip bir Nose-Hoover termostatı (Evans ve ark., 1985) uygulanarak 10 ns üzerinde dengelenmiştir, ardından bir sabit basınç grubu (NPT) kullanılarak yarı izotropik Berendsen barostat (Berendsen ve ark., 1984) ile 1 ns yoğunluk dengelemesi yapılmıştır ve basınç MD simülasyon yürütmeleri boyunca bir yarı izotropik Parrinello-Rahman barostat (Parrinello ve ark., 1981) kullanılarak sabit tutulmuştur. EcMscS-Nanodisk sistemi için 100 ns, Apo-EcMscS ve EcMscS-Viyomisin lipid çift tabaka sistemleri için de 500 ns süreli simülasyon yürütmesi, periyodik sınır koşulları ve 2 fs zaman adımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. EcMscS-Viyomisin kompleksinde ligandın kanal boyunca geçişini simüle etmek için liganda 0.02V/Å dış elektrik alan (EEF) uygulanmıştır (English ve ark., 2015). MD simülasyonlar sırasında, tekrar eden görüntülerin makroskobik bir kafesindeki bir birim hücrenin tam elektrostatik enerjisini hesaplamak için Particle Mesh Ewald (PME) yöntemi (Darden ve ark., 1993) uygulanmıştır. Tüm bağlar, SHAKE algoritması (Ryckaert ve ark., 1977) kullanılarak sınırlandırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Testleri

EcMscS proteininin antimikrobiyal ilaç hedefi olarak potansiyelini belirlemek amacıyla vahşi tip EcMscS ($MscS^{+}$) (Frag1) ve mutant tip EcMscS ($\Delta MscS=MscS^{-}$) (MJF 612) *E. coli* suşları kullanıldı. Öncelikli olarak -80ºC stoklanan hücreler tamamen çözdürülmeden stok kültürlerden alınan hücreler LB besi yerine ekilerek prekültürler elde edildi. Bunun için, önceden 37ºC'ye getirilen 2 mL.'lik LB medyumlara Frag1 ve MJF612 suşları ekildi. LB medyumlarda üreme gözlendikten sonra Frag1ve MJF612 çizgi ekimle LB plakalara ekildi. Ertesi sabah, her bir *E. coli* suşundan tek koloni alınarak LB medyum içerisine ekim yapıldı. Büyütülen hücreler farklı konsantrasyonlarda viyomisin antibiyotiği (0-10-20-40-80-160-240 uM) içeren, önceden ısıtılarak 37ºC'ye getirilen LB plakalara yayma ekim yöntemi ile ekildi. Ekim yapıldıktan sonra, yaklaşık 10 dakika LB plakaların kuruması beklendi. Hücrelerin büyümesi için 37ºC etüvde inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubu olan her iki hücre tipinde de viyomisin içermeyen LB plakalara ekim yapıldı. Bununla birlikte, plazmid içermeyen suş olan Frag1 için IPTG uygulaması yapılmadı. Farklı viyomisin konsantrasyonu içeren LB plakalara her hücre grubu için koloni sayımı yapıldı. Kontrol grupları %100 olarak kabul edilerek istatistiksel analizler yapıldı. İstatistiksel analizler için, GraphPad Prism (sürüm 8.01; GraphPad, San Diego, CA) programı kullanıldı. Tüm elde edilen sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) olarak hesaplandı. Kantitatif değişkenler arasındaki farklar, Two -way ANOVA varyans analizi ile belirlendi ve ardından Bonferoni testi ile değerlendirilme yapıldı. Elde edilen bulgular için, 0.05'in altındaki tüm p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bununla birlikte, grafiklerde istatistiksel değerlere uygun semboller kullanıldı: *$p < 0.05$; **$p < 0.01$ ve #$p<0,001$.



Şekil 4.1. MscS içeren (Frag1; MscS+) ve içermeyen (MJF 612; ΔMscS) hücrelerinde artan konsantrasyonlarda viyomisin antibiyotiğinin karşılaştırılması. Artan konsantrasyonlarda viyomisin içeren LB plakalara Frag 1 ve MJF612 hücreleri karşılaştırıldı. Frag1 ve MJF612 viyomisinin artan konsantrasyonlarında kontrole göre kıyaslanmıştır. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism (sürüm 8.01; GraphPad, San Diego, CA) ile yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) olarak rapor edildi. Kantitatif değişkenler arasındaki farklar, Two -way ANOVA varyans analizi ve ardından Bonferoni testi ile değerlendirildi. 0.05'in altındaki tüm p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, grafiklerde aşağıdaki gibi uygun semboller kullanıldı: *p <0.05; **p <0.01 ve #p<0,001.

4.2. EcMscS'nin Tek Partikül KriyoEM Değerlendirilmesi

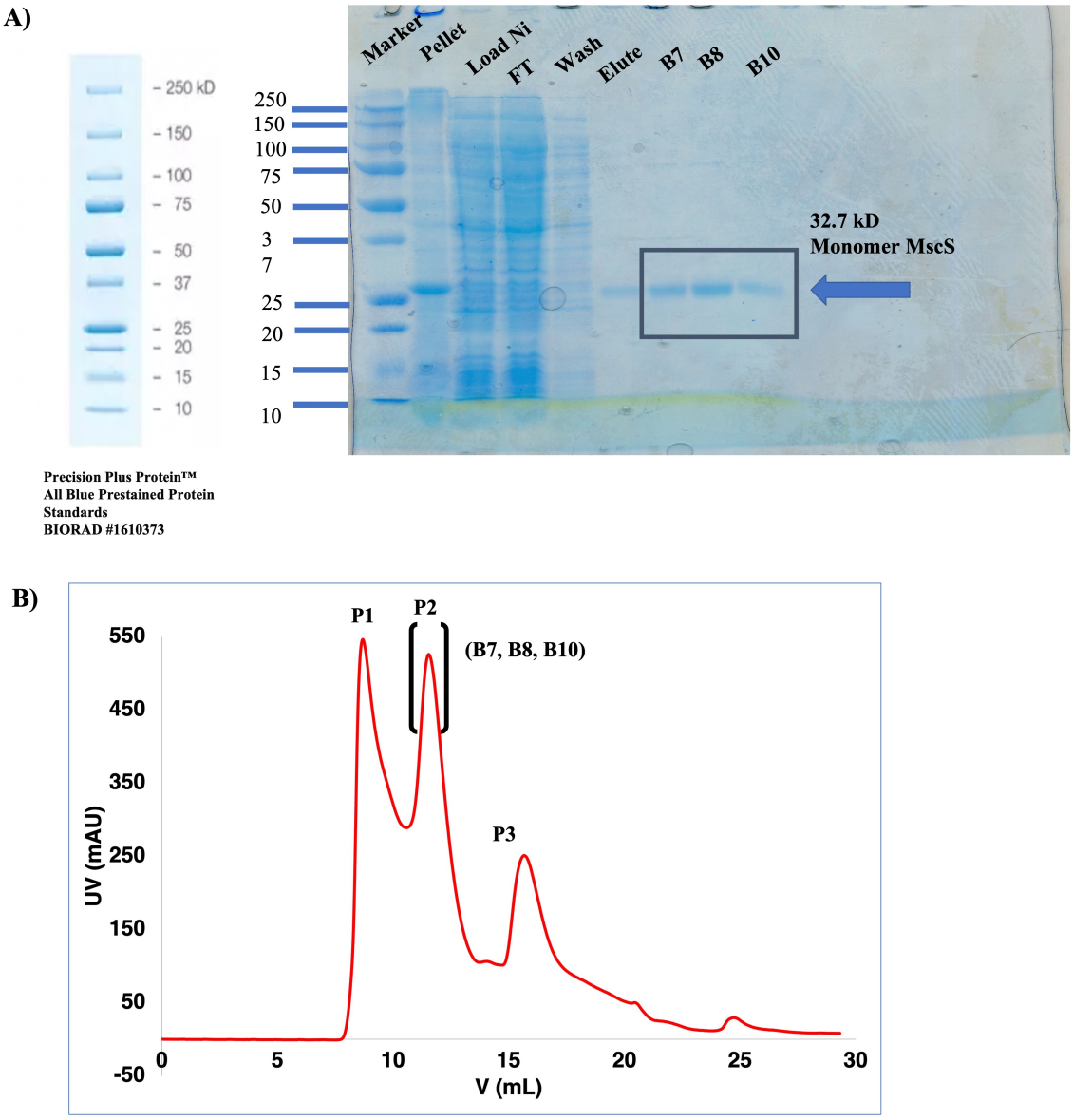
MscS Protein Pürifikasyonu

SDS-PAGE için ayırma jeli %12 ve toplama jeli %5 hazırlandı. Örnekler; pelet (pelet numunesi, ultrasantrifüjlemeden sonra kontrol için kullanılır), Load NI (ultrasantrifüjlemeden sonra süpernatant numune kontrol için kullanılır), FT (flow through), wash (yıkamadan sonraki numune, kontrol için yıkamadan sonra kullanılır), elütion (elüsyon) MscS, B7-8-10 (MscS içeren FPLC'den toplanan en iyi pik fraksiyonları) SDS-PAGE (Şekil 4.1.B) kullanılarak tespit edildi. Moleküler ağırlık

belirteci olarak, 5 µl Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein (Standardı) #1610373, BIORAD) kullanıldı. Tampon ve jel bileşimleri takip edildi. Ayırma jeli %10 (1.5 M Tris pH:8.8, Poliakrilamid %40 (19:1), SDS %10, ddH_2O, APS %10 (w/v), TEMED) ve toplama jeli; %5 (1 M Tris pH: 8.8, Poliakrilamid %40 (19:1), SDS %10, ddH_2O, APS %10 (w/v), TEMED) kullanıldı. Elektroforez 200 V, 400 mA, ~2 saat parametreleri ile yapıldı. Elektroforezden sonra, proteinler Coomassie boyama solüsyonu (AcquaStain Protein Gel Stain, Bulldog Bio) ile 1 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.1.A). İnkübasyondan sonra boyanmış EcMscS protein bantları ile SDS-PAGE tespit edildi (~30-35kDa).

Pürifikasyon, bir AKTA kromatografi (AKTA pürifikasyon sistemi) ile gerçekleştirildi. UV detektörü (280 nm), iletkenlik cihazı ve fraksiyon toplayıcı ile donatılmış sistem, UNICORN yazılımı (GE Healthcare) kullanılarak çalıştırıldı. Sistemi yıkayıp dengeledikten sonra kolon bağlandı. Süpernatan MscS çözündürüldükten ve DDM içinde saflaştırıldıktan sonra 1 ml/dk'lık bir akış hızıyla yüklendi.

FPLC, ilk maksimum pik 8 mL'ye denk gelen bir void volüm (P1), ardından ~12 mL'lik bir elüsyon hacminde bir pik (P2) gösterdi. (Şekil 4.2.B). Pürifikasyon, her iki pikin elüsyon fraksiyonlarının saf bir ürün olarak MscS içerdiği teyit edildi. Şekil 4.2.B'de FPLC, P1'in fraksiyonları yüksek oranda kümelenmiş protein gösterdiğinden, P2'nin fraksiyonları bir araya toplandı ve 2 mg/mL'ye konsantre edildi. FPLC analiziyle elde edilen B7-8-10 numuneleri Şekil 4.2.A'da moleküler ağırlıkları ile doğrulandı. Elde edilen protein negatif görüntüleme yöntemleri ile de kontrol edildi.



