

T.C
MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SARS-COV-2 YAPISAL OLMAYAN PROTEİN-13 (HELİKAZ)
MUTASYONLARININ PROTEİN YAPIDA ORTAYA ÇIKARABİLECEĞİ
DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

MEHMET EMİN ALHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

ŞUBAT 2024

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “SARS-CoV-2 Yapısal Olmayan Protein-13 (Helikaz) Mutasyonlarının Protein Yapıda Ortaya Çıkarabileceği Değişimlerin İncelenmesi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Mehmet Emin ALHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SARS-COV-2 YAPISAL OLMAYAN PROTEİN-13 (HELİKAZ) MUTASYONLARININ PROTEİN YAPIDA ORTAYA ÇIKARABİLECEĞİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

Mehmet Emin ALHAN

Malatya Turgut Özal Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

92 + xv sayfa

2024

Danışman: Doç. Dr. Ekrem AKBULUT

Korona Virüs Hastalığı 2019, şiddetli akut solunum sendromu Koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2)'nin patolojik etmen olduğu viral bir hastalıktır. SARS-CoV-2 helikaz (yapısal olmayan protein-13), viral genomun replikasyonu sürecinde hayati bir role sahiptir. SARS-CoV-2 helikaz viral replikasyonun baskılanması amacı ile geliştirilecek antiviral ilaç çalışmalarının odağında yer almaktadır. Mutasyonlar protein yapı ve stabilitesinde değişikliklere neden olarak hastalığın seyri ve antivirallerin yanıtlarını etkileyebilmektedir. Bu çalışmada SARS-CoV-2 helikaz proteinini kodlayan nsp13'deki mutasyonların protein yapı ve stabilitesinde ortaya çıkarabileceği değişimler hastalığın seyrinin anlaşılması ve geçerli antivirallerin geliştirilmesi çalışmalarına katkı sunmak amacı ile araştırıldı.

SARS-CoV-2 virüsü ile enfekte 1616 Avrupa ve 2483 Amerika izolatına ait nsp13 sekans verileri Mega XI yazılımı kullanılarak derlendi. Amerika izolatlarında 7 (Ser36Pro, Thr127Asn, His164Tyr, Met233Ile, Ala368Val, Ala389Val, Thr599Ile), Avrupa izolatlarında 2 (Pro77Leu, Gly170Ser) ve her iki izolatta ortak olan 2 (Tyr324Cys, Arg394Cys) mutasyon belirlendi. Mutant protein yapıları Robetta aracı ile modellendi. Model kaliteleri Molprobit ve QMEAN araçları kullanılarak değerlendirildi. Model kalite skorlarının kabul edilebilir aralıkta olduğu tespit edildi. Mutasyonların protein yapı ve stabilitesi üzerindeki etkileri SDM2, mCSM, DUET ve DynaMut2 araçları kullanılarak analiz edildi. Bu mutasyonların on tanesi (Ser36Pro, Pro77Leu, Thr127Asn, Gly170Ser, Met233Ile, Thr324Cys, Ala368Val, Ala389Val, Arg392Cys, Thr599Ile) protein stabilitesinde azalmaya ($-4.37 \leq \Delta\Delta G^{stability} \leq -0.005$) neden olurken, bir tanesi (His164Tyr) protein stabilitesinde artış ile sonuçlandı ($0.003 \leq \Delta\Delta G^{stability} \leq 1.51$).

Sonuç olarak nsp13'deki topolojik ve stabilite değişimleri, terapötiklerin etkinliğinde değişikliğe neden olabilir. SARS-CoV-2'nin nsp13'ü için Avrupa ve Amerika izolatlarında görülen farklı mutasyonlar viral etkinlik açısından farklı fenotiplerin ortaya çıkışına neden olabilir. Farklı coğrafik bölgelerde farklı tedavi yaklaşımları virüse karşı yürütülen mücadele çalışmalarını başarıya ulaştırabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: SARS-CoV-2, COVID-19, nsp13, helikaz, homoloji modelleme, mutasyon, protein stabilite

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE CHANGES THAT CAN BE OCCURRED IN THE PROTEIN STRUCTURE CAUSED BY SARS-COV-2 NON-STRUCTURAL PROTEİN-13 (HELICASE) MUTATIONS

Mehmet Emin ALHAN

Malatya Turgut Özal University
Institute of Graduate Studies
Department of Biomedical Engineering

92 + xv sayfa

2024

Supervisor: Doç. Dr. Ekrem AKBULUT

Corona Virus Disease 2019 is a viral disease in which severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the pathological agent. SARS-CoV-2 helicase (non-structural protein-13) has a vital role in the process of replication of the viral genome. SARS-CoV-2 helicase is at the center of antiviral drug studies to be developed to suppress viral replication. Mutations may affect the course of the disease and the responses of antivirals by causing changes in protein structure and stability. In this study, the changes that mutations in nsp13, which encodes the SARS-CoV-2 helicase protein, may cause in protein structure and stability were investigated in order to contribute to the understanding of the course of the disease and the development of valid antivirals.

The sequence data of 1616 European, and 2483 American isolates infected with the SARS-CoV-2 virus were compiled using Mega XI software. Seven mutations (Ser36Pro, Thr127Asn, His164Tyr, Met233Ile, Ala368Val, Ala389Val, Thr599Ile) in American isolates, two mutations (Pro77Leu, Gly170Ser) in European isolates, and two mutations (Tyr324Cys, Arg394Cys) common to both isolates were identified. Mutant protein structures were modeled with the Robetta tool. Model quality was evaluated using Molprobit and QMEAN tools. The model quality scores were found to be within the acceptable range. The effects of mutations on protein structure and stability were analyzed using SDM2, mCSM, DUET and DynaMut2 tools. Ten of these mutations (Ser36Pro, Pro77Leu, Thr127Asn, Gly170Ser, Met233Ile, Thr324Cys, Ala368Val, Ala389Val, Arg392Cys, Thr599Ile) caused a decrease in protein stability ($-4.37 \leq \Delta\Delta G_{stability} \leq -0.005$), while one of them (His164Tyr) resulted in increased protein stability ($0.003 \leq \Delta\Delta G_{stability} \leq 1.51$).

Consequently, topological and stability changes in nsp13 may lead to changes in the effectiveness of therapeutics. Different mutations for nsp13 of SARS-CoV-2 seen in European and American isolates may lead to the emergence of different phenotypes in terms of viral activity. Different treatment approaches in different geographical regions can make the fight against the virus successful.

KEYWORDS: SARS-CoV-2, COVID-19, nsp13, helicase, homology modeling, mutation, protein stability

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, sabırla ve ilgiyle bana yol gösteren, saygıdeğer hocam, Doç. Dr. Ekrem AKBULUT'a ve hayatım boyunca desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma Malatya Turgut Özal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 2022/13 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

This work has been supported by Malatya Turgut Özal University Scientific Research Projects Coordination Unit under grant number 2022/13.

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Koronavirüsler.....	2
1.1.1. SARS-CoV-2 Genom Yapısı.....	4
1.1.1.1. Yapısal Proteinler	5
1.1.1.2. Yapısal Olmayan Proteinler	6
1.1.1.2.1. Helikaz (nsp13).....	10
2. KAYNAK ÖZETİ.....	13
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Çalışma Grubu.....	19
3.2. Protein Modelleme	19
3.2.1. Homoloji Modelleme	20
3.2.1.1. Homoloji Modelleme Adımları	20
3.2.1.1.1. Katlanma Tanımlama ve Şablon Seçimi	21
3.2.1.1.2. Dizi Hizalama	22
3.2.1.1.3. Model Oluşturma	23
3.2.1.1.4. Model İyileştirme ve Değerlendirme	25
3.2.2. Derin Öğrenme Algoritmaları ile Modelleme (trRosetta / Robetta)	26
3.3. Protein Model Kalitesinin Değerlendirilmesi	27
3.3.1. QMEAN	28

3.3.2. MolProbity	28
3.4. Protein Stabilitesinin Analizi	29
3.4.1. SDM2	29
3.4.2. mCSM	30
3.4.3. DUET	30
3.4.4. DynaMut2	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları	34
4.1.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Yabanıl Tip Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları	34
4.1.1.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Yabanıl Tip Homoloji Modelleri ..	34
4.1.1.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Yabanıl Tip Homoloji Modellerinin Molprobity Kalite Skorları	35
4.1.1.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Yabanıl Tip Homoloji Modellerinin QMEAN Kalite Skorları	36
4.1.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Amerika İzolatları Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları	38
4.1.2.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Amerika İzolatları Homoloji Modelleri	38
4.1.2.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Amerika İzolatları Homoloji Modellerinin Molprobity Kalite Skorları	39
4.1.2.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Amerika İzolatları Homoloji Modellerinin QMEAN Kalite Skorları	40
4.1.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Avrupa İzolatları Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları	42
4.1.3.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Avrupa İzolatları Homoloji Modelleri	42
4.1.3.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Avrupa İzolatları Homoloji Modellerinin Molprobity Kalite Skorları	43
4.1.3.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Avrupa İzolatları Homoloji Modellerinin QMEAN Kalite Skorları	44
4.2. Protein Stabilite Analizleri	46

4.2.1. SARS-CoV-2 nsp13 Proteini Model 1’de Görülen Mutasyonlar	49
4.2.1.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	49
4.2.1.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	52
4.2.1.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar	53
4.2.2. SARS-CoV-2 nsp13 Proteini Model 2’de Görülen Mutasyonlar	54
4.2.2.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	54
4.2.2.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	58
4.2.2.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar	59
4.2.3. SARS-CoV-2 nsp13 Proteini Model 3’te Görülen Mutasyonlar	60
4.2.3.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	60
4.2.3.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	63
4.2.3.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar	64
4.2.4. SARS-CoV-2 nsp13 Proteini Model 4’te Görülen Mutasyonlar	65
4.2.4.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	65
4.2.4.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	69
4.2.4.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar	70
4.2.5. SARS-CoV-2 nsp13 Proteini Model 5’te Görülen Mutasyonlar	71
4.2.5.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	71
4.2.5.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar	74
4.2.5.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	77
6. KAYNAKÇA	80
ÖZGEÇMİŞ	92

KISALTMALAR VE SİMGELER

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
%	: Yüzde
C α	: α Karbon atomu
C β	: β Karbon atomu
θ	: Teta
ω	: Omega
φ	: Fi
kb	: Kilobaz
nm	: Nanometre
kDa	: Kilodalton
3B	: 3 Boyutlu
$\Delta\Delta G$	: Yabanıl tip ve mutant arasındaki serbest enerji farkı
RNA	: Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
CoV	: Koronavirüs
IBV	: Bulaşıcı Bronşit Virüsü
CrCoV	: Köpek Solunum Koronavirüsü
MHV	: Fare Hepatit Virüsü
BCV	: Sığır Koronavirüsü
TCV	: Hindi Koronavirüsü
TGEV	: Bulaşıcı Gastroentrit Virüsü
SARS-CoV	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
MERS-CoV	: Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
SARS-CoV-2	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü-2
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı 2019
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
ACE2	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim-2
nsp	: Yapısal olmayan protein

RdRp	: RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
mRNA	: Mesajcı RNA
PHB1	: Prohibitin-1
PHB2	: Prohibitin-2
PL-Pro	: Papain Benzeri Proteaz
ssRNA	: Tek sarmal RNA
dsRNA	: Çift iplikli RNA
SAM	: S- adenzilmetiyonin
ZBD	: Çinko Bağlanma Alanı
GISAID	: Tüm Grip Verilerinin Paylaşılmasına Yönelik Küresel Girişim
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
iSNV	: Konak İçi Tek Nükleotid Varyantları
RT-PCR	: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PDB	: Protein Veri Bankası
RMSD	: Kök Ortalama Kare Sapması
CASP	: Protein Yapı Tahmininin Kritik Değerlendirilmesi
TrRosetta	: Dönüşüm Kısıtlı Rosetta
MSA	: Çoklu Dizi Hizalaması
QMEAN	: Niteliksel Model Enerji Analizi
ESST	: Ortama Özgü İkame Tabloları
CSM	: Kesinti Tarama Matrisi
mCSM	: Mutasyon Kesinti Tarama Matrisi
SVM	: Destek Vektör Makineleri
NMA	: Normal Mod Analizi
TBK1	: İnsan Serin/Treonin Protein Kinazı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. RNA virüslerinin sınıflandırılması.....	1
Şekil 1.2. Koronavirüs aile ağacı.....	2
Şekil 1.3. Koronavirüslerin filogenetik sınıflandırılması.....	2
Şekil 1.4. SARS-CoV-2 genomik organizasyonu	4
Şekil 1.5. SARS-CoV-2 yapısal proteinleri	5
Şekil 1.6. CoV Spike hücresi ile konak hücrenin etkileşimi	5
Şekil 1.7. SARS-CoV-2 yapısal olmayan proteinlerin genom organizasyonu.....	6
Şekil 1.8. Viral replikasyonda RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) modeli.....	8
Şekil 1.9. Nsp1 ve 40S ribozomal alt birimi arasındaki etkileşim	8
Şekil 1.10. SARS-CoV-2 nsp13'ün genel yapısı.....	11
Şekil 3.1. Homoloji modelleme adımları	21
Şekil 3.2. Homoloji modellemede model oluşturma aşamaları.....	23
Şekil 3.3. C α -C β bağı etrafındaki χ 1 burulma açısı.....	25
Şekil 3.4. trRosetta protokolünün akış şeması	27
Şekil 4.1. Avrupa izolatlarına ait protein sekans verisi toplu gösterimi	31
Şekil 4.2. Amerika izolatlarına ait protein sekans verisi toplu gösterimi	32
Şekil 4.3. SARS-CoV-2'nin nsp13'ünün Avrupa ve Amerika izolatlarından elde edilen mutasyon verilerinin referans dizi ile hizalanmış gösterimi	33
Şekil 4.4. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini yabancı tip homoloji modelleri.....	34
Şekil 4.5. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini yabancı tip homoloji modellerinin QMEAN kalite skorları.....	36
Şekil 4.6. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini yabancı tip homoloji modellerinin Z-kalite skorları	37
Şekil 4.7. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatları homoloji modelleri ..	38
Şekil 4.8. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarının homoloji modellerinin QMEAN kalite skorları	40
Şekil 4.9. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarının homoloji modellerinin Z-kalite skorları.....	41

Şekil 4.10. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatları homoloji modelleri ..	42
Şekil 4.11. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarının homoloji modellerinin QMEAN kalite skorları	44
Şekil 4.12. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarının homoloji modellerinin Z-kalite skorları.....	45
Şekil 4.13. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	49
Şekil 4.14. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	49
Şekil 4.15. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	50
Şekil 4.16. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	50
Şekil 4.17. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	51
Şekil 4.18. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	51
Şekil 4.19. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	52
Şekil 4.20. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	52
Şekil 4.21. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	53
Şekil 4.22. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	53
Şekil 4.23. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	54
Şekil 4.24. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	54
Şekil 4.25. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	55
Şekil 4.26. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	55

Şekil 4.27. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	56
Şekil 4.28. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	56
Şekil 4.29. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	57
Şekil 4.30. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	57
Şekil 4.31. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	58
Şekil 4.32. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	58
Şekil 4.33. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	59
Şekil 4.34. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	59
Şekil 4.35. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	60
Şekil 4.36. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	60
Şekil 4.37. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	61
Şekil 4.38. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	61
Şekil 4.39. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	62
Şekil 4.40. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	62
Şekil 4.41. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	63
Şekil 4.42. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	63
Şekil 4.43. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	64

Şekil 4.44. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	64
Şekil 4.45. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	65
Şekil 4.46. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	65
Şekil 4.47. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	66
Şekil 4.48. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	66
Şekil 4.49. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	67
Şekil 4.50. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	67
Şekil 4.51. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	68
Şekil 4.52. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	68
Şekil 4.53. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	69
Şekil 4.54. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	69
Şekil 4.55. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	70
Şekil 4.56. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	70
Şekil 4.57. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	71
Şekil 4.58. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	71
Şekil 4.59. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	72
Şekil 4.60. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	72

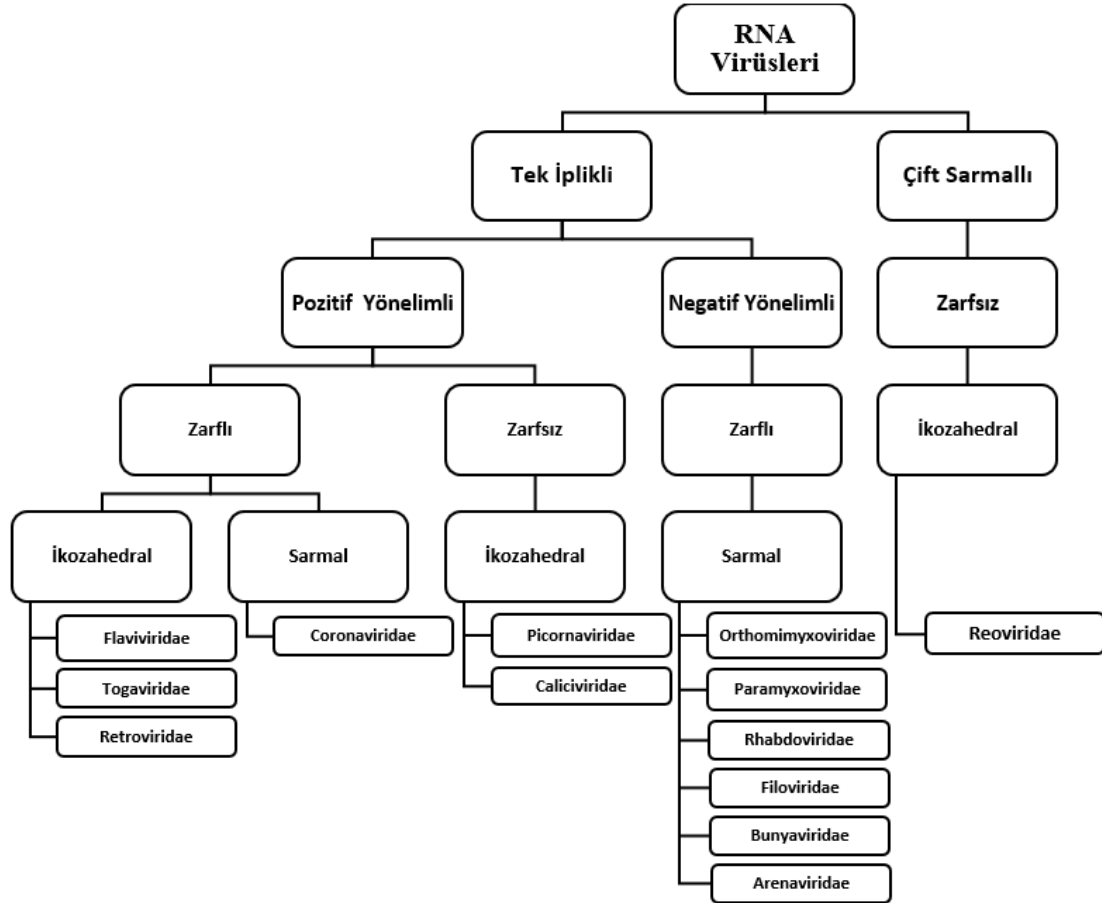
Şekil 4.61. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	73
Şekil 4.62. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	73
Şekil 4.63. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	74
Şekil 4.64. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	74
Şekil 4.65. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	75
Şekil 4.66. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	75
Şekil 4.67. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnsanı enfekte edebilen koronavirüs ailesi üyeleri	3
Çizelge 1.2. SARS-CoV-2 yapısal olmayan proteinlerin varsayılan işlevleri	7
Çizelge 4.1. Yabanıl tip SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Molprobity kalite değerleri	35
Çizelge 4.2. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarının Molprobity kalite değerleri.....	39
Çizelge 4.3. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarının Molprobity kalite değerleri.....	43
Çizelge 4.4. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 1 için protein stabilite analiz sonuçları	46
Çizelge 4.5. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 2 için protein stabilite analiz sonuçları	47
Çizelge 4.6. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 3 için protein stabilite analiz sonuçları	47
Çizelge 4.7. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 4 için protein stabilite analiz sonuçları	48
Çizelge 4.8. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 5 için protein stabilite analiz sonuçları	48

1. GİRİŞ

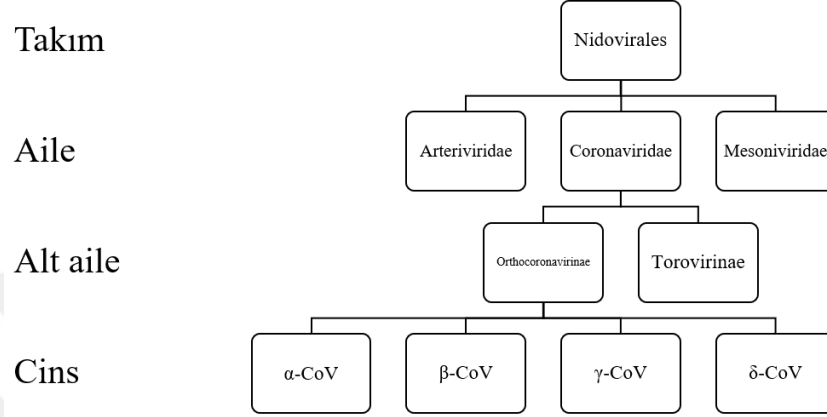
Virüsler, canlı hücrelerde çoğalan, gözle ve normal mikroskoplarla görülemeyecek kadar küçük enfeksiyon ajanlarıdır. Replikasyonla çoğalırlar ve bunun için bir konak hücreye ihtiyaç duyarlar. Metabolizmaları, hücresel mekanizmaları ve organelleri yoktur. Hayvan, bitki, bakteri ve arkealar dahil olmak üzere birçok canlıyı enfekte edebilirler. Virüsler, koruyucu bir protein olan kapsid ile çevrili DNA (Deoksiribonükleik Asit) ya da RNA (Ribonükleik Asit) genetik materyalinden meydana gelirler. Genetik materyal olarak DNA molekülüne sahip virüsler “DNA virüsü” olarak adlandırılırken RNA molekülüne sahip virüsler “RNA virüsü” olarak adlandırılır [1,2]. Şekil 1.1’de [3] RNA virüslerinin sınıflandırılması gösterilmektedir.