Şekil 4.2. EcMscS için pürifikasyonun değerlendirilmesi. A) Ayırma jeli %12 ve toplama jeli %5 SDS-PAGE için hazırlandı ve bunun için protein belirteci kullanıldı MscS saflaştırması sırasıyla pelet, yük, NI, FT, yıkama ve elüsyon numunelerinde SDS-PAGE ile analiz edildi. Kromatogram, MscS saflaştırmasının MscS rekonstitüayonu için uygun olduğunu gösterildi. B) FPLC profilinde, 8 ml'lik bir elüsyon hacminde maksimum olan P1 görünür (kullanılan kolonun boş hacmine karşılık gelir), ardından ~12 ml'de bir pik gelir (P2).

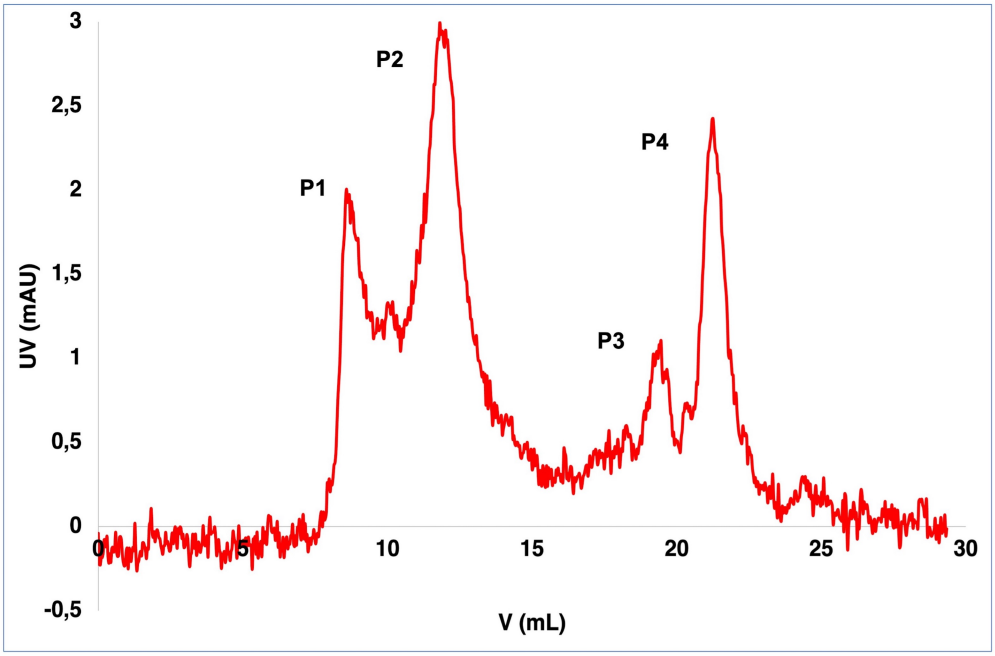
MscS Nanodisk Rekonstitüsyonu ve Negatif Boyama

Nanodisk rekonstitüsyonu yaklaşık 13 nm çapında nanodiskler oluşturan MSP1E3D1 kullanıldı. MscS:MSP1E3D1:(16:1) (Protein:MSP:Lipid)'nin optimal rekonstitüsyon oranı belirlendi. Boş nanodiskler için 1:10:500 (MscS: MSP: PC16) oranı en iyi rekonstitüsyonu gösterdi. FPLC verilerine göre ~8 mL P1 void volüm olarak kaydedildi.

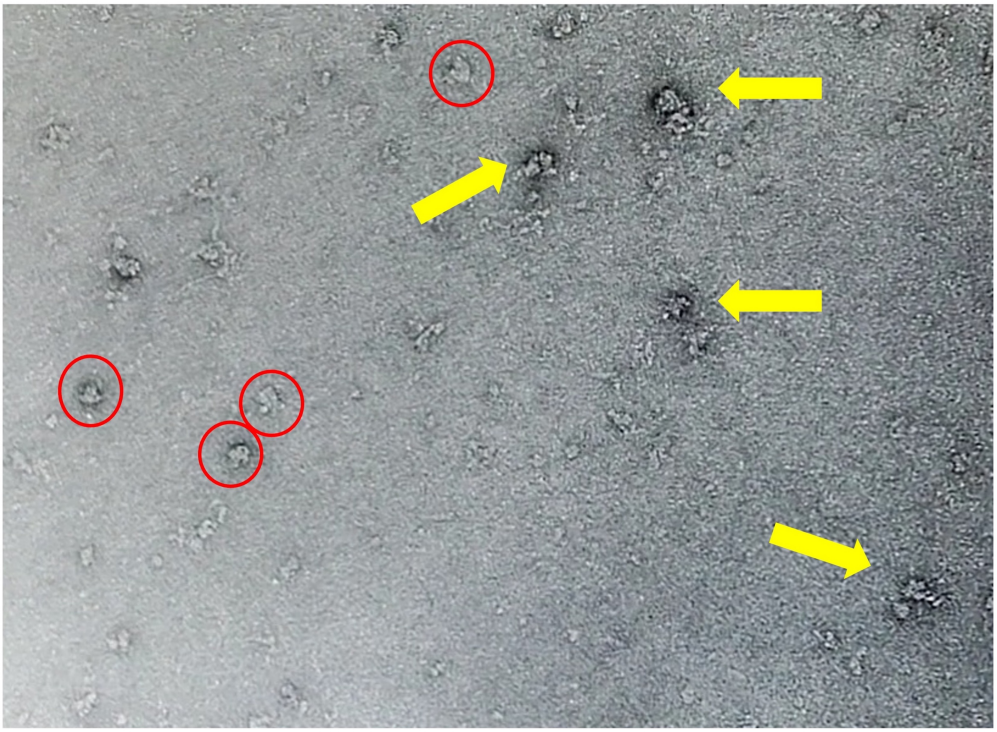
FPLC, ~12 ml'lik bir hacimde maksimum volümde tespit edildi ve P2 hacmine denk gelen numuneler toplanarak bu numuneler birleştirildi (Şekil 4.3.A).

MscS nanodisk rekonstitüsyonunu görüntülemek için yapılan %0,7 uranil asetat ile negatif boyamada partiküller CM10'da incelendi. Elde edilen görüntülerde MscS nanodisk yapısı normal boyutta ve heterojen görünmektedir (Kırmızı halka içerisinde işaretlendi). Agregasyon oluşturan partiküllerin şekli ve boyutu incelendiğinde MscS nanodisk yapılarına uygun görünmeyenler belirlendi (Sarı oklar şeklinde agregasyon oluşturan yapılar gösterildi) (Şekil 4.3.B). Bununla birlikte, alınan tüm görüntü numunelerinde partiküller agregasyon oluşturma eğiliminde olmadığından numuneler kullanılmaya uygun görülmüştür. MscS:MSP1E3D1:(16:1) nanodisk yapısı için beklenen yapılar izlenmiştir. Negatif olarak boyanmış MscS'nin mikrografları hem tek partikülleri hem de birkaç partikülün kümelenmesini gösterdiğinden, nanodisk partükülleri tek partikül KriyoEM analizinde analiz edilmek üzere prosedürlere devam edildi.