Şekil 1.1. RNA virüslerinin sınıflandırılması [3]

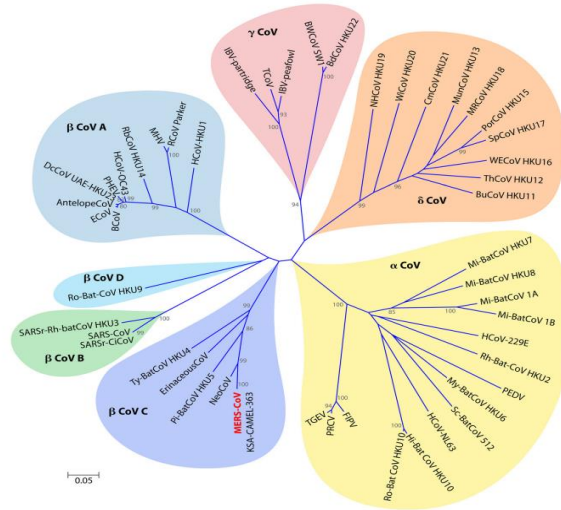
1.1. Koronavirüsler

Koronavirüsler (CoV), RNA virüsleridir ve *Nidovirales* takımı, *Coronaviridae* ailesi, *Orthocoronavirinae* alt ailesi içerisinde yer alırlar [4] (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Koronavirüs aile ağacı (Yasmin [5]’den değiştirilerek alınmıştır)

Koronavirüsler; alfakoronavirüs (α -CoV), betakoronavirüs (β -CoV), gamakoronavirüs (γ -CoV) ve deltakoronavirüs (δ -CoV) olmak üzere dört cinsten oluşurlar [6] (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Koronavirüslerin filogenetik sınıflandırılması [7]

1960 yılından beri varlığı bilinen koronavirüsler, hayvan ve insanlara bulaşıp onlarda hastalığa neden olabilmektedir [8]. γ ve δ koronavirüsleri hayvanları enfekte eden

cinslerdir [4]. Bulaşıcı bronşit virüsü (IBV), köpek solunum koronavirüsü (CRCoV), fare hepatit virüsü (MHV), sığır koronavirüsü (BCV), hindi koronavirüsü (TCV) ve bulaşıcı gastroenterit virüsü (TGEV) hayvanlarda hastalığa neden olan koronavirüs türlerine örnektir [6]. Koronavirüslerin α ve β cinsleri ise insanı enfekte eden koronavirüs ailesine mensuptur [9]. Bu virüsler ilk olarak soğuk algınlığı olan hastaların burun salgılarından tanımlanmıştır [10]. Çizelge 1.1’de [11] insanı enfekte edebilen koronavirüs ailesinin üyeleri sınıflandırılmıştır.

Çizelge 1.1. İnsanı enfekte edebilen koronavirüs ailesi üyeleri [11]

Virüs	Cins	Konak	Semptom
İnsan CoV-229E	Alfakoronavirüs	İnsan	Hafif solunum yolu enfeksiyonu
İnsan CoV-NL63	Alfakoronavirüs	İnsan	Hafif solunum yolu enfeksiyonu
İnsan CoV-HKU1	Betakoronavirüs	İnsan	Pnömoni
İnsan CoV-OC43	Betakoronavirüs	İnsan	Hafif solunum yolu enfeksiyonu
SARS-CoV	Betakoronavirüs	İnsan	Şiddetli akut solunum sendromu
MERS-CoV	Betakoronavirüs	İnsan	Şiddetli akut solunum sendromu
SARS-CoV-2	Betakoronavirüs	İnsan	Şiddetli akut solunum sendromu

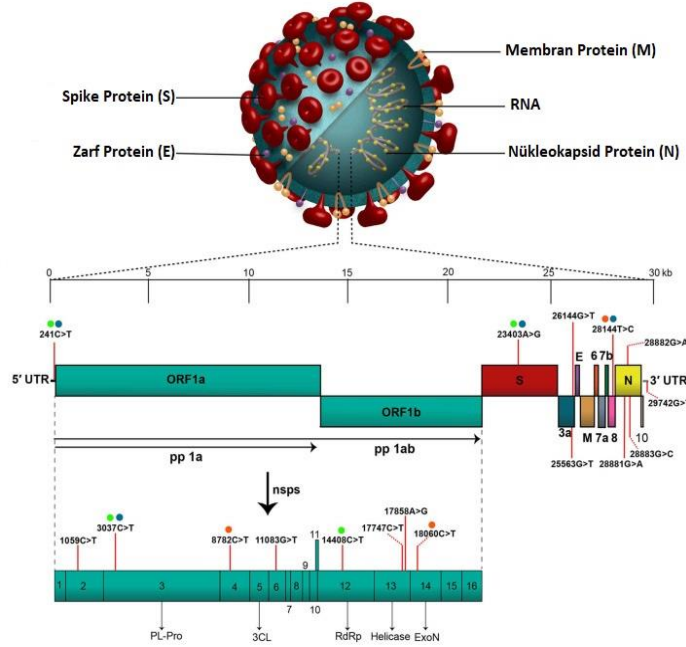
Dört koronavirüs türünün, normal bağışıklığa sahip bireylerde “grip”e benzer hafif enfeksiyonlar ürettiği bilinmektedir. Bunlar 229-E, NL63, HKU1 ve OC43’tür [12]. Ancak son yıllarda koronavirüsler, Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü (SARS-CoV) ve Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-CoV) gibi önemli hastalıklara yol açmıştır. İlk olarak 19 Kasım 2002’de Çin’in Fushan kentinde ortaya çıkan SARS-CoV, 2002 ve 2003 yılları arasında 8.000 kişiye bulaşmış ve bunların %10’luk bir kısmının ölümüne yol açmıştır [13]. İlk olarak Eylül 2012’de Ürdün’de ortaya çıkan MERS-CoV ise 1700’den fazla kişiye bulaşmış ve bunların yaklaşık %36’sının

ölümüne yol açmıştır [14]. Daha yakın zamanda ise mevcut COVID-19 (Koronavirüs Hastalığı 2019) salgınından sorumlu yeni bir koronavirüs olan SARS-CoV-2 (Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü-2) ortaya çıkmıştır [15].

İlk olarak 2019'un Aralık ayında Çin'in Hubei eyaletine bağlı Wuhan kentinde tespit edilen COVID-19, SARS-CoV-2 'nin patolojik etmen olduğu viral bir hastalıktır. COVID-19, asemptomatik akut solunum sıkıntısı, çoklu organ disfonksiyonu gibi çeşitli klinik özelliklerle karakterize olabileceği gibi asemptomatik de olabilir [16–18].

1.1.1. SARS-CoV-2 Genom Yapısı

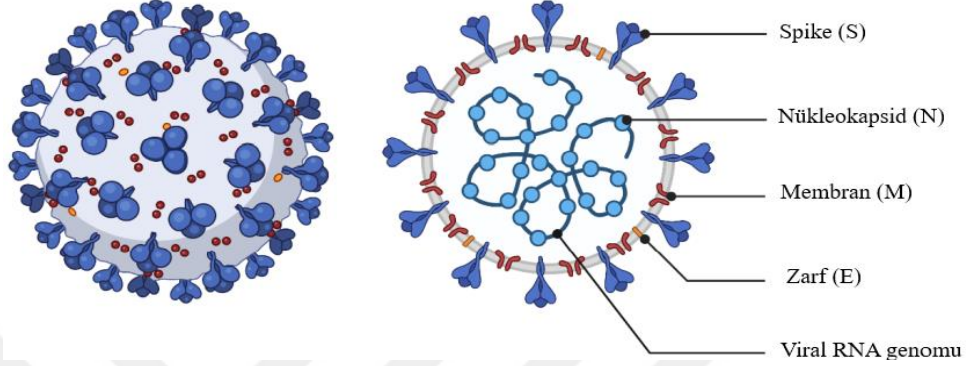
İnsan β -CoV sınıfında yer alan SARS-CoV-2, pozitif yönelimli ve tek zincirli bir RNA virüsüdür [19]. 29.9 kb büyüklüğünde olan SARS-CoV-2 genomu, örtüşen iki açık okuma çerçevesi (ORF1ab ve ORF1a), dört yapısal protein (spike, zarf, nükleokapsid ve membran) ve de altı yardımcı protein (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 ve ORF10)'den oluşur [20] (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. SARS-CoV-2 genomik organizasyonu (Rahimi [21]'den değiştirilerek alınmıştır)

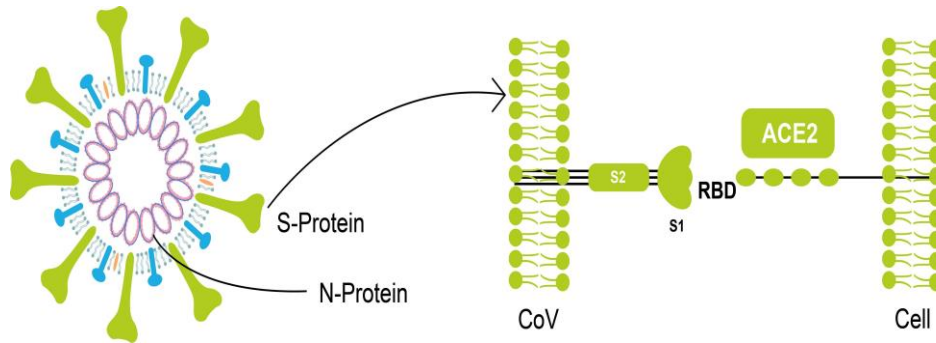
1.1.1.1. Yapısal Proteinler

SARS-CoV-2 genomu; spike (S), zarf (E), nükleokapsid (N) ve membran (M) olmak üzere dört tane yapısal protein içermektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. SARS-CoV-2 yapısal proteinleri (Yazdani [22]'den değiştirilerek alınmıştır)

S glikoproteini, virüsün yüzeyini çevreleyen taç (korona) şeklindeki bir transmembran proteindir. Yaklaşık olarak 7 nm genişliğe ve 23 nm uzunluğa sahip bu glikoprotein, alt solunum yolu hücrelerinde eksprese edilen anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2) ile etkileşerek virüsün konak hücreye tutunmasını kolaylaştırır (Şekil 1.6). S glikoproteini S1 ve S2 olmak üzere iki alt birim içerir [11,23]. Temel olarak S1 alt birimi virüsün hücre reseptörüne bağlanmasından sorumlu iken, S2 alt birimi ise membran füzyonundan sorumludur [24].