A



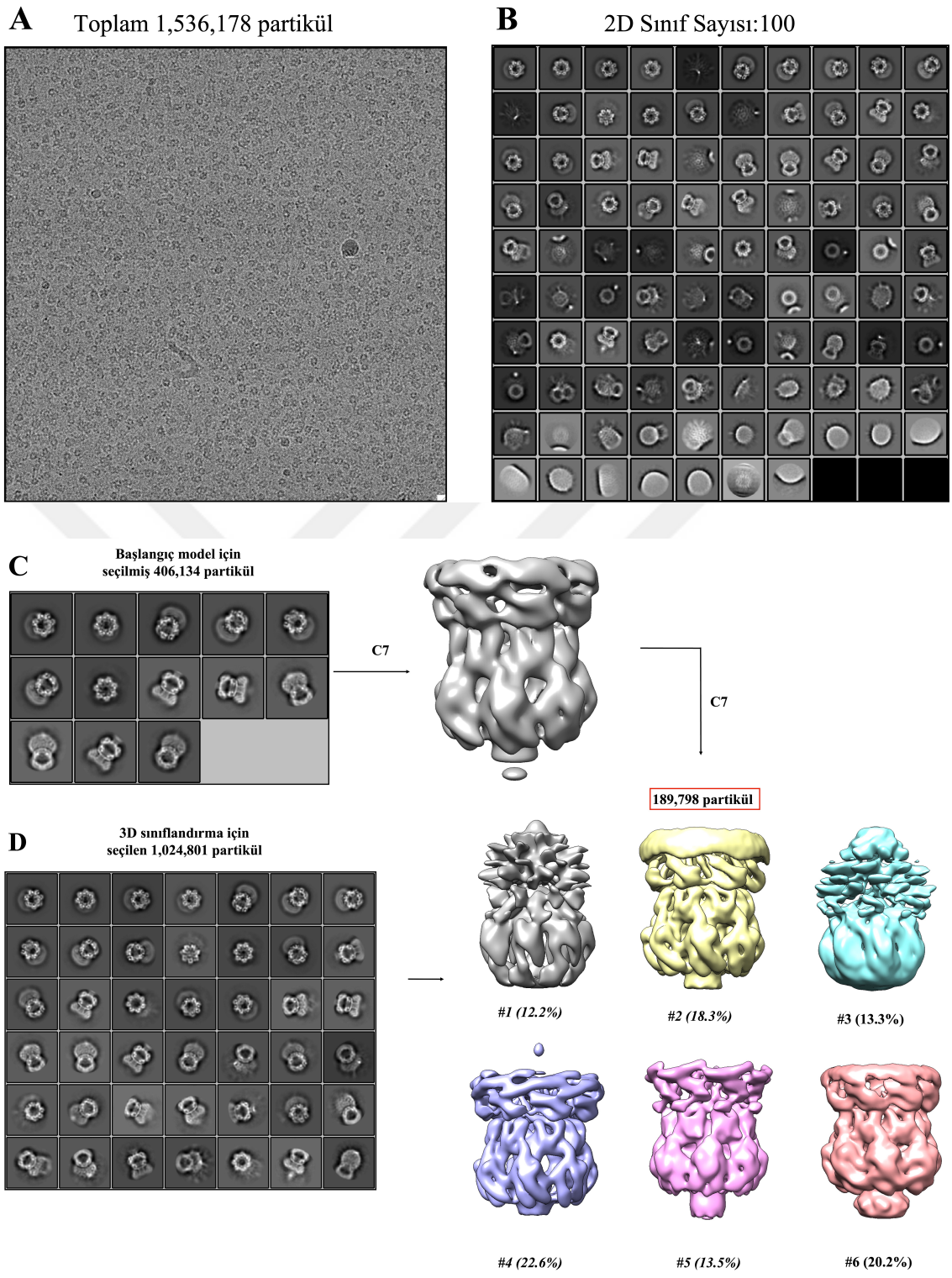
B

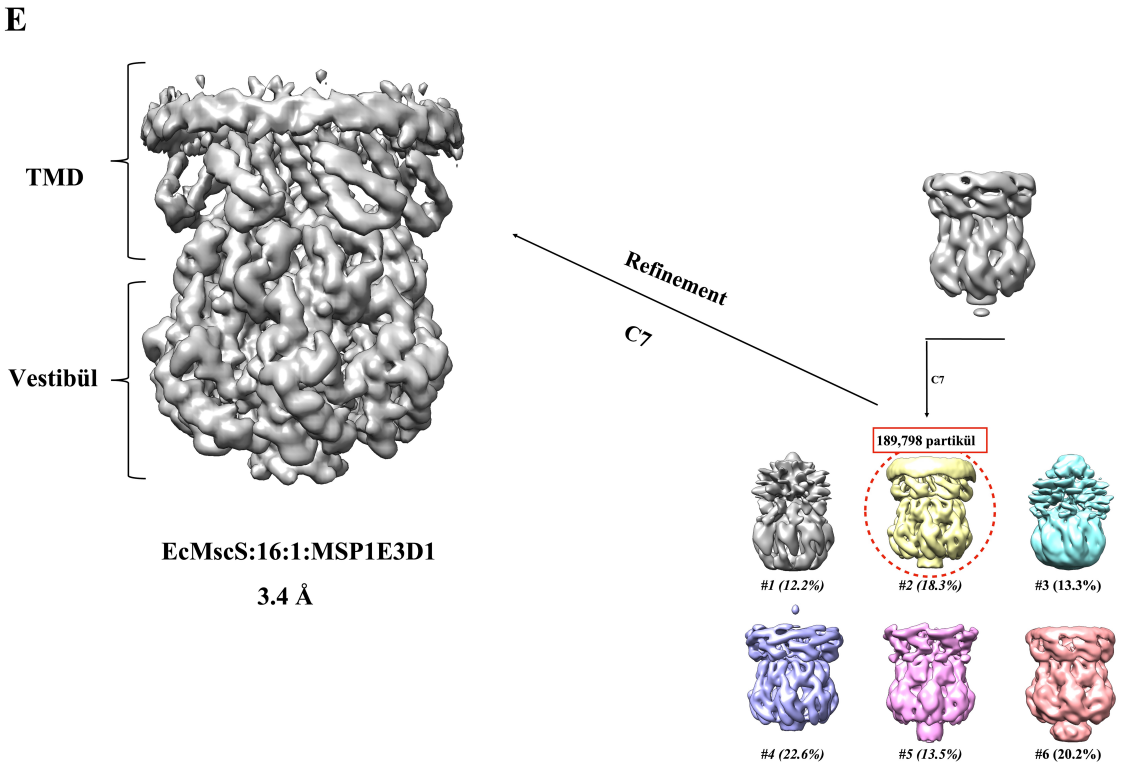


Şekil 4.3. MscS: MSP: PC16 nanodisk sonuçları. A) SEC kramotogrofi sonuçları. P1 void volüm, P2 numune olarak kaydedildi. B) Negatif boyama. Uranil boyama yapıldı. Kırmızı halkalar nanodisk formunu göstermektedir. Sarı oklar ise istenmeyen agresgasyon oluşturan yapıları temsil etmektedir.

EcMscS için Tek Partikül KriyoEM Analizi

Rekonstitüsyon edilen EcMscS'de negatif boyamadan sonra mikrograflar, 4k x 4k F416 kamera ile donatılmış bir CT10 transmisyon elektron mikroskobunda kaydedildi. CTF (contrast transfer functions), Ctffind438 kullanılarak tahmin edildi. EcMscS için Relion-3'ün auto-picking (otomatik toplama) seçeneği kullanılarak toplanan görüntülerden toplam 1.536.178 partikül elde edildi (Şekil 4.4.A). 2D sınıflandırmaya başlamadan önce, otomatik olarak seçilen ve çıkarılan partiküller görsel olarak kontrol edildi ve sayı 1.024.801 partiküle düşürüldü. Otomatik olarak seçilen tüm partiküllerin yaklaşık %70'i, 2D sınıflandırma için girdi görevi görmüştür. Relion-3 veri toplama seti prosedürleri, sınıflandırma için kümelenmiş ve mat partiküllerden temizlenmiştir. En iyi 2B sınıf ortalamaları, ağırlıklı olarak yandan görünümlerden oluşan bir veri setinde temizleme sonuçlarıyla gerçekleştirildi (Şekil 4.4.B). Toplamda otomatik olarak seçilen tüm partiküller (1.024.801 partikül) 3D sınıflandırma için veri olarak kullanıldı. (Şekil 4.4.D). EcMscS nanodisk için, C7 simetrisi uygulanmış 406.134 partikülün bir alt kümesindeki veri kümesinden yeniden bir başlangıç modeli oluşturuldu (Şekil 4.4. C). Partiküllerin farklı görünümlerini temsil eden en iyi 2D sınıf ortalamaları, ilk model için veri görevi görmüştür. Güvenilir bir başlangıç modelinin oluşturulması için dikkatli bir şekilde seçilen sınıf ortalamalarına, toplam partikül sayısına ve partikül çapına dayanmaktadır. 3D işleme için çeşitli koşullar test edildi. Testler, her çalıştırmada farklı sayıda sınıf veya bir sonraki çalıştırma için seçilen 3D sınıf ortalamalarının değişen kombinasyonlarını içermektedir. Her biri altı sınıfa sahip iki ardışık 3D sınıflandırma, en iyi elde edilen sonucu göstermektedir. Kapalı formu temsil eden sınıflardaki partiküller, 2D ve 3D sınıflandırmalarının ardışık turlarında ayrı ayrı işlendi ve 3.4 Å çözünürlükte kapalı formun bir haritası elde edildi (Şekil 4.4.E, sol üst, gri renkte).


A
Toplam 1,536,178 partikül
B
2D Sınıf Sayısı:100
C
Başlangıç model için
seçilmiş 406,134 partikül
C7
C7
189,798 partikül
D
3D sınıflandırma için
seçilen 1,024,801 partikül
#1 (12.2%)
#2 (18.3%)
#3 (13.3%)
#4 (22.6%)
#5 (13.5%)
#6 (20.2%)

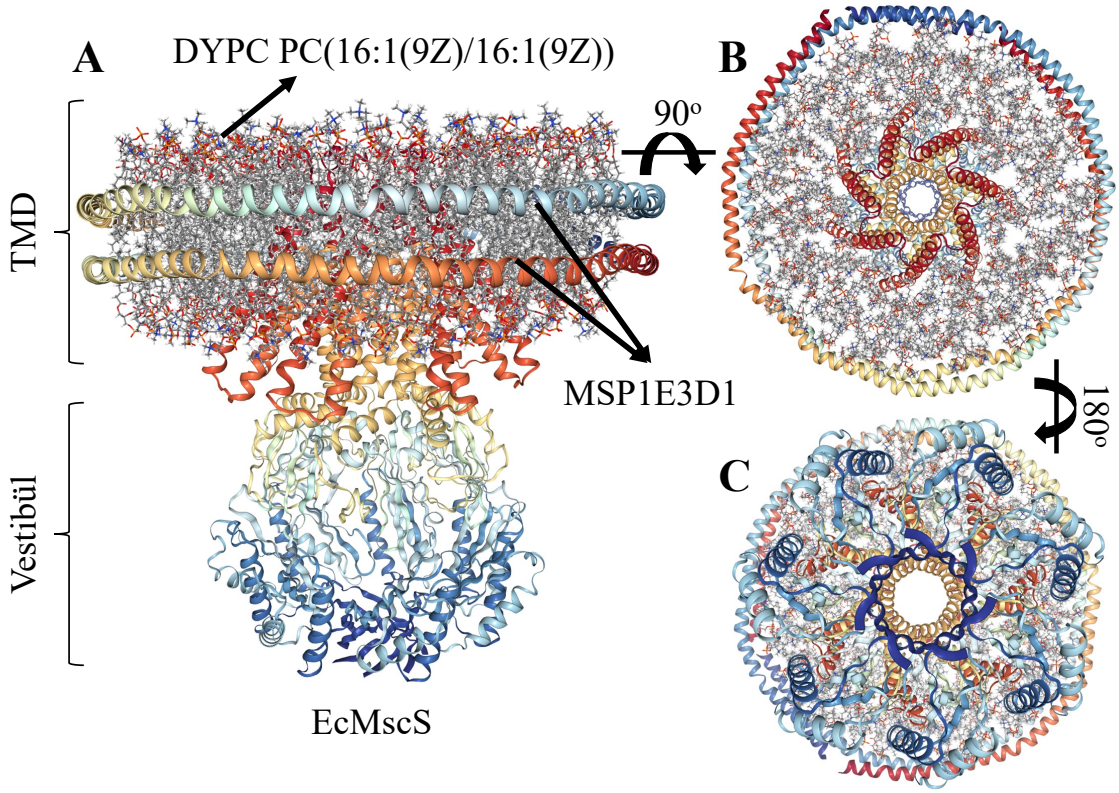


Şekil 4.4. MscS'nin tek partikül KriyoEM analizi. A) Veri analizi için kullanılan vitrifiye MscS:MSP1E3D1:PC16'nın bir mikrografının temsili kısmı B) Temsili sınıf ortalamaları, üstten görünüm partiküllerin baskınlığını ortaya koyuyor (> %98). C) Başlangıç model D) Sınıflandırma ile oluşturulan altı sınıf E) 3.4 Å çözünürlükteki KriyoEM haritası, iyi çözülmüş bir sitozolik alanı ve iyi çözülmüş bir TMD göstermektedir.

4.3. MD Simülasyon Bulguları

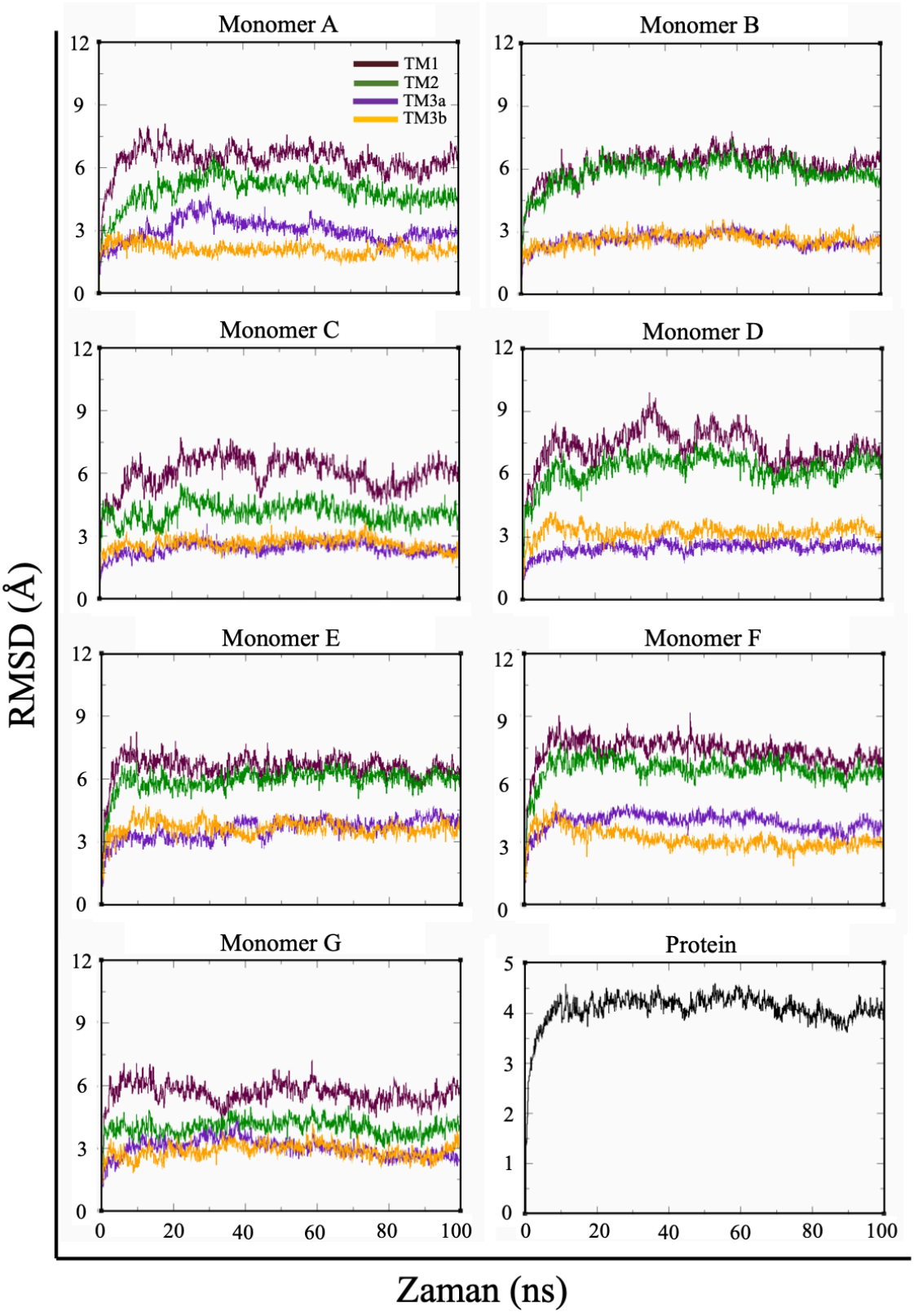
MscS iyon kanalının farklı lipid bağlanma durumlarında yapısal dinamik değişimlerini belirlemek ve anti-bakteriyel ilaç hedefi olarak viyomisin ligandının kanal boyunca geçişini incelemek için MD simülasyonlar yürütüldü.