Şekil 1.6. CoV Spike hücre ile konak hücrenin etkileşimi [25]

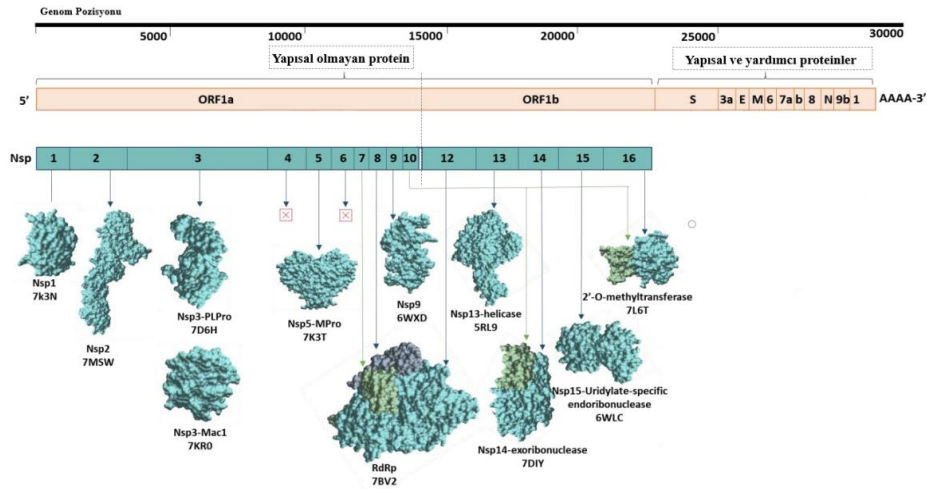
N proteini, yapısal olarak virüsün nükleik asit materyaline bağlanabilen fosfoproteinlerdir. Bu fosfoprotein RNA'ya bağlı olduğundan koronavirüslerin replikasyon ve transkripsiyonunda önemli rolü vardır [23].

M proteini, virüsün şeklini belirlemede önemli rolü olan SARS-CoV-2'nin önemli bir yapısal proteinidir. Bu protein diğer tüm yapısal proteinlere bağlanabilir. M proteini ile bağlanma, N proteinlerini stabilize etmeye yardımcı olur ve viryon içinde N protein-RNA kompleksini stabilize ederek viral bağlanmanın tamamlanmasını destekler [26].

E proteini ise SARS-CoV-2 yapısında 76-109 amino asitten oluşan en küçük yapısal proteindir. Bu proteinin, virüsün üretilmesi ve olgunlaşmasında rolü vardır. Replikasyon sürecinde enfekte edilen hücrede bolca eksprese edilir [26].

1.1.1.2. Yapısal Olmayan Proteinler

SARS-CoV-2, sahip olduğu RNA genomunun kodladığı 12 açık okuma çerçevesi (ORF) ile viral döngüyü programlamaktadır [27]. Viral genomun çoğunluğunu oluşturan (yaklaşık 2/3'ünü) ORF1a ve ORF1b, büyük replikaz poliproteinleri olan pp1a ve pp1b'yi kodlar. Pp1a, 4405 amino asit ve pp1ab ise 7096 amino asit içermektedir. Bu proteinler, viral döngüde önemli rollere sahip 16 adet yapısal olmayan proteinin (nsp) sentezinde yer alırlar. Pp1a proteini 1'den 11'e kadar yapısal olmayan proteinleri (nsp1-nsp11) sentezlerken, pp1ab proteini ise 12'den 16'ya kadar yapısal olmayan proteinlerin (nsp12-nsp16) sentezinden sorumludur (Şekil 1.7) [22].



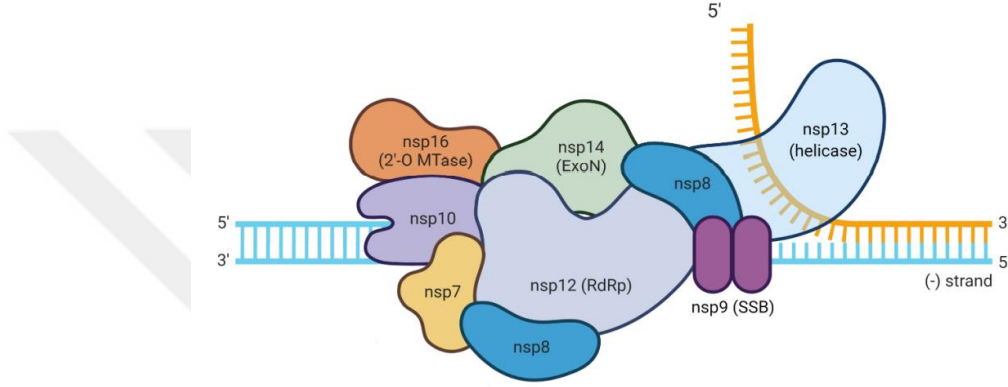
Şekil 1.7. SARS-CoV-2 yapısal olmayan proteinlerin genom organizasyonu (Yazdani [22]'den değiştirilerek alınmıştır)

Çizelge 1.2'de [28] SARS-CoV-2 yapısal olmayan proteinlerin işlevleri verilmiştir.

Çizelge 1.2. SARS-CoV-2 yapısal olmayan proteinlerin varsayılan işlevleri [28]

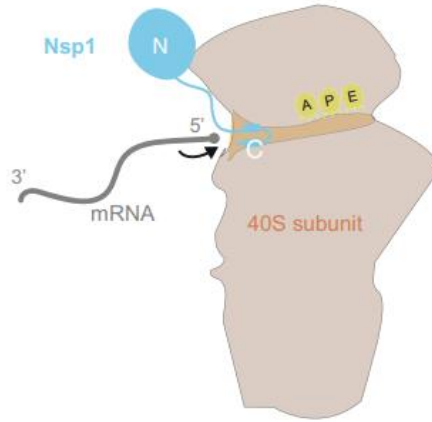
nsp	Yapısal olmayan protein	Varsayılan fonksiyonları
nsp1	Konak çeviri inhibitörü / Lider protein	Konak translasyonunu inhibe eder ve enfekte hücrelerde viral gen ekspresyonunu kolaylaştırır.
nsp2	Yapısal olmayan protein-2	Konak hücre hayatta kalma sinyal yolunun modülasyonu.
nsp3	Papain Benzeri Proteaz (PL-Pro)	Nsp1, Nsp2 ve Nsp3 oluşturmak için replikaz poli proteinin N-terminalinde proteolitik bölünme.
nsp4	Yapısal olmayan protein-4	Nsp3 ile etkileşime girer ve viral replikasyonu destekler.
nsp5	Ana proteaz (Mpro) / Kimotripsin Benzeri Proteaz (3CL-Pro)	Replikaz poliproteininin C-terminalinin proteolitik bölünmesi.
nsp6	Yapısal olmayan protein-6	Otofagozomları indükler ve viral bileşenlerin lizozomları barındırmak için verilmesini engeller.
nsp7/nsp8	Primaz kompleksi	Viral genomun replikasyonu ve transkripsiyonu.
nsp9	RNA bağlayıcı protein	Viral genomik ssRNA'ya bağlanır ve replikasyonu destekler.
nsp10	Yapısal olmayan protein-10	Viral mRNA'ların kap metilasyonu.
nsp11	Yapısal olmayan protein-11	ORF1a poliproteininin en kısa peptidi.
nsp12	RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp)	Viral genomun replikasyonu ve transkripsiyonu.
nsp13	Helikaz / Nükleosid-trifosfaz (NTPase)	Dubleks RNA ve DNA'yı çözer ve viral replikasyona yardımcı olur.
nsp14	Guanin-N7 metiltransferaz / 3'-5' eksoribonükleaz	RNA sentezi ve replikasyonu.
nsp15	Nidovirüs üridilata özgü endoribonükleaz (NendoU)	RNA işleme ve interferon antagonisti.
nsp16	2' O-riboz metiltransferaz	Viral mRNA'ların kap metilasyonu.

Birkaç yapısal olmayan protein, Şekil 1.8’de gösterildiği gibi replikaz-transkriptaz kompleksini oluşturmak için bir araya gelir. Bu çok alt birimli mekanizma, nsp7-nsp8 replikaz kompleks kofaktörleri, nsp12 polimeraz, nsp13 helikaz-trifosfataz, nsp10-nsp14 eksoribonükleaz, nsp10-nsp16 N7- ve 2'O-metiltransferazdan oluşur. RdRp (RNA bağımlı RNA polimeraz), hem genomik RNA replikasyonuna hem de alt genomik mRNA işlemeye aracılık eder.



Şekil 1.8. Viral replikasyonda RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) modeli (Yazdani [22]’den değiştirilerek alınmıştır)

Nsp1, ORF1a’nın 5' ucunda kodlanır ve SARS-CoV-2’nin ilk üretilen proteindir. Lider protein olarak da bilinen nsp1, konak hücrenin 40S alt birimi ile etkileşime girerek konakçı mRNA’larını bozar ve bunun sonucunda konak hücrenin translasyonu baskılanır [29] (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Nsp1 ve 40S ribozomal alt birimi arasındaki etkileşim [29]

Nsp2, SARS-CoV-2 poliproteininin ürettiği ikinci proteindir. Bu proteinler konakta PHB1 ve PHB2 proteinlerine bağlanırlar. Hücre döngüsü, hücrel farklılaşma, hücre göçü, apoptoz ve mitokondriyal biyogeneze rol oynadığı bilinen PHB1 ve PHB2 proteinlerine bağlanmasıyla konak hücre ortamının bozulmasına yol açtığı değerlendirilmektedir [30].

Nsp3, papain benzeri proteaz (PL-Pro) proteindir. Koronavirüsler tarafından kodlanan en büyük yapısal olmayan protein olan nsp3 yaklaşık 200 kDa büyüklüğündedir. Bu uzun dizi birkaç korunmuş alana sahiptir. Bunlar; ssRNA (Tek sarmal RNA) bağlanması, G-dörtlü bağlanma, ADPr bağlanması, PL-Pro ve transmembran alanıdır [31]. Nsp3'ün bir parçası olan PL-Pro alanı, pp1a ve pp1ab'nin N-terminal bölgesinden nsp1, nsp2 ve nsp3'ün salınımından sorumludur [32].

Nsp4, nsp3 ile etkileşime girerek membranın yeniden düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca nsp4 ile nsp3 arasındaki etkileşim viral replikasyon için gereklidir [31].

Nsp5, ana proteazdır. Nsp3'teki PL-Pro alanla birlikte ORF1ab polipeptitlerinin bölünmesinden sorumludur [33]. Ayrıca nsp5, olgun nsp'ler elde etmek için 11 farklı bölgede bölünür [34].

Nsp6, konakçı endoplazmik retikulumun sigma reseptörüne bağlanarak otofagozomların indüklenmesini başlatır [35]. Ayrıca nsp6, membran veziküllerinin oluşumunu indükler [36].

Nsp7, nsp8 ile birleşerek bir heterodimer oluşturur. Daha sonra bu nsp7/nsp8 heterodimer, nsp12 ile bir kompleks oluşturarak nsp8'in polimeraz aktivitesini elde etmesine yardımcı olur. Ayrıca nsp8'in viral yapışma ve konak istilası için gerekli olan adezinlere sahip olduğu tahmin edilmektedir [37,38].

Nsp9, hem viral replikasyonda hem de virülansta bir tek sarmallı RNA (ssRNA) bağlayıcı protein görevi görür [39].

Nsp10, nsp14 ve nsp16'yı aktive eden temel bir kofaktördür. Ayrıca viral mRNA'nın transkripsiyonunu, eklenmesini, poliadenilasyonunu ve dışa aktarımını teşvik etmek için mRNA'ların guanozin kapağının (cap) metilasyonunda önemli bir rol oynamaktadır [40].

Nsp11, SARS-CoV-2 genomunda ORF1a'nın sonunda eksprese edilen en kısa yapısal olmayan proteindir [41]. Nsp11, işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte 13 amino asitten oluştuğu ve ilk dokuz amino asidinin nsp12'nin ilk dokuz amino asidi ile aynı olduğu bilinmektedir [30].

RNA'ya bağımlı bir RNA polimerazı (RdRp) olan nsp12, SARS-CoV-2 replikasyonu ve transkripsiyonundan birincil olarak sorumludur [42]. Nsp12, nsp7/nsp8 heterodimeri ile bir kompleks oluşturarak viral RNA'yı kopyalamakla görevlidir [43].

Nsp14'ün 3'-5' ekzoribonükleaz aktivitesine (düzeltme okuması) ve C-terminalinde N7-metiltransferaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir [44]. Nsp14'ün N-terminal kısmı ise, replikasyon sürecini geliştiren ATP'ye bağlı RNA helikazın C-terminal bölgesi ile etkileşime girer [45].

Nsp15, koronavirüslerin viral RNA'yı parçalamak ve konakçı bağışıklık savunma sistemlerinden kaçmak için kullandığı üridine özgü bir endoribonükleazdır. Konakçı bağışıklık algılama sisteminin virüsü algılamasını önlemek için viral dsRNA (Çift iplikli RNA) sensörlerinin aktivasyonunu engeller. Nsp15, endoribonükleaz aktivitesini desteklemek için kofaktör olarak manganez kullanır [46,47]. Ayrıca, nsp8 ve nsp7/nsp8 kompleksi de, nsp15'in endoribonükleaz aktivitesini artırır [48].

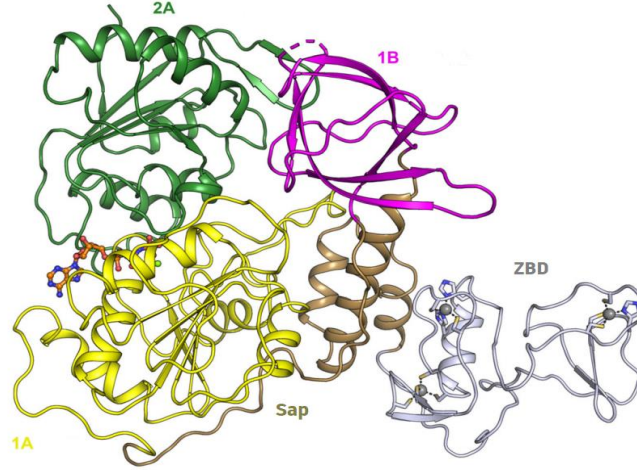
Replikasyon-transkripsiyon kompleksinin bir parçasını oluşturan nsp16, koronavirüsün bağışıklıktan kaçması için gerekli olduğundan viral replikasyon döngüsü için oldukça önemlidir. Nsp16, enzimatik aktivitesini etkinleştirmek için bir bağlayıcı ortak olan nsp10'a ihtiyaç duyar. [49]. Nsp16 ve nsp10'un oluşturduğu heterodimer kompleks, bir metil grubunu, S-adenozilmetiyonin (SAM) kofaktöründen viral mRNA'nın riboz şekerinin 2' hidroksiline aktarır [50]. Bu metilasyon hem translasyon verimliliğini artırır hem de mRNA'yı kamufle eder. Böylece hücre içi patojen tanıma reseptörleri tarafından tanınmazlar [49].

1.1.1.2.1. Helikaz (nsp13)

67 kDa ağırlığındaki nsp13, helikaz süper ailesi 1B'ye ait yapısal olmayan bir proteindir. Bu proteinin görevi, nükleotit trifosfat hidrolizinin enerjisini kullanarak çift sarmallı DNA veya RNA'nın 5'-3' yönünde çözülmesini katalize etmektir [51]. SARS-

CoV-2 helikazda viral genomun replikasyon sürecinde ikili sarmal yapıdaki oligonükleotitleri 5'-3' yönünde çözerek tek zincirlere dönüşmesini sağlar [52]. Helikaz, replikasyon ve virülansta önemli bir role sahiptir ve antiviraller için bir hedef olarak kabul edilir [53]. Helikaz aktivitesi magnezyuma bağlıdır ve RNA'nın çözülmesi sırasında çeşitli özellikler sergileyebilir [54]. Nsp13'ün, viral nsp12 ile etkileşime girdiği ve de replikasyon-transkripsiyon kompleksi (nsp7/nsp8/nsp12) ile uyum içinde hareket ettiği gösterilmiştir [55]. Nsp13'ün, viral mRNA'nın 5'-terminal başlığınının (cap) oluşumundan sorumlu olan 5'-trifosfataz aktivitesine sahip olduğu da bilinmektedir [56]. Çoğu viral mRNA, 5' terminal başlık yapısına "m7G(5')ppp(5')N" sahiptir ve bu başlık translasyon için tanınma yeridir [30].

Nsp13 yapısal olarak; üç yapısal çinko iyonunu koordine eden bir N-terminal çinko bağlama alanı (ZBD), sarmal bir stalk (sap) alanı, bir beta-varil 1B alanı ve de nükleotit bağlanmasından ve hidrolizden sorumlu kalıntıları içeren "RecA benzeri" iki helikaz alt alanı (1A ve 2A) içerir [57] (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. SARS-CoV-2 nsp13'ün genel yapısı (Newman [55]'den değiştirilerek alınmıştır)

Nsp13'ün SARS-CoV'da viral replikasyon için kritik bir öneme sahip olduğu belirlenmiştir [58]. Bu nedenle nsp13, yeni antiviral ilaçların geliştirilmesinde iyi bir hedef olarak önerilmiştir [55]. Nsp13 ayrıca SARS-CoV-2 genomunda en çok korunan yapısal olmayan proteinler arasındadır ve SARS-CoV ile arasında sadece tek bir amino asit (Val570Ile) ile farklılık gösterir. Bu nedenle, SARS-CoV-2 nsp13'ün hedefindeki

bileşikler, muhtemelen SARS-CoV'a ve gelecekte ortaya çıkabilecek diğer koronavirüslere karşı etkili olacak, bu da geniş bir etki spektrumuna sahip yeni antiviral terapötiklerin geliştirilmesi için onu ideal bir hedef haline getirecektir [55].

Diğer RNA virüsleri gibi, SARS-CoV-2 genomu da büyük bir mutasyon riskiyle karşı karşıya olduğundan, bu durum antivirallerin terapötik etkilerinin geçerliliğine büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Viral proteomdaki mutasyonların neden olduğu modelleme değişiklikleri, etkili ve geçerli antivirallerin geliştirilmesini gerektirmektedir [59,60].

COVID-19 salgını, β -CoV ailesinin küresel ölçekteki en etkili salgınıdır ve Dünya Sağlık Örgütü'nün açıkladığı rakamlara göre Temmuz 2023 itibarıyla 768 milyonun üzerinde insanı enfekte edip, yaklaşık 7 milyona yakınının ölümüne yol açmıştır [18,61,62]. COVID-19, bu yüksek patojenik etkisi ve dünya genelinde sebep olduğu ölüm sayısı göz önüne alınırsa yapısal özelliklerinin hızlı bir şekilde açığa çıkarılması büyük önem taşımaktadır.

Hastalıklarla mücadelede en önemli araçlardan olan ilaç ve aşıların tasarım çalışmaları için genetik ve proteomik yapıların çözülmesi oldukça önemlidir [63]. Genom ve proteomik yapılar arasındaki farklılıklar ve benzerliklerin yanı sıra topolojik ve fizikokimyasal özelliklerin bilinmesi de hedef yapının özelliklerinin tanımlanabilmesine katkı sağlayacaktır [64–66].

Geliştirilen tedavilerin geçerliliği, hedef proteinin stabilitesi ile orantılıdır. Genomda ortaya çıkabilecek bir mutasyon, yapının stabilitesini bozup geliştirilen tedaviyi geçersiz kılabilir [67,68]. Virüsün replikasyon sürecinde büyük öneme sahip SARS-CoV-2 helikaz (nsp 13)'da ortaya çıkabilecek mutasyonlar da proteinin yapı ve stabilitesini etkileyebilir. Helikaz yapı ve stabilitesindeki değişimler helikaz-nükleikasit affinitesinde değişim ve dolayısı ile viral döngüde farklılaşma ile sonuçlanabilir. Bu değişimler viral replikasyonun bloke olmasına ya da tam tersine artan replikasyon performansı ile sonuçlanmasına neden olabilir. Aynı zamanda bu değişikliklerin terapötikler ile etkileşimde ortaya koyacağı sonuçlar tedavi edici ve önleyici preparatların geçerliliğini tanımlayan en önemli unsur olacaktır. Bu çalışmada; güncel genom verileri kullanılarak mutasyonların belirlenmesi ve bu mutasyonların protein yapı ve stabilitesindeki etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETİ

Mutasyonlar protein yapısında ve stabilitesinde değişiklikleri tetikleyerek proteinin fonksiyonel özelliklerinde, substrat/ligand afinitesinde ve protein-protein etkileşimlerinde değişikliklere neden olabilir [59,69–72]. Protein yapı, stabilite ve etkileşiminde ortaya çıkan değişikliklerin hastalıkların gelişimi ve seyri açısından önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Viral protein yapılarındaki yapısal değişikliklerin de benzer şekilde viral etkinliğin değişiminde rol oynadığı birçok çalışma ile ortaya konuldu [73–79]. SARS-CoV-2'nin viral yaşam döngüsü açısından hayati bir role sahip olan helikazda görülen mutasyonların helikaz fonksiyonel özelliklerinde değişikliklere neden olabileceği gösterildi [80–83].

Kumari vd. [84] SARS-CoV-2 tahribatıyla mücadele edecek spesifik bir tedavi veya aşı geliştirilmesine olanak sağlamak için Hint izolatlarında SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinindeki mutasyonları tanımlamayı ve karakterize etmeyi amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. Hint izolatlarındaki nsp13 protein dizileri, Wuhan/Çin'den rapor edilen ilk SARS-CoV-2 protein dizisiyle karşılaştırılarak analiz edilmiştir. 825 Hint izolatı arasından toplam 38 mutasyon gözlemlenmiştir. Bu mutasyonların protein stabilitesi üzerindeki etkilerini saptamak için DynaMut web sunucusu aracılığıyla yabanıl tip ve mutant arasındaki serbest enerji farkı ($\Delta\Delta G$) hesaplanmıştır. Bunun sonucunda His164Tyr, Ala237Thr, Thr214Ile, Cys309Tyr, Ser236Ile, Pro419Ser, Val305Glu, Gly54Ser, His290Tyr, Pro53Ser, Ala308Tyr ve Ala308Tyr mutasyonlarının protein stabilite ve esnekliği üzerinde önemli etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Begum vd. [82] yaptıkları çalışmada popülasyonda önemli fraksiyonlarda ortaya çıkmış ve yayılmış olabilecek olası mutasyonları belirlemek için farklı coğrafi konumlardan 1549 SARS-CoV-2 helikaz protein dizisini karşılaştırmışlardır. Bunun için GenBank'tan 1361 Kuzey Amerika, 5 Güney Amerika, 139 Asya ve 44 Avrupa SARS-CoV-2 nsp13 dizisi indirilmiştir ve de yabanıl tip dizi/referans olarak da YP_009725308.1 kullanılmıştır. Çalışma sonucunda helikazın 541. pozisyonunda tirozinin (Tyr), sistein (Cys) ile ikame edildiği yeni bir mutasyon tespit edilmiştir. Bu Tyr541Cys mutasyonunun, moleküler esnekliği arttıran ve RNA'ya helikaz bağlanmasının afinitesinin azalmasına yol açan dengesizleştirici bir etkisinin olduğu bulunmuştur. Daha önce yaptıkları başka bir

çalışmada ise Pro504Leu mutasyonunun, helikaz-RNA etkileşiminin afinitesinin artmasına yol açtıkları rapor edilmiştir. Dolayısıyla her ikisinin de RNA bağlanması üzerinde zıt etkileri olduğu görülmüştür.