EcMscS'nin deneysel KriyoEM metotlarıyla belirlenen nanodisk yapısını değerlendirmek için yürütülen 100 ns süreli MD simülasyonlar ile kanalın kapalı formdaki yapısını koruduğu belirlendi (Şekil 4.5). EcMscS'nin tüm protein rezidüleri ile 7 monomerinin simülasyon boyunca rezidülere ait RMSD değişimleri incelendiğinde 100 ns boyunca kanalın stabil olarak başlangıç yapısını koruduğu gözlendi.

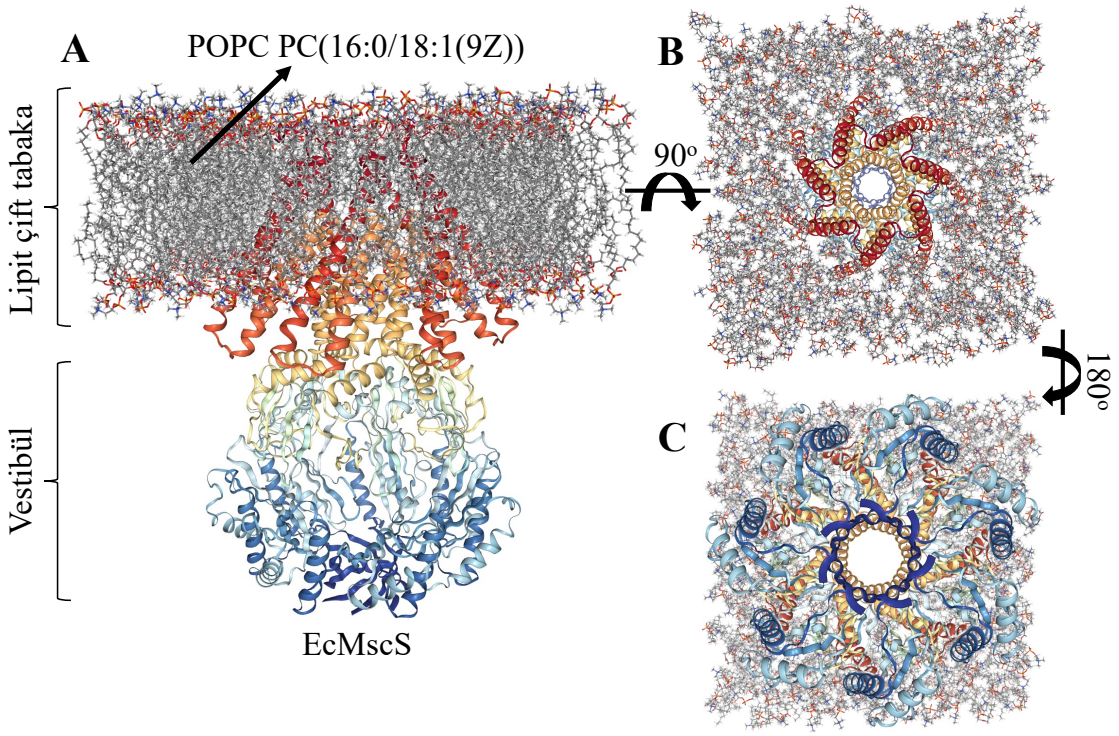


Şekil 4.5. EcMscS-Nanodisk kompleks yapısı. A) EcMscS iyon kanalının Nanodiske yerleşiminin yandan, B) hücre dışından ve C) hücre içinden görünümü.

Her monomer yapısı TM1, TM2, TM3a ve TM3b bileşeninden oluşan EcMscS'nin nanodiske yerleşimi durumunda simülasyon süresi boyunca RMSD değişimleri incelendiğinde farklı monomerlerde bu bileşenlerin stabilitelerinin farklı olduğu görüldü. B, E ve F monomerlerlerindeki TM1 ve TM2 bileşenlerinin benzer stabiliteye sahip oldukları gözlenirken özellikle A ve G monomerlerinde TM2'nin TM1'e kıyasla daha kararlı bir yapı sergilediği görüldü. TM3a ve TM3b bileşenlerinin RMSD değişimleri incelendiğinde ise tüm monomerlerde simülasyon boyunca genellikle benzer bir stabiliteye sahip kararlı bir yapı sergilediği gözlendi ve önemli bir değişim olmadığı düşünüldü. Bu durum EcMscS'nin başlangıçtaki kapalı formunu koruduğunu, bununla birlikte monomerlerini oluşturan bilenşenlerden özellikle TM2'nin daha kararlı bir yapıya sahip olduğu bulgusunu sağladığı düşünüldü.

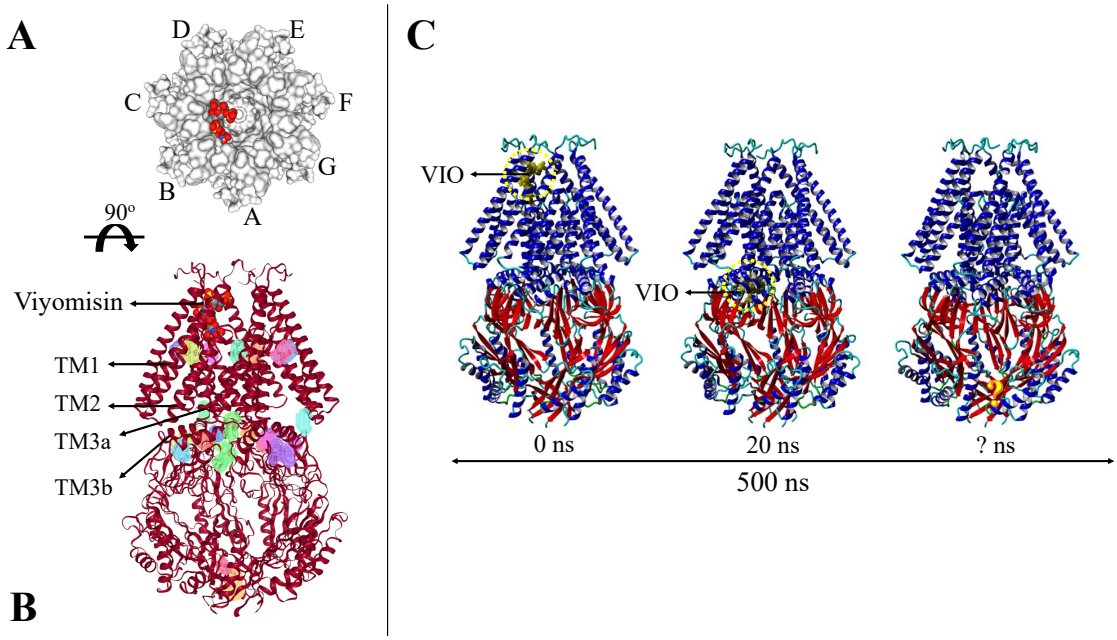


Şekil 4.6. EcMscS-Nanodisk kompleks yapısının RMSD değişim grafikleri.



Şekil 4.7. EcMscS lipid çift tabaka kompleks yapısı. A) EcMscS iyon kanalının lipid çift tabakaya yerleşiminin yandan, B) hücre dışından ve C) hücre içinden görünümü.

Viyomisin ligandının bir ilaç hedefi olarak MscS iyon kanalı içeren suşlarda hücre canlılığını azalttığı yönündeki bulgularımız nedeniyle ligandın EcMscS iyon kanalı boyunca TM alanından hücre içi sitozole geçiş mekanizması değerlendirildi. Bunun için viyomisin ligandının EcMscS'ye bağlı olduğu ve olmadığı durumlarda lipid çift tabakaya yerleştirilmiş kompleks yapılarla 500 ns süreli MD simülasyonlar yürütüldü. Apo-EcMscS kompleks yapısı incelendiğinde 500 ns boyunca ligand bağlı olmadığı durumda kanalın başlangıç kapalı formunu koruduğu görüldü ve ligand bağlanma durumuyla kıyaslandı (Şekil 4.7). Viyomisinin EcMscS'ye bağlanabileceği toplamda 25 farklı bağlanma bölgesi tayin edildi (Şekil 4.8.B). Bu bağlanma bölgelerinden moleküler kenetleme ile belirlenen ilk bağlanma pozundan başlayarak EcMscS-Viyomisin ligand bağlı kompleks yapısı incelendiğinde ise 500 ns boyunca kanalın başlangıç kapalı formunu koruduğu ve ligandın kanal boyunca herhangi bir geçiş sergilemediği görüldü.



Şekil 4.8. EcMscS-Viyomisin kompleks yapısı. A) EcMscS-Viyomisin en yüksek bağlanma enerjisine sahip kenetleme pozu üstten görünümü B) Viyomisin ligandının EcMscS'da bağlanma bölgeleri C) Viyomisinin kanal boyunca geçiş simülasyonu.

Liganda 0.02V/ Å dış elektrik alan (EEF) uygulandıktan sonra yürütülen 500 ns MD simülasyonun başlangıcında ligandın transmembran alanın vestibül kısmında B, C ve D monomerlerinin TM1 ve TM2 bileşenlerine Tablo 4.1.A ve B'de verilen 17 hidrojen bağı ve 4 tuz köprüsüyle bağlandığı görüldü. Daha sonra MD simülasyonun ilk 20 ns süresinde ligandın sitozolik alanın başlangıç noktasına ulaştığı ve A, B ve C monomerlerine bağlandığı belirlendi. Bu bağlanma, kapalı konformasyonun korunması için TM3a'da bulunan LEU109 ve TM3b'de bulunan GLY113 amino asitleri dahil olmak üzere Tablo 4.1.C'de belirtilen toplam 19 hidrojen bağıyla sağlandığı görüldü.

Tablo 4.1. EcMscS-Viyomisin ligand protein etkileşimleri. Simülasyon başlangıcında ligand-protein arasındaki (0 ns) A) hidrojen bağları ve B) tuz köprülerinin listesi ile simülasyonun 20 ns'de ligand-protein arasındaki C) hidrojen bağları listesi.

A

Rezidü No	Rezidü Tipi	Rezidü Monomeri	Rezidü No Ligand	Ligand Çeşidi	Yan Zincir Evet (E)-Hayır (H)
22	ALA	C	281	Viyomisin	H
26	SER	C	281	Viyomisin	E
26	SER	D	281	Viyomisin	E
27	TYR	D	281	Viyomisin	E
30	ASN	C	281	Viyomisin	E
30	ASN	C	281	Viyomisin	E
87	GLY	B	281	Viyomisin	H
87	GLY	C	281	Viyomisin	H
88	ARG	B	281	Viyomisin	E
88	ARG	C	281	Viyomisin	H
90	GLY	C	281	Viyomisin	H
90	GLY	C	281	Viyomisin	H
91	VAL	C	281	Viyomisin	H
91	VAL	C	281	Viyomisin	H
92	GLN	C	281	Viyomisin	H
92	GLN	C	281	Viyomisin	E
92	GLN	D	281	Viyomisin	E

B

Rezidü No	Rezidü Tipi	Rezidü Monomeri	Rezidü No Ligand	Ligand Çeşidi	Yan Zincir Evet (E)-Hayır (H)	Grup
88	ARG	B	281	Viyomisin	E	Karboksilat
88	ARG	B	281	Viyomisin	E	Sülfonik asit
88	ARG	C	281	Viyomisin	E	Sülfonik asit
88	ARG	C	281	Viyomisin	E	Sülfat

C

Rezidü No	Rezidü Tipi	Rezidü Monomeri	Rezidü No Ligand	Ligand Çeşidi	Yan Zincir Evet (E)-Hayır (H)
109	LEU	C	281	Viyomisin	H
112	GLN	C	281	Viyomisin	H
113	GLY	B	281	Viyomisin	H
113	GLY	C	281	Viyomisin	H
114	SER	B	281	Viyomisin	H
114	SER	C	281	Viyomisin	E
116	SER	A	281	Viyomisin	E
116	SER	A	281	Viyomisin	E
116	SER	A	281	Viyomisin	H
116	SER	B	281	Viyomisin	H
116	SER	B	281	Viyomisin	E
116	SER	B	281	Viyomisin	E
117	ASN	B	281	Viyomisin	E
117	ASN	B	281	Viyomisin	E
117	ASN	B	281	Viyomisin	E
117	ASN	C	281	Viyomisin	E
120	ALA	A	281	Viyomisin	H
168	GLY	A	281	Viyomisin	H
168	GLY	B	281	Viyomisin	H

5. TARTIŞMA

MS iyon kanallarının hipoozmotik şok durumunda emniyet valfi olarak karakterize edilen fonksiyonunun yanı sıra sadece ozmoregülasyonla sınırlı olmayan fonksiyonlara da sahip olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmıştır (Levina ve ark., 1999). Özellikle MscS kanal ailesinin üyeleri bakteri ve bitki hücrelerinin fizyolojisinde ozmoregülasyondan hücre içi Ca^{+2} düzenlenmesine, sinyal transdüksiyon yolaklarından hücre bölünmesi ve hücre sağkalımına kadar oldukça farklı fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (Cox ve ark., 2013; Koprowski Piotr ve ark., 2015). MscS antibakteriyel ilaç tasarımı alanında antibiyotikler için potansiyel bir hedef olarak düşünülmektedir (Booth ve ark., 2012; Iscla ve ark., 2014). MS iyon kanallarının antibakteriyel ilaç hedefi olması ve biyofilm oluşumuna etkisinin yanı sıra bu kanalların streptomisin ve viyomisin gibi antibiyotiklerin hücre içine alımı ile ilgili stres yanıtlama sistemleri olduğu bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, özellikle streptomisinin MscL iyon kanalına bağlanarak hücreye erişim sağladığı MD simülasyon yöntemleriyle gösterilmiş ve bir antibakteriyel ilaç hedefi olduğu belirtilmiştir (Iscla ve ark., 2014; Wray ve ark., 2016). Bu bakımdan, MscS ve benzeri kanalların insanlarda veya hayvanlarda homologlarının olmaması, hücrede ozmotik şoka karşı MscL'den daha önce yanıt vermesi, hücrede gen ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olması ve patojenik bakteriler arasında sayısız şekilde bulunabilmesi antibakteriyel ilaç tasarımı için çok daha avantajlı bir durum oluşturmaktadır (Lai ve ark., 2013). Bu doktora tez projesinde, MscS içeren vahşi tip (Frag1($MscS^{+)}$) ve MscS içermeyen mutant *E. coli* suşları (MJF612 ($MscS^{-}$)) hazırlandı. E. coli hücrelerinde viyomisin antibiyotiğinin artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı testleri yapıldı ve kontrole göre kıyaslandı. Daha önce yapılan bir çalışmada MscS içeren hücrelerde 80 µM viyomisin uygulandığında *E. coli* suşlarının koloni sayılarında dolayısıyla hücre canlılığında bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bu veri ile uyumlu olarak, çalışmamızda kontrol grubu ile viyomisin verilen gruplar (20-40-80-160-240 µM viyomisin) kıyaslandığında hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. Bununla birlikte, viyomisinin EcMscS içeren vahşi tip *E. coli* suşlarında mutant suşa göre kıyaslandığında, hücre canlılığını konsantrasyon bağımlı olarak azalttığı ilk kez çalışmamızda gösterildi.

Bu doktora tez çalışmasında, viyomisin antibiyotiği uygulanan MscS içeren Frag1 ile MscS içermeyen MJF612 *E. coli* suşları kıyaslandığında Frag1 uygulanan gruplarda hücre canlılığının azaldığı belirlendi (Şekil 4.1.A-B). Elde edilen bulgular doğrultusunda, viyomisin antibiyotiğinin hücre içerisine nasıl geçtiğini göstermek, hücre canlılığı testlerini tamamlayan ve mekanizmanın daha detaylı incelenmesi amacıyla MD simülasyon deneyleri yapıldı. Bunun için, viyomisinin EcMscS'de TMD ve sitozolik alanda toplam 25 tane bağlanma bölgesi tayin edildi. Viyomisinin EcMscS'nin ekstraselüler kısmındaki TMD bölümünde bağlanma bölgelerine bağlandığı ve daha sonra sitozolik kısma geçerek hücre içerisine geçme potansiyeli olduğu gösterildi. MD simülasyon teknikleri kullanılarak dihidrostreptomisin antibiyotiğinin MscL'den hücre içerisine geçerken yapısının nasıl etkilendiği ilk kez gösterilmiştir. Bununla birlikte, dihidrostreptomisinin EcMscL'nin poruna doğrudan belirli bir konuma bağlanarak kanalın konformasyonel yapısını değiştirdiği belirlenmiştir. Bu konformasyonel değişim, K^+ ve glutamatın hücre dışarısına verdiği ve dihidrostreptomisinin hücre içerisine girişine izin verecek şekilde değiştirdiği deneysel verilerle desteklenmiştir (Wray ve ark., 2016). MS iyon kanallarının antibiyotik strese karşı yanıt oluşturdukları gösterilmiştir. Hücre membranın gerilmesini taklit eden maddelerin ozmoprotektif amino asitler olan glutamat, aspartat gibi aminoasitlerin salınımına izin vererek ozmotik membran stabilizasyonu ve azalmış antibiyotik duyarlılığına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Sidarta ve ark., 2022). Elde edilen bulgular, MS iyon kanallarında antibiyotik geçişlerinden hücre membranı ve MS iyon kanalı arasındaki etkileşimin kanalın açılma ve kapanma mekanizmalarında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir, ancak MS iyon kanallarından antibiyotiklerin nasıl geçtiklerini gösteren oldukça az sayıda MD simülasyon çalışması bulunmaktadır. EcMscS ve EcMscL gibi MS iyon kanallarında yapılan yapısal çalışmalar bu kanalların geçiş mekanizmalarındaki konformasyonel değişimler hakkında bilgimiz arttıkça antibakteriyel ilaç hedef olarak etkinliklerinin değerlendirilmesi daha detaylı düzeyde olacağını göstermektedir.

EcMscS'nin ilk 3D konformasyonel yapıları X-ışını kristalagrofi yöntemi ile belirlenmiştir. EcMscS'nin üç temel lipid-protein ara yüzü olduğu ve TM1-TM2 sarmal çiftinin membran gerilimini algıladığı bilinmektedir (Bass ve ark., 2002). Bu helikslerin, kanaldan geçişlerde bağımsız olarak hareket eden sert bir sensör paleti oluşturduğu

gösterilmiştir. Membranda gerilim oluştuğunda, TM2 ve TM3a arasındaki bağlayıcı yol ile bu membran gerilimin pora iletildiği ve iyon kanalının bu gerilimle açıldığı bilinmektedir (Wang W. ve ark., 2008). TM1/TM2 por astarlı helezona TM3 kuvvet iletimi için sarmallar arası temasın kaçınılmaz olduğunu göstermiştir. TM2 ve TM3'ün birbirinden uzaklaşması ve ayrılması MscS'nin fonksiyonel olarak devre dışı kalmasıyla sonuçlandığı düşünülmüştür (Belyy ve ark., 2010). Bununla birlikte, TM1 ve TM2 sarmalları içinde yer alan lipid-yüzeyli hidrofobik kalıntıların kapalı durumda lipid kuyruk grupları ile etkileşime girdiği ve kanalın açık durumunda protein içi hidrofobik etkileşimler oluşturmak için içe doğru döndüğü belirlenmiştir (Malcolm ve ark., 2011). Farklı lipid türleriyle oluşturulan membran mikroçevreleri altında incelenen MscS'nin lipid-protein etkileşimlerini etkilediğinden membran gerilim algısında da değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Shaikh ve ark., 2014). MS iyon kanalları ile karşılaştırıldığında MscS'nin lipid çift tabakalı membran ile oldukça dinamik bir etkileşimde olduğu düşünülmektedir (Booth ve ark., 2011).

Bu doktora tezi kapsamında, tek partikül KriyoEM tekniği ile EcMscS:MSP1E3D1:16:1 (1:10:500) nanodisk rekonstitüsyonu sağlandı. Bunun için, MscS'nin ve MSP1E3D1'ın %0.05 DDM ile saflaştırılması, SEC kromatogramında ~8 mL'de simetrik bir ana tepe noktası (P1) olan void volüm (Şekil 3.1.A) maksimum 14 mL'de simetrik bir ana tepe noktası gösterdi. ~12 mL'deki 2. tepe noktasından (P2) toplanan numuneler (B7-8-10) SDS-PAGE'de MscS örneğinin oldukça saf olduğunu göstermektedir. Bir MscS monomerinin MW'si 32.7 kDa olduğu için, SDS-PAGE'de MscS monomeri ~30 kDa görünmektedir. Membran proteinlerinin sıklıkla SDS-PAGE'lerde anormal bir göç gösterebilmektedir. Membran kısmının büyük bir kısmı, SDS bağlanmasını engelleyebilen deterjan molekülleri tarafından korunmasından kaynaklanabilmektedir (Rath ve ark., 2009). EcMscS gibi protein yapıları için DDM ile protein pürifikasyonu ve nanodisk rekonstitüsyonu uranil format negatif boyama ile doğrulandı. Doktora tez projesi kapsamında, %0.05 DDM kullanılarak EcMscS nanodiskler oluşturulmuştur. Bununla birlikte, nanodiske gömülü olarak ilk tek partikül KriyoEM ile EcMscS'nin yapısı, 2.9 Å çözünürlükte elde edildi (Rasmussen ve ark., 2019). Bu çalışmada, $NiSO_4$ ile elde edilen EcMscS nanodiskte negatif mikrograflar görüntülenmiştir. EcMscS'nin 3.4 Å yüksek çözünürlüklü kapalı konformasyonel yapısı için uygun bir içerik olarak görünmektedir.