Banerjee vd. [85] viral RNA sentezinde önemli bir rol oynayan SARS-CoV-2 ORF1ab poliproteinlerindeki mutasyonların etkisini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Bunun için Aralık 2019'dan 25 Nisan 2020'ye kadar Amerika Birleşik Devletleri'nin farklı eyaletlerindeki etkilenen insanların NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) Virus veri tabanından alınan ORF1ab poliproteininin 1134 tam protein dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucunda replikaz ve helikaz olarak işlev gören önemli yapısal olmayan proteinlerde dört önemli mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar; Thr265Ile (nsp2), Pro4715Leu (nsp12), Pro5828Leu ve Tyr5865Cys (nsp13) mutasyonlarıdır.

Khailany vd. [86] bildirilen genomlar arasından çeşitli zaman ve lokasyonlarda mutasyon analizi yapmak ve biyoinformatik programlar yardımıyla SARS-CoV-2'nin genomik yapısını karakterize etmek için bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada çeşitli veri tabanlarından elde edilen 95 SARS-CoV-2 tam genom dizisi analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 116 mutasyon bulunmuştur. ORF1ab genindeki Cys8782Thr mutasyonu (13 örnek), ORF8 genindeki Thr28144Cys mutasyonu (14 örnek) ve N genindeki Cys29095Thr mutasyonu (8 örnek) en yaygın görülen üç mutasyondur.

Mercatelli ve Giorgi [87] yaptıkları çalışmada GISAID (Tüm Grip Verilerinin Paylaşılmasına Yönelik Küresel Girişim)'den aldıkları farklı coğrafyalara ait 48635 SARS-CoV-2 genom dizisini analiz edip, daha sonra NC_045512.2 referans Wuhan genomu ile karşılaştırarak 353341 mutasyon (örnek başına 7,23) belirlemişlerdir. Bunun sonucunda coğrafi ve genomik özgüllük ile karakterize edilen en az üç dal gözlenmiştir. Özellikle Avrupa'da yaygın olan dal, virüsün konakçı insan hücresiyle etkileşiminden sorumlu olan S proteini ile ilişkili Asp614Gly mutasyonunu taşımaktadır.

Kaushal vd. [88] yaptıkları çalışmada 196 ABD izolatının tam SARS-CoV-2 genom dizisini NC_045512 Çin referans dizisi ile karşılaştırıp, 11 haftalık süre boyunca mutasyon birikim oranını analiz etmişlerdir. Tüm genomlar için mutasyon sıklığının ilk beş hafta boyunca düşük olduğu, dokuzuncu haftaya kadar mutasyon sıklığının keskin bir şekilde arttığı ve son iki haftada ise sabit kaldığı görülmüştür. Analiz sonucunda ORF8 ve

nsp13 proteinlerinin 11 haftalık süre boyunca en yüksek mutasyon oranına sahip oldukları görülmüştür. Bununla birlikte nsp2, nsp3, RdRp, S, ORF3a ve N proteinleri de önemli ölçüde mutasyon frekansı göstermiştir. Ayrıca nsp7, nsp9, nsp10, nsp11, E, ORF6 ve ORF7b proteinlerinin de çalışma boyunca şaşırtıcı bir şekilde mutasyon biriktirmediği belirlenmiştir.

Pachetti vd. [89] Aralık 2019'dan Mart 2020 ortasına kadar dünya çapında SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastalardan elde edilen 220 genomik diziyi GISAID veri tabanından alarak analiz etmişlerdir. Referans SARS-CoV-2 genomu ise GenBank veri tabanından elde edilmiştir. Çalışma sonucunda ORF1ab (1397, 2891, 14408, 17746, 17857, 18060), S (23403) ve N (28881) dizilerinde mevcut 8 yeni tekrarlayan SARS-CoV-2 mutasyonu karakterize edilmiştir.

Nagy vd. [90] yaptıkları çalışmada GISAID veri tabanındaki 149061 SARS-CoV-2 viral nükleik asit dizisinden hastalık takip durumu mevcut olan çeşitli coğrafyalardan 4566 virüs genomunu filtreleyerek incelemişlerdir. Takip edilen hastaların 708'i hafif, 3306'sı hastaneye yatırılması gereken ve 552'si ise ağır hastalardır. Mutasyonların değerlendirilmesi için viral dizilere referans olarak "hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019" dizisi kullanılmıştır. Hasta sonuçları hafif hastalık, hastaneye yatış ve ciddi hastalık (ölüm veya yoğun bakım ünitesinde tedavi) olarak sınıflandırılmıştır. Çalışma sonucunda toplamda protein amino asit dizisini etkileyen 3733 farklı mutasyon tespit edilmiştir. Hafif sonuçla ilgili mutasyonlar ORF8 (Leu84Ser), nsp6 (Leu37Phe), ORF3a (Gly196Val), nsp4 (Phe308Tyr) ve N (Ser197Leu) proteinlerinde görüldü. Kötü sonuçla ilgili mutasyonlar ise S (Leu54Phe, Asp614Gly ve Val1176Phe), RdRp (Ala97Val ve Pro323Leu), ORF3a (Gln57His ve Gly251Val), nsp3 (Ser1197Arg ve Thr1198Lys), ORF6 (Ile33Thr) ve N (Pro13Leu, Ser194Leu, Arg203Lys, Gly204Arg ve Ile292Thr)'de bulunuyordu.

Zekri vd. [91] klinik semptomlardaki varyasyonun SARS-CoV-2 genomundaki mutasyonlarla ilişkili olup olmadığını görmek için 50 Mısırlı hastadan aldıkları izolatlarda tam genomlu yüksek verimli dizileme gerçekleştirip, daha sonra gözlemledikleri mutasyonlar ile hastaların klinik özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma sonucunda yaygın olarak görülen 36 mutasyon belirlenmiştir. Ser5368Leu (nsp13)

varyantının artan ateş riski ve daha uzun süreli semptomlarla bağlantılı olduğu görülmüştür. Glu3909Gly (nsp7) varyantının 2-13 yaş çocuklarda daha yaygın ve semptomların süresinin daha kısa olduğu, S (Asp614Gly) ve RdRp (Asp4715Leu)'de yaygın olarak görülen mutasyonların ise semptom değişkenliğiyle bağlantılı olmadığı tespit edilmiştir.

Chang vd. [92] SARS-CoV-2 hastalığının kökeni ve evriminin genomik kalıplarını analiz etmek için NCBI veri tabanından elde edilen farklı ülkelere 10 SARS-CoV-2 dizisindeki kolerasyonu tanımlamışlardır. Analiz sonucunda M ve N proteinlerinin amino asit dizilişlerinde bir farklılık görülmemiştir. S protein bölgesinde iki mutasyon belirlenmiştir. Güney Kore genomunda alternatif dokuz genomdaki "Ser" in aksine "Trp" ve Avustralya genomunda alternatif dokuz genomdaki "Ser" in aksine "Arg" gözlenmiştir. E proteininde ise "His" mutasyonu, alternatif dokuz genomdan "Leu" ya karşılık Güney Kore genomunda tespit edilmiştir.

Benvenuto vd. [93] SARS-CoV-2 genomunun yapısal varyasyonlarını haritalamak amacıyla GISAID veri bankasında mevcut olan 351 SARS-CoV-2 dizisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda nsp6 ve ORF10 bölgelerine karşılık gelen 3691 ve 9659 numaralı amino asitlerde iki mutasyonun varlığı tespit edilmiştir. 3691. amino asit pozisyonunda SARS-CoV-2 dizilerinin çoğunda "Leu" kalıntısı bulunurken Asya, Amerika, Okyanusya ve Avrupa izolatlarından bazı dizilerde "Phe" kalıntısı görülmüştür. Ayrıca 9659. amino asit pozisyonunda SARS-CoV-2 dizilerinin çoğu bir "Arg" kalıntısına sahipken, Avustralya ve Amerika izolatlarından bazılarının "His" kalıntısına sahip olduğu belirlenmiştir.

Voloch vd. [94] yaptıkları çalışmada uzun süreli enfeksiyon sırasında SARS-CoV-2'nin konak içi evrimini araştırmayı amaçlamışlardır. Çünkü yapılan çalışmalar SARS-CoV-2 enfeksiyonun seyri boyunca konak içi tek nükleotid varyantları (iSNV)'nin birikmesinin, endişe verici mutasyonların ortaya çıkmasının yanı sıra kalıcılığında da önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu çalışmaya semptomların başlangıcından itibaren ortalama 18 gün boyunca nazofarinkste RT-PCR (Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon)'si pozitif kalan 33 hasta dahil edilmiştir. Çalışma sonucunda, S ve helikaz gibi yapısal ve yapısal olmayan proteinleri hedef alan zaman noktaları arasında

farklı bir yanlış anlamlı varyant birikimi tespit edilmiştir. Enfeksiyonun seyri boyunca esas olarak artan A→U ve azalan G→A imzalarından kaynaklanan ayırt edici bir mutasyon modeli gözlemlenmiştir. G→A mutasyonları RNA düzenleyici enzim aktiviteleriyle ilişkili olabildiğinden, gözlemlenen mutasyon profilleri konakçı hücre savunmasının doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarını düşündürmektedir. Bu nedenle, uzun süreli SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında konakçı ve patojen etkileşiminin dinamik ve karmaşık bir manzarası ortaya çıkarılmıştır. Bu da konağın doğuştan gelen bağışıklığının, konakçı içi çeşitliliğin artışıyla şekillendiğini öne sürmüştür.

Yin [95] yaptığı bir çalışmada mutasyonların sıklıklarını hesaplamak için GISAID veri tabanından aldığı dünya çapındaki 558 SARS-CoV-2 izolatının SNP (Tek Nükleotit Polimorfizmi) genotipini belirlemiştir. Tüm genom dizileri daha sonra GenBank'tan alınan referans SARS-CoV-2 genomuyla karşılaştırılmıştır. Virüs genomundaki ilk yaygın SNP mutasyonu lider dizide (Cys241Thr) görülmüştür. Bu mutasyonun, nsp3, RNA primaz ve S proteininin amino asit seviyesinde mutasyonlara yol açan Cys3037Thr, Cys14408Thr ve Ala23403Gly mutasyonlarıyla birlikte ortaya çıktığı keşfedilmiştir. Bu mutasyonların, enfeksiyon şiddetinin diğer coğrafi bölgelere göre daha yoğun olduğu SARS-CoV-2 Avrupa izolatlarının genomlarında daha yaygın olduğu görülmüştür. İzolatlardaki ikinci en yaygın SNP mutasyonu nsp8'de (Thr28144Cys) ve üçüncüsü ise nsp3'te (Gly26144Thr) görülmüştür. En önemli SNP mutasyonu (Ala23403Gly), S protein dizisinde yer almıştır. Ayrıca RNA primazı olan nsp8'in, diğer proteinlerle karşılaştırıldığında daha fazla mutasyon (Thr28144Cys, Gly28881Ala, Gly28882Ala ve Gly28883Cys) içerdiği görülmüştür.