Bununla birlikte, EcMscS'nin PC:10, PC:14 ve PC:18 gibi nanodisk prosedürlerinde de aynı uygulamalar kullanıldığından çözünürlük için uygun olduğu belirlendi. İlk sınıflandırma, toplanan tüm partiküllerin çoğunun, simetri ekseni Kriyo-EM gridlerinin düzlemine dik olacak şekilde vitrifikasyon aşamasında (buzda) yönlendirildi. Simetri ekseni boyunca bu görünümlere "üstten görünümler" adı verilir. Toplanan partiküllerin (1,536,178) %25'sinden daha fazlası, 3B rekonstrüksiyon için gerekli olan yan görünümler için uygun görülmüştür. Toplanan partiküller 1.3 Å/px kutu boyutunda çıkarıldı. 100 adet sınıf meydana getirildi (Şekil 4.4.B). Yandan görünüm sınıf ortalamaları iki ayrı bölümü (Vestibül ve transmembran domaini) göstermektedir. Görüntünün elde edilebilmesi için 6 adet sınıf oluşturuldu (Şekil 4.4.D) ve son aşamada 3.4 Å'luk genel çözünürlüğe sahip bir nanodiske gömülü EcMscS yapısı elde edildi (Şekil 4.4.E).

Bu doktora tez çalışması kapsamında, MscS nanodisk rekonstitüsyonu oluşturularak elde edilen KriyoEM deneysel verileri MD simülasyon çalışmaları ile karşılaştırıldı (Şekil 4.4.). KriyoEM deneylerinde kullanılan PC:16 lipid türü, MD simülasyon deneylerinde ise nanodisk yapısına uygun DYPC:16 kullanıldı. EcMscS'nin nanodisk yapısı ile elde edilen MD simülasyon çalışmalarından elde edilen bulgular, EcMscS'nin kapalı bir formasyonda kaldığını gösterdi. MS iyon kanallarında membran lipidlerinin çeşidi ve protein arasındaki etkileşimin kanalın açılma ve kapanma mekanizmalarında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Elde edilen bulgular doğrultusunda MscS'nin antibakteriyel ilaç hedefi olarak araştırılmasında membran lipidleri ve protein arasındaki etkileşimlerin daha ayrıntılı araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu doktora tez projesinde, antibakteriyel ilaç potansiyelinin yapısal olarak incelenmesi için EcMscS biyokimyasal ve biyofiziksel teknikler ile tek partikül KriyoEM teknikleri kullanılarak multidisipliner bir yaklaşım uygulanmıştır. EcMscS:MSP1E3D1:(16:1) nanodisk yapısındaki kapalı EcMscS proteini, tek partikül KriyoEM ile ilk kez bu çalışmada çözdürüldü. MD simülasyon teknikleri kullanılarak aynı lipid türü (DYPC 16:1) uygulandığında EcMscS iyon kanalının kapalı formunu koruyabileceği gösterildi. Hücre canlılık testlerinde EcMscS bulunan vahşi tip hücrelerde viyomisinin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı gösterildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doktora tez projemiz kapsamında, EcMscS'nin antibakteriyel ilaç potansiyelinin araştırılması için yapısal biyoloji, biyofizik ve biyokimya teknikleri kullanılarak multidisipliner çalışmalar yürütüldü. Viyomisin antibiyotiğinin MscS içeren *E. coli* suşlarda hücre canlılığına bir etkisi olabileceği in-vivo uygulamalarla gösterildi. Elde edilen bulgular, MD simülasyon bulguları ile karşılaştırıldığında viyomisinin EcMscS boyunca hücre içerisinden geçebilme potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir. KriyoEM teknikleri ile çözdürülen EcMscS, PC:16 ile kapalı konformasyon oluşturduğu ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. KriyoEM verilerinden elde edilen bulgular, MD simülasyon çalışmalarından elde edilen bulgularla karşılaştırıldı ve analiz edildi.

Doktora tez çalışmamızda deneysel ve hesaplamalı yöntemler birlikte kullanılarak multidisipliner bir yaklaşımla elde edilen bulgular, EcMscS aracılığıyla hücre içerisine viyomisinin geçme potansiyelinin olduğunu düşündürmektedir. Ancak, viyomisin antibiyotiğinin hücre içerisinde sitozolik ve TM alanda bulunabileceği konformasyonel durumların sadece MD simülasyonlar ile değil tek partikül KriyoEM teknikleri ile de çözdürülmesi gerektiği düşünülmektedir. Bunun için, tek partikül KriyoEM teknolojisinin ve mevcut kaynakların daha da gelişmiş olmasına ihtiyaç duyulmaktadır. TÜBİTAK ve uluslararası akademik kurum ve kuruluşlar aracılığıyla doktora tez projesinin genişletilerek EcMscS aracılığıyla hücre içerisine antibiyotiklerin geçiş mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik kapsamlı projelerin yürütülmesi ileriye dönük hedeflerimiz arasındadır.

Multidisipliner bir yaklaşımla yürütülen doktora tez projemizde, 2017 yılında Kimya alanında Nobel ödülü alan tek partikül KriyoEM teknolojisinin uygulanması ülkemizde yapısal biyoloji alanına dair ilginin artacağını düşündürmektedir. Son olarak, EcMscS yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile en çok çalışılan MS iyon kanalı olması nedeniyle oldukça önemlidir ve bu konudaki araştırmalar artarak devam etmektedir. MscS'nin insanlarda homologlarının olmaması, hücre içerisinde ozmotik şoka karşı diğer MS iyon kanallarından daha önce yanıt vermesi, hücrede gen ekspresyon seviyelerinin yüksek olması gibi fonksiyonel özellikleri antibakteriyel ilaç tasarımı için önemli avantajlar sağlamaktadır. EcMscS'nin henüz keşfedilmemiş fizyolojik rolleri, hücre membranındaki

lipid mikroçevrenin önemi ve antibakteriyel ilaç hedefi olma gibi özellikleri oldukça merak edilen soruların yanıtlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

MS iyon kanalları ile ilgili deneysel ve hesaplamalı yöntemlerle gerçekleştirilen yapısal çalışmalar, antibiyotiklerin hücre içerisine alınarak hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bununla birlikte, elde edilen yeni bulgular antibakteriyel stres yanıtı olarak bazı aktif maddelerin salınması ve membran gerilmesini taklit eden ozmoprotektanların salınmasına neden olduğu ve antibiyotik duyarlılığın azalmasına katkı sağladığı düşünülmektedir (Carniello ve ark., 2020; Sidarta ve ark., 2022). Bu nedenle, MS iyon kanallarının antibakteriyel ilaç hedefi olarak araştırılan çalışmaların antibiyotiklere karşı oluşturulan hücresel yanıtlarda seçici olarak kullandıkları fizyolojik mekanizmaların da aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B , ve ark. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015; 1: 19-25.

Akitake B, Anishkin A, Liu N, Sukharev S. Straightening and sequential buckling of the pore-lining helices define the gating cycle of mscs. Nature structural & molecular biology. 2007; 14: 1141-1149.

Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev AV. H++ 3.0: Automating p k prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. Nucleic acids research. 2012; 40: W537-W541.

Anishkin A, Akitake B, Kamaraju K, Chiang C, Sukharev S. Hydration properties of mechanosensitive channel pores define the energetics of gating. Journal of Physics: Condensed Matter. 2010; 22: 454120.

Anishkin A, Sukharev S. Water dynamics and dewetting transitions in the small mechanosensitive channel mscs. Biophysical journal. 2004; 86: 2883-2895.

Árnadóttir J, Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels. Annual review of biophysics. 2010; 39: 111-137.

Bargal R, Avidan N, Ben-Asher E, Olender Z, Zeigler M, Frumkin A , ve ark. Identification of the gene causing mucolipidosis type iv. Nature genetics. 2000; 26: 118-122.

Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC. Crystal structure of escherichia coli mscs, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. Science. 2002; 298: 1582-1587.

Bavi N, Nikolaev YA, Bavi O, Ridone P, Martinac AD, Nakayama Y , ve ark. Principles of mechanosensing at the membrane interface. The biophysics of cell membranes: biological consequences. 2017: 85-119.

Bavi N, Richardson J, Heu C, Martinac B, Poole K. Piezo1-mediated currents are modulated by substrate mechanics. ACS nano. 2019; 13: 13545-13559.

Bayburt TH, Grinkova YV, Sligar SG. Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. Nano letters. 2002; 2: 853-856.

Bayburt TH, Sligar SG. Membrane protein assembly into nanodiscs. FEBS letters. 2010; 584: 1721-1727.

Belyy V, Kamaraju K, Akitake B, Anishkin A, Sukharev S. Adaptive behavior of bacterial mechanosensitive channels is coupled to membrane mechanics. Journal of General Physiology. 2010; 135: 641-652.

Berendsen HJ, Postma Jv, Van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of chemical physics. 1984; 81: 3684-3690.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H , ve ark. The protein data bank. Nucleic acids research. 2000; 28: 235-242.

Blount P, Moe PC. Bacterial mechanosensitive channels: Integrating physiology, structure and function. Trends in microbiology. 1999; 7: 420-424.

Booth IR, Blount P. The mscs and mscl families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves. Journal of bacteriology. 2012; 194: 4802-4809.
Booth IR, Miller S, Müller A, Lehtovirta-Morley L. The evolution of bacterial mechanosensitive channels. Cell Calcium. 2015; 57: 140-150.
Booth IR, Rasmussen T, Edwards MD, Black S, Rasmussen A, Bartlett W , ve ark. (2011). Sensing bilayer tension: Bacterial mechanosensitive channels and their gating mechanisms. In: Portland Press Ltd.
Brehm P, Kullberg R, Moody-Corbett F. Properties of non-junctional acetylcholine receptor channels on innervated muscle of xenopus laevis. The Journal of physiology. 1984; 350: 631-648.
Brohawn SG. How ion channels sense mechanical force: Insights from mechanosensitive k2p channels traak, trek1, and trek2. Annals of the New York Academy of Sciences. 2015; 1352: 20-32.
Brohawn SG, Campbell EB, MacKinnon R. Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human traak k+ channel. Nature. 2014; 516: 126-130.
Bröcker C, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. Current Biology. 2010; 20: R943-R952.
Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. Role of adhesion forces in mechanosensitive channel gating in staphylococcus aureus adhering to surfaces. npj Biofilms and Microbiomes. 2020; 6: 31.
Chandler D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. Nature. 2005; 437: 640-647.
Chang G, Spencer RH, Lee AT, Barclay MT, Rees DC. Structure of the mscl homolog from mycobacterium tuberculosis: A gated mechanosensitive ion channel. Science. 1998; 282: 2220-2226.
Chuang Y-C, Chen C-C. Force from filaments: The role of the cytoskeleton and extracellular matrix in the gating of mechanosensitive channels. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022; 10: 886048.
Colbert HA, Smith TL, Bargmann CI. Osm-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation incaenorhabditis elegans. Journal of Neuroscience. 1997; 17: 8259-8269.
Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ , ve ark. Piezo1 and piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. Science. 2010; 330: 55-60.
Coste B, Murthy SE, Mathur J, Schmidt M, Mechioukhi Y, Delmas P , ve ark. Piezo1 ion channel pore properties are dictated by c-terminal region. Nature communications. 2015; 6: 7223.
Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS , ve ark. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. Nature. 2012; 483: 176-181.
Cox CD, Bae C, Ziegler L, Hartley S, Nikolova-Krstevski V, Rohde PR , ve ark. Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals piezo1 is gated by bilayer tension. Nature communications. 2016; 7: 10366.
Cox CD, Bavi N, Martinac B. Origin of the force: The force-from-lipids principle applied to piezo channels. Current topics in membranes. 2017; 79: 59-96.

Cox CD, Bavi N, Martinac B. Biophysical principles of ion-channel-mediated mechanosensory transduction. Cell Reports. 2019; 29: 1-12.
Cox CD, Nomura T, Ziegler C, Campbell AK, Wann KT, Martinac B. Selectivity mechanism of the mechanosensitive channel mscs revealed by probing channel subconducting states. Nature communications. 2013; 4: 2137.
Cox CD, Wann KT, Martinac B. Selectivity mechanisms in mscs-like channels: From structure to function. Channels. 2014; 8: 5-12.
Cunningham CL, Müller U. Molecular structure of the hair cell mechanoelectrical transduction complex. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2019; 9.
Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh ewald: An n· log (n) method for ewald sums in large systems. The Journal of chemical physics. 1993; 98: 10089-10092.
Das A, Franco JA, Wang L, Chapman D, Wang LM, Jaisinghani C , ve ark. Conserved basal lamina proteins, laminin and nidogen, are repurposed to organize mechanosensory complexes responsible for touch sensation. bioRxiv. 2022: 2022.2002. 2011.479800.
Denisov IG, Grinkova YV, Lazarides AA, Sligar SG. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. Journal of the American Chemical Society. 2004; 126: 3477-3487.
Djillani A, Mazella J, Heurteaux C, Borsotto M. Role of trek-1 in health and disease, focus on the central nervous system. Frontiers in Pharmacology. 2019; 10: 379.
Dufrêne YF, Persat A. Mechanomicrobiology: How bacteria sense and respond to forces. Nature Reviews Microbiology. 2020; 18: 227-240.
Dunn SL, Olmedo ML. Mechanotransduction: Relevance to physical therapist practice—understanding our ability to affect genetic expression through mechanical forces. Physical therapy. 2016; 96: 712-721.
Ellinghaus P, Scheubel RJ, Dobrev D, Ravens U, Holtz J, Huetter J , ve ark. Comparing the global mrna expression profile of human atrial and ventricular myocardium with high-density oligonucleotide arrays. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2005; 129: 1383-1390.
English NJ, Waldron CJ. Perspectives on external electric fields in molecular simulation: Progress, prospects and challenges. Physical Chemistry Chemical Physics. 2015; 17: 12407-12440.
Enyedi P, Czirják G. Molecular background of leak k+ currents: Two-pore domain potassium channels. Physiological reviews. 2010; 90: 559-605.
Epstein W, Kim BS. Potassium transport loci in escherichia coli k-12. Journal of Bacteriology. 1971; 108: 639-644.
Evans DJ, Holian BL. The nose–hoover thermostat. The Journal of chemical physics. 1985; 83: 4069-4074.
Eyckmans J, Boudou T, Yu X, Chen CS. A hitchhiker's guide to mechanobiology. Developmental cell. 2011; 21: 35-47.
Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M , ve ark. A neuronal two p domain k+ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. The EMBO journal. 1998; 17: 3297-3308.
Flegler VJ, Rasmussen A, Borbil K, Boten L, Chen H-A, Deinlein H , ve ark. Mechanosensitive channel gating by delipidation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021a; 118: e2107095118.

Flegler VJ, Rasmussen T, Böttcher B. More than just closed and open: Unraveling a mechanosensor. Trends in Biochemical Sciences. 2021b; 46: 623-625.
Flegler VJ, Rasmussen T, Böttcher B. How functional lipids affect the structure and gating of mechanosensitive mscs-like channels. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23: 15071.
Gaub BM, Muller DJ. Mechanical stimulation of piezo1 receptors depends on extracellular matrix proteins and directionality of force. Nano letters. 2017; 17: 2064-2072.
Gordon VD, Wang L. Bacterial mechanosensing: The force will be with you, always. Journal of Cell Science. 2019; 132: jcs227694.
Guharay F, Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. The Journal of physiology. 1984; 352: 685-701.
Guichard M, Thomine S, Frachisse J-M. Mechanotransduction in the spotlight of mechano-sensitive channels. Current Opinion in Plant Biology. 2022; 68: 102252.
Hamill OP, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. Physiological reviews. 2001; 81: 685-740.
Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L , ve ark. Co-assembly of polycystin-1 and-2 produces unique cation-permeable currents. Nature. 2000; 408: 990-994.
Haswell ES. Mscs-like proteins in plants. Current topics in membranes. 2007; 58: 329-359.
Haswell ES, Phillips R, Rees DC. Mechanosensitive channels: What can they do and how do they do it? Structure. 2011; 19: 1356-1369.
Hoffmann T, Boiangiu C, Moses S, Bremer E. Responses of bacillus subtilis to hypotonic challenges: Physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. Applied and environmental microbiology. 2008; 74: 2454-2460.
Hoffmann T, Bremer E. Protection of bacillus subtilis against cold stress via compatible-solute acquisition. Journal of bacteriology. 2011; 193: 1552-1562.
Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, De Groot BL , ve ark. Charmm36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. Nature methods. 2017; 14: 71-73.
Huang Y, Fliegert R, Guse AH, Lü W, Du J. A structural overview of the ion channels of the trpm family. Cell Calcium. 2020; 85: 102111.
Iscla I, Wray R, Blount P. On the structure of the n-terminal domain of the mscl channel: Helical bundle or membrane interface. Biophysical journal. 2008; 95: 2283-2291.
Iscla I, Wray R, Wei S, Posner B, Blount P. Streptomycin potency is dependent on mscl channel expression. Nature communications. 2014; 5: 4891.
Jia Q, Yang Y, Chen X, Yao S, Hu Z. Emerging roles of mechanosensitive ion channels in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. Respiratory Research. 2022; 23: 1-15.
Jiang Y, Yang X, Jiang J, Xiao B. Structural designs and mechanogating mechanisms of the mechanosensitive piezo channels. Trends in biochemical sciences. 2021; 46: 472-488.
Jin P, Jan LY, Jan Y-N. Mechanosensitive ion channels: Structural features relevant to mechanotransduction mechanisms. Annual review of neuroscience. 2020; 43: 207-229.

Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. Charmm-gui: A web-based graphical user interface for charmm. Journal of computational chemistry. 2008; 29: 1859-1865.
Jorgensen W, Chandrasekhar J, Madura J, Impey R, Klein M. Refined tip3p model for water. J Chem Phys. 1983; 79: 926-935.
Kolewe KW, Peyton SR, Schiffman JD. Fewer bacteria adhere to softer hydrogels. ACS applied materials & interfaces. 2015; 7: 19562-19569.
Koprowski P, Grajkowski W, Balcerzak M, Filipiuk I, Fabczak H, Kubalski A. Cytoplasmic domain of mscs interacts with cell division protein ftsz: A possible non-channel function of the mechanosensitive channel in escherichia coli. PLoS One. 2015; 10: e0127029.
Koprowski P, Kubalski A. Voltage-independent adaptation of mechanosensitive channels in escherichia coli protoplasts. The Journal of membrane biology. 1998; 164: 253-262.
Kung C, Martinac B, Sukharev S. Mechanosensitive channels in microbes. Annual review of microbiology. 2010; 64: 313-329.
Lai JY, Poon YS, Kaiser JT, Rees DC. Open and shut: Crystal structures of the dodecylmaltoside solubilized mechanosensitive channel of small conductance from escherichia coli and helicobacter pylori at 4.4 å and 4.1 å resolutions. Protein Science. 2013; 22: 502-509.
Le Roux A-L, Quiroga X, Walani N, Arroyo M, Roca-Cusachs P. The plasma membrane as a mechanochemical transducer. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 2019; 374: 20180221.
Lee J, Cheng X, Jo S, MacKerell AD, Klauda JB, Im W. Charmm-gui input generator for namd, gromacs, amber, openmm, and charmm/openmm simulations using the charmm36 additive force field. Biophysical journal. 2016; 110: 641a.
Lengyel M, Enyedi P, Czirják G. Negative influence by the force: Mechanically induced hyperpolarization via k2p background potassium channels. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22: 9062.
Levina N, Tötemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR. Protection of escherichia coli cells against extreme turgor by activation of mscs and mscl mechanosensitive channels: Identification of genes required for mscs activity. The EMBO journal. 1999; 18: 1730-1737.
Li Y, Hu Y, Wang J, Liu X, Zhang W, Sun L. Structural insights into a plant mechanosensitive ion channel msl1. Cell Reports. 2020; 30: 4518-4527. e4513.
Lolicato M, Arrigoni C, Mori T, Sekioka Y, Bryant C, Clark KA , ve ark. K2p2. 1 (trek-1)–activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. Nature. 2017; 547: 364-368.
Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. Opm database and ppm web server: Resources for positioning of proteins in membranes. Nucleic acids research. 2012; 40: D370-D376.
Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated k+ channels trek-1 and traak. Journal of Biological Chemistry. 2000; 275: 10128-10133.
Malcolm HR, Heo Y-Y, Elmore DE, Maurer JA. Defining the role of the tension sensor in the mechanosensitive channel of small conductance. Biophysical journal. 2011; 101: 345-352.

Martinac B. 2021 nobel prize for mechanosensory transduction. Biophysical Reviews. 2022; 14: 15-20.
Martinac B, Adler J, Kung C. Mechanosensitive ion channels of e. Coli activated by amphipaths. Nature. 1990; 348: 261-263.
Martinac B, Buechner M, Delcour AH, Adler J, Kung C. Pressure-sensitive ion channel in escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1987; 84: 2297-2301.
Martino F, Perestrelo AR, Vinarský V, Pagliari S, Forte G. Cellular mechanotransduction: From tension to function. Frontiers in physiology. 2018; 9: 824.
Moe PC, Levin G, Blount P. Correlating a protein structure with function of a bacterial mechanosensitive channel* 210. Journal of Biological Chemistry. 2000; 275: 31121-31127.
Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the trp superfamily of cation channels. Science's STKE. 2001; 2001: re1-re1.
Murthy SE, Dubin AE, Patapoutian A. Piezos thrive under pressure: Mechanically activated ion channels in health and disease. Nature reviews Molecular cell biology. 2017; 18: 771-783.
Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR , ve ark. Osca/tmem63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. Elife. 2018; 7: e41844.
Nematian-Ardestani E, Abd-Wahab F, Chatelain FC, Sun H, Schewe M, Baukrowitz T , ve ark. Selectivity filter instability dominates the low intrinsic activity of the twik-1 k2p k+ channel. Journal of Biological Chemistry. 2020; 295: 610-618.
Nikolaev Y, Cox CD, Ridone P, Rohde PR, Cordero-Morales JF, Vasquez V , ve ark. Mammalian trp ion channels are insensitive to membrane stretch. Biophysical Journal. 2020; 118: 22a.
Nikolova-Krstevski V, Wagner S, Yu ZY, Cox CD, Cvetkovska J, Hill AP , ve ark. Endocardial trpc-6 channels act as atrial mechanosensors and load-dependent modulators of endocardial/myocardial cross-talk. Basic to Translational Science. 2017; 2: 575-590.
Park YC, Reddy B, Bavi N, Perozo E, Faraldo-Gómez JD. State-specific morphological deformations of the lipid bilayer explain mechanosensitive gating of mscs ion channels. Biophysical Journal. 2023; 122: 160a.
Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. Journal of Applied physics. 1981; 52: 7182-7190.
Perozo E, Rees DC. Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. Current opinion in structural biology. 2003; 13: 432-442.
Persat A. Bacterial mechanotransduction. Current opinion in microbiology. 2017; 36: 1-6.
Pivetti CD, Yen M-R, Miller S, Busch W, Tseng Y-H, Booth IR , ve ark. Two families of mechanosensitive channel proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2003; 67: 66-85.
Pliotas C, Dahl ACE, Rasmussen T, Mahendran KR, Smith TK, Marius P , ve ark. The role of lipids in mechanosensation. Nature structural & molecular biology. 2015; 22: 991-998.
Pliotas C, Naismith JH. Spectator no more, the role of the membrane in regulating ion channel function. Current opinion in structural biology. 2017; 45: 59-66.