Wang vd. [96] yaptıkları çalışmada 95 SARS-CoV-2 izolatının genomunu referans diziyle kıyaslayıp analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda toplam homolojinin %99,99 olduğu, 15 izolatın ise referans dizi ile aynı olduğu gösterilmiştir. ORF1ab (2662, 8782, 11083, 17373, 18060), S (21707, 24034), ORF3a (26144), M (26729), ORF8 (28077, 28144) ve N (28854, 29095) pozisyonlarında üçten fazla varyantta meydana gelen mutasyonlar gözlenmiştir. En yüksek mutasyon oranı, 29 örnek ile (yaklaşık %30) ORF8'de (Cys28144Thr) tespit edilmiştir. Benzer şekilde ORF1ab (Thr8782Cys) pozisyonundaki mutasyon oranı ise yaklaşık %29 olmuştur.

Phan [97] farklı coğrafyalardaki enfekte hastalardan 86 tam SARS-CoV-2 genomunu toplayıp Çin referans genomuyla karşılaştırarak bir analiz çalışması yapmıştır. Çalışma, tüm SARS-CoV-2 genomu üzerinde 93 mutasyonu ortaya çıkarmıştır. Yirmi dokuzu ORF1ab, sekizi S, dördü N ve biri M proteininde olmak üzere 42 yanlış anlamlı mutasyon tanımlanmıştır.

Toyoshima vd. [98] 6 farklı bölgedeki 50 ülkeden 12343 hastanın SARS-CoV-2 genom dizisini GenBank'tan temin ederek mutasyonları araştırmıştır. Araştırma sonucunda %10'dan daha fazla sıklıktaki 131 mutasyon dahil olmak üzere toplam 1234 mutasyon belirlemişlerdir. S proteinindeki Asp614Gly ve ORF1ab'de ise Pro4715Leu mutasyon sıklığının, virüsün ölüm oranıyla pozitif korelasyon gösterdiği keşfedilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışma Grubu

Bu tez çalışmasında 1616 Avrupa ve 2483 Amerika izolatına ait mutasyon verileri NCBI Virus veri tabanından elde edildi. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini için NC_045512.2 ve YP_009725308.1 dizileri referans olarak alındı. Protein modelleme çalışmalarında 7NIO [55] kalıp olarak kullanıldı.

3.2. Protein Modelleme

Proteinler, biyolojik süreçlerin yürütülmesinde önemli rol oynarlar. Bir proteinin yapısı, onun işlevini ve vücuttaki rolünü belirler [99]. Proteinlerin üç boyutlu yapısının çözümlenmesi birçok biyolojik sorunun cevaplanmasına yardımcı olur ve proteinlerin fizyolojik rolünün belirlenmesine ilişkin öngörüler sağlar. Proteinlerin sağlık ve hastalık hallerindeki yapısal farklılıklarını anlamak, bu hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların tasarlanmasına yardımcı olabilir [100].

Son yıllarda protein yapı tayini, daha çok X-ışını kristalografisi ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) spektroskopisi gibi deneysel tekniklere dayanıyordu. Bu teknikler, proteinlerin yapılarının yüksek çözünürlüklü atomistik ayrıntılarını sağlayabilse de, zahmetli ve pahalıdır. Ayrıca her proteine de başarılı bir şekilde uygulanamamaktadır. Bunun için deneylerle birlikte çalışarak proteinlerin yapısal ayrıntılarını belirlemek için daha hızlı ve daha ucuz ve daha verimli tekniklere ihtiyaç duyulmuştur [99].

Aynı ailedeki proteinlerin üyeleri arasındaki çok basit bir amino asit dizisi varyasyonu; hangi substratı kabul ettiklerini, hangi proteinle etkileşime girdiklerini ve hatta hangi hücre tipi içinde aktif olabileceğini belirleyebilir. Tüm bu biyokimyasal olayları deneysel olarak açıklamak mümkün değildir. Bu bağlamda biyoinformatik araçlar, bu alanı keşfetmek ve bu karşılanmayan ihtiyacı karşılamak için kullanılmıştır [99].

Hesaplamalı yöntemlerle yapı tahmini, ab initio yöntemler ve karşılaştırmalı modelleme olarak iki sınıfta incelenebilir. Karşılaştırmalı modellemede, proteinlerin üç boyutlu yapıları, daha önceden deneysel olarak belirlenmiş proteinlerden yararlanarak modellenir. Karşılaştırmalı modelleme yöntemlerinden biri olan homoloji modellemede,

modellenecek proteine, yapısı deneysel olarak belirlenmiş proteinler içerisinde aminoasit dizilimleri en çok benzeyenler kalıp olarak seçilir ve ilgili proteinin yapısı tahmin edilir. Ab initio yönteminde ise, proteinlerin üç boyutlu doğal yapısının minimum serbest enerjili yapı olduğu kabulünden hareketle, birtakım enerji fonksiyonları türetililerek protein katlanma süreci modellenmeye çalışılmaktadır. Homoloji modellemeden farklı olarak, deneysel olarak bulunmuş proteinlerden faydalanılmaz ve proteinin üç boyutlu yapısı yalnızca aminoasit diziliminden hareketle bulunmaya çalışılır [101].

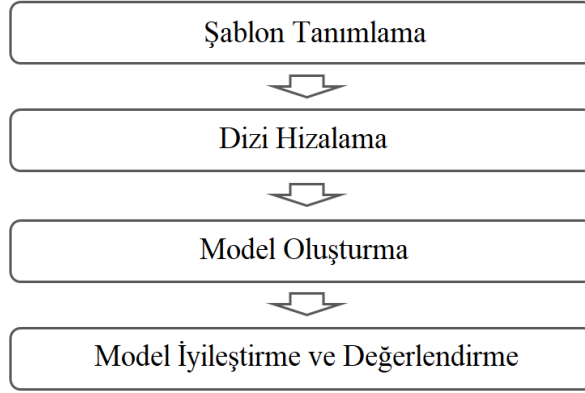
3.2.1. Homoloji Modelleme

Homoloji Modelleme, yapısı bilinmeyen bir proteinin üç boyutlu modelini oluşturmak için kullanılan bir kuramsal yöntemdir. Bilgisayar teknolojisinin gelişmesine paralel olarak gelişen bu yöntem ile proteinlerin üç boyutlu modellerinde de önemli artış gözlemlenmiştir [102].

Homoloji modelleme, “Benzer sekanslara sahip evrimsel olarak ilişkili proteinler benzer yapılara sahiptir” yaklaşımından faydalanır. Bu modellemede modellenecek olan proteinin dizisine hedef (sorgu) dizi, modelleme sırasında kullanılacak olup daha önceden yapısı bilinen dizilere ise kalıp (şablon) dizi adı verilir. Homoloji modellemenin uygulanabilmesi için hedef dizi ve şablon diziler arasında en az %30 benzerlik bulunmalı ve şablon dizilerin üç boyutlu yapılarının daha önceden x-ışını kristalografisi ya da NMR ile oluşturulması gerekmektedir [103,104].

3.2.1.1. Homoloji Modelleme Adımları

Homoloji modelleme prosedürü birkaç ardışık adımdan oluşur (Şekil 3.1) ve bu adımlar genellikle tatmin edici sonuçlar elde edilene kadar tekrar edilir [103]. Bu işlem basamakları temel yaklaşım olarak küçük teknik farklılıklar ile tüm protein yapısal analizlerin temelini teşkil etmektedir.



Şekil 3.1. Homoloji modelleme adımları [99]

3.2.1.1.1. Katlanma Tanımlama ve Şablon Seçimi

Homoloji modelleme sürecinin başlangıcı olan bu adım, hedef diziyle ilgili tüm protein yapılarının tanımlandığı ve en yüksek dizi benzerliğine sahip olanların şablon olarak seçildiği adımdır. Nihai modelin doğruluğunun ve kalitesinin büyük bir kısmı, hedef ile şablon arasındaki benzerliğin derecesine bağlıdır. Bu nedenle şablon seçimi kritik öneme sahiptir. Bu adımı kolaylaştırmak için sorgu olarak hedef diziyi kullanan birçok veri tabanı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları PDB (Protein Veri Bankası), SCOP, DALI ve CATCH'dir [105].

Şablon seçimi için katlanma tanımlamada kullanılan üç ana protein dizi karşılaştırma yöntemi vardır. Bunlardan ilki, hedef dizi ile veri tabanı dizilerinin her birini ayrı ayrı karşılaştırılmasını içeren “ikili dizi karşılaştırılması”dır [106]. Bunun için sıklıkla kullanılan programlar FASTA ve BLAST'tır [105].

İkinci yöntem “çoklu dizi karşılaştırmaları”nı içerir. Hassas ve otomatik bir işlem olan çoklu dizi karşılaştırmaları; profil analizi, profil-profil karşılaştırmaları ve Gizli Markov Modelleri gibi çeşitli yöntemler kullanılarak yapılır. Bu yöntem özellikle hedef ve şablon diziler arasındaki dizi özdeşliği %25'in altında olduğunda kullanışlıdır. Bu yöntemde yaygın olarak kullanılan programlar BLAST ve MAFFT'tır [103,107].

Üçüncü yöntem ise 3B (3 boyutlu) şablon eşleştirme yöntemidir. Bu yöntem, hedef protein dizisinin ve yapısı bilinen protein dizisinin ikili karşılaştırılmasına dayanır. Belirli bir hedef dizinin, bilinen 3B kıvrımdan herhangi birini benimseyip benimsemediği bir

puanlama fonksiyonuna göre tahmin edilir. Diğer bir deyişle, hedef dizi, bir 3B katlanma kütüphanesinden geçirilir. Bu yöntem, özellikle hedef modelleme ile açıkça ilişkili hiçbir dizi olmadığında faydalıdır. Bu yöntemde kullanılan programlara örnek olarak THREADER, 3D-PSSM, SPARKS-X ve RaptorX verilebilir [99,105].

İlgili tüm protein yapılar tanımlandıktan sonra, modelleme için uygun olan şablonların seçilmesi gerekir. Şablon seçimini belirleyen kriterlerler, karşılaştırmalı modelin amacına göre belirlenir. Örneğin, bir protein-ligand modeli oluşturulacaksa, benzer bir ligand içeren şablonun seçimi muhtemelen şablonun çözünürlüğünden daha önemlidir. Öte yandan model, bir enzimin aktif bölgesinin geometrisini analiz etmek için kullanılacaksa, yüksek çözünürlüklü bir şablonun kullanılması tercih edilir. Model oluşturmak için sadece bir şablon kullanılmaktansa, hedef diziden yaklaşık olarak eşit uzaklıkta birkaç şablonun kullanılması genellikle model doğruluğunu artırır [105].