Porter KA, Xia B, Beglov D, Bohnuud T, Alam N, Schueler-Furman O , ve ark. Cluspro peptidock: Efficient global docking of peptide recognition motifs using fft. Bioinformatics. 2017; 33: 3299-3301.
Pruitt BL, Dunn AR, Weis WI, Nelson WJ. Mechano-transduction: From molecules to tissues. PLoS biology. 2014; 12: e1001996.
Pumroy RA, Fluck III EC, Ahmed T, Moiseenkova-Bell VY. Structural insights into the gating mechanisms of trpv channels. Cell Calcium. 2020; 87: 102168.
Qi Y, Lee J, Klauda JB, Im W. Charmm-gui nanodisc builder for modeling and simulation of various nanodisc systems. Journal of Computational Chemistry. 2019; 40: 893-899.
Rasmussen T, Flegler VJ, Rasmussen A, Böttcher B. Structure of the mechanosensitive channel mscs embedded in the membrane bilayer. Journal of molecular biology. 2019; 431: 3081-3090.
Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous sds-page migration of membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009; 106: 1760-1765.
Reddy B, Bavi N, Lu A, Park Y, Perozo E. Molecular basis of force-from-lipids gating in the mechanosensitive channel mscs. Elife. 2019; 8: e50486.
Ridone P, Vassalli M, Martinac B. Piezo1 mechanosensitive channels: What are they and why are they important. Biophysical reviews. 2019; 11: 795-805.
Ritchie T, Grinkova Y, Bayburt T, Denisov I, Zolnerciks J, Atkins W , ve ark. Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. Methods in enzymology. 2009; 464: 211-231.
Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HJ. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. Journal of computational physics. 1977; 23: 327-341.
Schöning-Stierand K, Diedrich K, Ehrt C, Flachsenberg F, Graef J, Sieg J , ve ark. Proteins plus: A comprehensive collection of web-based molecular modeling tools. Nucleic Acids Research. 2022; 50: W611-W615.
Schöning-Stierand K, Diedrich K, Fährrolfes R, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E , ve ark. Proteins plus: Interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. Nucleic acids research. 2020; 48: W48-W53.
Schumann U, Edwards MD, Rasmussen T, Bartlett W, Van West P, Booth IR. Ybdg in escherichia coli is a threshold-setting mechanosensitive channel with mscm activity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; 107: 12664-12669.
Shaikh S, Cox CD, Nomura T, Martinac B. Energetics of gating mscs by membrane tension in azolectin liposomes and giant spheroplasts. Channels. 2014; 8: 321-326.
Sidarta M, Baruah L, Wenzel M. Roles of bacterial mechanosensitive channels in infection and antibiotic susceptibility. Pharmaceuticals. 2022; 15: 770.
Sotomayor M, Schulten K. Molecular dynamics study of gating in the mechanosensitive channel of small conductance mscs. Biophysical journal. 2004; 87: 3050-3065.
Sotomayor M, Van Der Straaten TA, Ravaioli U, Schulten K. Electrostatic properties of the mechanosensitive channel of small conductance mscs. Biophysical journal. 2006; 90: 3496-3510.
Steinbacher S, Bass R, Strop P, Rees DC. Structures of the prokaryotic mechanosensitive channels mscl and mscs. Current topics in membranes. 2007; 58: 1-24.

Sukharev S, Betanzos M, Chiang C-S, Guy HR. The gating mechanism of the large mechanosensitive channel mscl. Nature. 2001a; 409: 720-724.
Sukharev S, Durell SR, Guy HR. Structural models of the mscl gating mechanism. Biophysical journal. 2001b; 81: 917-936.
Sukharev SI, Blount P, Martinac B, Blattner FR, Kung C. A large-conductance mechanosensitive channel in e. Coli encoded by mscl alone. Nature. 1994; 368: 265-268.
Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney Jr JW. The mammalian trpc cation channels. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2004; 1742: 21-36.
Wahome PG, Setlow P. The synthesis and role of the mechanosensitive channel of large conductance in growth and differentiation of bacillus subtilis. Archives of microbiology. 2006; 186: 377-383.
Walton TA, Rees DC. Structure and stability of the c-terminal helical bundle of the e. Coli mechanosensitive channel of large conductance. Protein Science. 2013; 22: 1592-1601.
Wang J, Jiang J, Yang X, Zhou G, Wang L, Xiao B. Tethering piezo channels to the actin cytoskeleton for mechanogating via the cadherin-β-catenin mechanotransduction complex. Cell Reports. 2022; 38.
Wang L, Zhou H, Zhang M, Liu W, Deng T, Zhao Q , ve ark. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel piezo2. Nature. 2019; 573: 225-229.
Wang W, Black SS, Edwards MD, Miller S, Morrison EL, Bartlett W , ve ark. The structure of an open form of an e. Coli mechanosensitive channel at 3.45 å resolution. Science. 2008; 321: 1179-1183.
Wayne R. The excitability of plant cells: With a special emphasis on characean internodal cells. The Botanical Review. 1994; 60: 265-367.
Webb B, Sali A. Comparative protein structure modeling using modeller. Current protocols in bioinformatics. 2016; 54: 5.6. 1-5.6. 37.
Wenzel M, Chiriac AI, Otto A, Zweytick D, May C, Schumacher C , ve ark. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014; 111: E1409-E1418.
Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR , ve ark. Drugbank 5.0: A major update to the drugbank database for 2018. Nucleic acids research. 2018; 46: D1074-D1082.
Wray R, Iscla I, Blount P. Curcumin activation of a bacterial mechanosensitive channel underlies its membrane permeability and adjuvant properties. PLoS pathogens. 2021; 17: e1010198.
Wray R, Iscla I, Gao Y, Li H, Wang J, Blount P. Dihydrostreptomycin directly binds to, modulates, and passes through the mscl channel pore. PLoS biology. 2016; 14: e1002473.
Zhang H, Wang C, Zhang K, Kamau PM, Luo A, Tian L , ve ark. The role of trpa1 channels in thermosensation. Cell Insight. 2022: 100059.
Zhang X, Wang J, Feng Y, Ge J, Li W, Sun W , ve ark. Structure and molecular mechanism of an anion-selective mechanosensitive channel of small conductance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012; 109: 18180-18185.

Zhang Y, Daday C, Gu R-X, Cox CD, Martinac B, de Groot BL , ve ark. Visualization of the mechanosensitive ion channel mscs under membrane tension. Nature. 2021; 590: 509-514.

Zhong D, Blount P. Phosphatidylinositol is crucial for the mechanosensitivity of mycobacterium tuberculosis mscl. Biochemistry. 2013; 52: 5415-5420.

Zhu L, Zhao W, Yan Y, Liao X, Bourtsalas A, Dan Y , ve ark. Interaction between mechanosensitive channels embedded in lipid membrane. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2020; 103: 103543.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	**Segün**	**Uyruğu**	**TC**
Soyadı	**Doğru Yaşar**	**Tel no**	
Doğum tarihi		**e-posta**	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		**Mezuniyet yılı**
Lise	**Antalya Gazi Anadolu Lisesi**	**2009**
Lisans	**Akdeniz Üniversitesi**	**2013**
Yüksek Lisans	**Akdeniz Üniversitesi**	**2017**
Doktora	**Akdeniz Üniversitesi**	**2023**

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (yıl-yıl)**
-	**-**	**-**

Yabancı Dilleri	**Sınav türü**	**Puanı**
İngilizce	**YÖKDİL**	**85**

Proje Deneyimi

Proje Adı	**Destekleyen kurum**	**Süre (Yıl-Yıl)**
Gestasyonel diyabette mikroRNA-223'ün plasentadaki ekspresyonunun değerlendirilmesi	BAP	2015-2017
Normal ve diyabetik maternal lökositlerde CX3CR1 ekspresyonu dağılımının akım sitometri ve western blot yöntemleriyle belirlenmesi	TÜBİTAK	2016-2017
Ürik asitle indüklenen vasküler düz kas hücrelerinde oksidatif stresin apoptozis sinyal yolakları ve proliferasyon üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi	BAP	2018-2021
Küçük iletkenlikli mekanosensitif iyon kanalı (MscS)'nın antibakteriyel ilaç hedefi olarak yapısal değişimlerinin incelenmesi	BAP	2021-2023

Burslar-Ödüller:

1. **TÜBİTAK 2211-C:** Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı (2019/3) [Bursiyer No:1649B031905879]
2. **TÜBİTAK 2214-A:** Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (2020/2) [Bursiyer No:1059B142000628]

Yayınlar ve Bildiriler:

1. Yasar E, Yasar MM, **Dogru S**, Yaras N, Eroglu E. "Effects of Angiotensin 1-7 Binding on the Dynamics of Human MAS Proto-oncogene, GPCR: A Molecular Dynamics Study." *Journal of Computational Biophysics and Chemistry* (2023): 1-18.
2. **Dogru S**, Yasar E, Yesilkaya A. "Uric acid can enhance MAPK pathway-mediated proliferation in rat primary vascular smooth muscle cells via controlling of mitochondria and caspase-dependent cell death." *Journal of Receptor and Signal Transduction* 42.3 (2022): 293-301.
3. **Dogru S**, Yasar E, Yesilkaya A. "Uric Acid may Induce Proliferation of Rat Primary Vascular Smooth Muscle Cells Through Mapk Signaling Pathways via Triggers Inhibition of Apoptosis via Mitochondrial and Caspase-Dependently." *Turkish Journal of Biochemistry* 46.3 (2021): 45.
4. Unek G, Cetinkaya B, **Dogru S**, Dogum K, Molbay M, Ozmen A, Yanar K, Kipmen Korgun D, Koksoy S, Sakinci M, Korgun E. "Expression of glucose transporters in the human amnion derived mesenchymal stromal cells under normoglycemic and hyperglycemic conditions." *Biologia* (2020) 75, 299-308.
5. **Dogru S**, Sakinci M, Kipmen Korgun D. "Assessment of mirRNA-223 expression on placenta in gestational diabetes." *XV. National Congress of Medical Biology and Genetics* (2017): 168.
6. **Dogru S**, Unek G, Koksoy S, Kipmen Korgun D, Korgun E. "Proliferation in the human amnion derived mesenchymal stem cells under hyperglycemic conditions." *The FEBS Journal* (2016): 03.3-027.

7. Kipmen Korgun D, Unek G, Cetinkaya B, **Dogru S**, Dogum K, Molbay M, Ozmen A, Koksoy S, Korgun E. “Glucose transporter proteins in the human amnion derived mesenchymal stem cells.” *The FEBS Journal* (2016): 03.3-013.