3.2.1.1.2. Dizi Hizalama

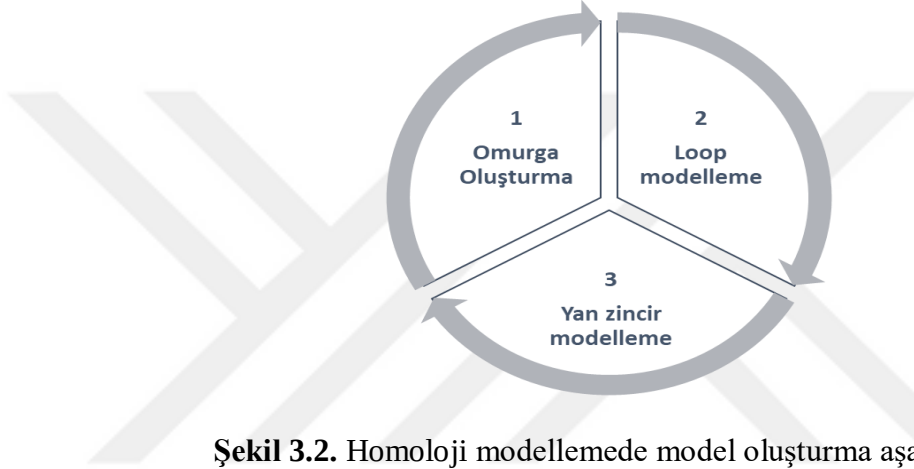
Katlanma tanımlama sırasında hedef ve şablon diziler arasında bir hizalama yapılır. Ancak bu hizalama, homoloji modelleme için en uygun hizalama değildir. Çünkü bu aşamadaki yöntemler, optimum hizalama için değil, uzak bağların tespiti için ayarlanmıştır. Bu nedenle, şablon seçimi yapıldıktan sonra, hedef diziyi şablon yapılar ile hizalamak için farklı bir yöntem kullanılmalıdır [105].

%40'ın üzerinde benzerliğe sahip yakından ilişkili protein dizileri için hizalama çoğunlukla doğrudur. Genel dizi benzerliği %40'ın altında olduğunda, yerel dizi benzerliği düşük bölgeler yaygındır [108]. %30'dan daha düşük dizi benzerliklerinde, daha fazla boşluk ve mutasyon varlığı nedeniyle hizalama zorlaşır [99]. Sekans benzerliği azaldıkça, hizalamalar daha fazla boşluk ve hizalama hataları içerir. Örneğin, iki protein %30 dizi özdeşliği paylaştığında, kalıntıların yalnızca %20'sinin doğru şekilde hizalanması olasıdır [109]. Birçoğu dinamik programlama tekniklerine dayanan çeşitli protein dizisi hizalama yöntemleri vardır. Çoklu sıra hizalaması için sık kullanılan bir program CLUSTAL'dır [105]. Hizalamanın mümkün olmadığı düşük sekans benzerlik durumlarında, hedef ve şablon arasındaki hizalama sürecini kolaylaştırmak için genellikle homolog proteinlerden çoklu yapılar ve sekanslar kullanılır. Bu, kolayca eşleştirilebilen ilgili dizileri kullanarak hem hedef hem de şablon için çoklu dizi hizalama profili

oluşturarak çalışır. İki profil daha sonra mümkün olduğu kadar çok yapısal bilginin dahil edilmesiyle hizalanır [99].

3.2.1.1.3. Model Oluşturma

Hizalama hazır olduktan sonra model oluşturma işlemi gerçekleştirilir. Model oluşturma işlemi 3 aşamada gerçekleşir: Omurga oluşturma, loop modelleme ve yan zincir modelleme [99] (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Homoloji modellemede model oluşturma aşamaları

3.2.1.1.3.1. Omurga Oluşturma

Bilinen şablon yapıdaki bilgilerin hedef diziye aktarılmasına bağlı olarak, hedef proteinin omurgasının veya çerçevesinin oluşturulmasıdır. Omurga oluşturmada farklı yöntemler kullanılsa da çoğu modelin omurgası oluşturulurken model dizisi ile hizalamada görünen şablon kalıntılarının koordinatları basitçe kopyalanır [99].

İyi bir model oluşturma yolu en az hata içeren şablonu kullanmaktır. Ancak iki farklı şablonun iki farklı yerinde kötü belirlenmiş bölgeleri varsa bu iki şablon tek bir modelde birleştirilebilir. Bu birleştirme yaklaşımı “çoklu şablon modelleme” olarak bilinir [110].

3.2.1.1.3.2. Loop Modelleme

Aynı protein ailesinin üyeleri arasında, genellikle protein yüzeyinde yapısal bir değişkenlikle sonuçlanan farklılıklar vardır. Bu yapısal farklılıklar şablon ile hedef arasında ikame etme, eklenme ve silinmenin bir sonucudur. Bu tür değişiklikler sıklıkla,

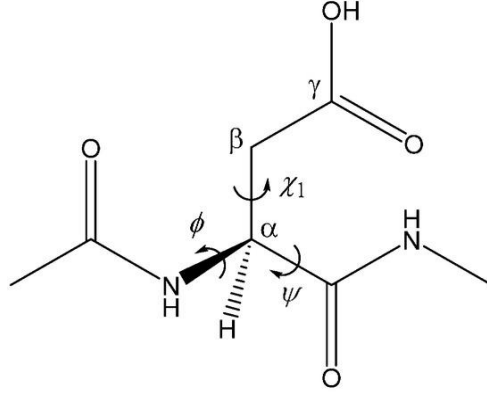
protein katındaki ikincil yapı elemanlarını (alfa sarmalları ve beta tabakaları) birbirine bağlayan döngü (loop) bölgelerine karşılık gelir. Döngüler, aktif ve bağlayıcı bölgelere önemli katkı sunduklarından (örneğin metal iyonlarının metal bağlayıcı proteinler tarafından, antijenlerin immünoglobulinler tarafından veya DNA'nın DNA bağlayıcı proteinler tarafından bağlanmasına) bir protein çerçevesinin işlevsel özgüllüğünü belirlerler. Sonuç olarak, döngü modelleme, proteinler ve ligandları arasındaki etkileşimi incelemede homoloji modellemenin önemli bir aşamasıdır [111].

Döngü modelleme adımına yönelik iki ana yaklaşım vardır. Bunlar bilgiye dayalı ve enerjiye dayalı yaklaşımlardır. Bilgiye dayalı yaklaşımlarda, protein omurgasındaki uç nokta bölgelerine uyabilecek segmentleri bulmak için bilinen tüm protein yapılarının veritabanları taranır. Modeller, Swiss-Model, WHAT IF ve 3D-Jigsaw bu yaklaşımı kullanarak döngü bölgelerini modelleyen araçlardır [99]. İkinci yaklaşım ise en iyi eşleşmeyi belirlemek için çok sayıda rastgele seçilmiş aday konformasyonun üretildiği ve bir puanlama fonksiyonunun Monte Carlo veya moleküler dinamik teknikleri aracılığıyla optimize edildiği ab initio kat tahminine dayanır [112].

3.2.1.1.3.3. Yan Zincir Modelleme

Yapısal olarak benzer proteinlerde korunan kalıntıların yan zincir biçimleri (rotamerleri) genellikle benzer χ_1 açılara ($C\alpha-C\beta$ bağı etrafındaki burulma açısına) sahiptirler (Şekil 3.3). Bu nedenle, korunan kalıntıları tamamen şablondan modele kopyalayarak yüksek doğrulukta yan zincir modellemesi gerçekleştirilebilir. Ancak bu temel kural yalnızca yüksek dizi benzerliği seviyelerinde geçerlidir [113].

Yan zincir kalitesi, tüm atomlar için kök ortalama kare sapması (RMSD) ile veya bulunan doğru rotamerlerin fraksiyonunu tespit ederek analiz edilebilir [103]. Yan zincir modelleme için kullanılan ilk araçlardan biri, grafik teorisi algoritmalarına dayanan SCWRL3'tür. Daha sonra bunun bir üst sürümü SCWRL4 kullanılmıştır. Diğer mevcut araçlar ise SCAP, SMOL ve RAMP'dir [99].



Şekil 3.3. C α -C β bağı etrafındaki χ_1 burulma açısı

3.2.1.1.4. Model İyileştirme ve Değerlendirme

3.2.1.1.4.1. Model İyileştirme

Geçirilen adımlarla oluşturulan model, belirli bir proteinin genel yapısını andırırsa da yerel yapılandırma için küresel minimumdan hala biraz uzaktır. Bundan dolayı, yapıyı minimuma yaklaştırmak için bir iyileştirme adımı uygulanır. Bu adımda, uygun iyileştirme teknikleri uygulanarak tahmin edilen modelin atomik koordinatları ayarlanır. İyileştirme adımının ana hedefi, omurga ve yan zincir rotamerlerinin ve bunların paketlenmesinin doğru modifikasyonu ile modelin optimize edilmesidir. Model iyileştirmede kullanılan yaygın bir yaklaşım, sterik çakışmaları en aza indiren, yan zincir rotamerlerinin bir konfigürasyonunu tahmin eden yinelemeli bir yöntemdir. Bunu omurgada bir kayma takip eder, dolayısıyla yeni kaydırılan omurga için yan zincirlerin rotamerlerinin daha fazla ayarlanması gerekir ve prosedür yakınsayana kadar bu şekilde devam eder [110]. Model iyileştirme için sıklıkla kullanılan araçlar, proteinin hareketlerini ve gerçek katlama sürecini taklit eden Monte Carlo simülasyonu ve atom moleküler dinamikleri (MD) simülasyonlarıdır [99].

3.2.1.1.4.2. Model Değerlendirme

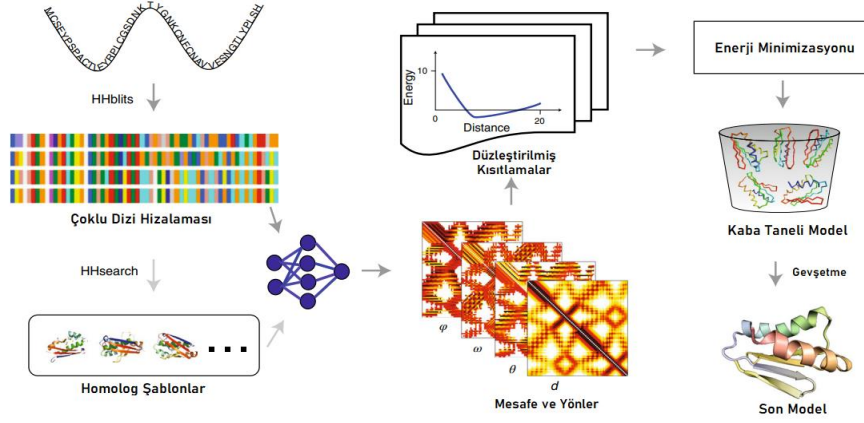
Her homoloji modeli, modellemenin çeşitli aşamalarında ortaya çıkan hatalar içerebilir. Hata sayısını belirleyen önemli bir faktör, şablon ve hedef arasındaki dizi benzerlik oranıdır. Aralarındaki benzerlik azaldıkça, hata sayısı da doğal olarak artar. Hata sayısını belirleyen bir diğer faktör ise şablondaki hata sayısıdır. Hatalı 3B yapılar,

modellemede şablon olarak kullanıldığı takdirde çalışmanın kalitesinde ve sonuçlarında büyük hatalara neden olabilir [99]. Bir yapıdaki hataları tahmin etmenin temel olarak iki farklı yolu vardır. İlki, modelin enerjisini bir kuvvet alanına dayalı olarak hesaplamadır. Bu yöntem, bağ uzunluklarının ve bağ açılarının normal aralıklarda olup olmadığını ve modelde çok sayıda çıkıntı olup olmadığını kontrol eder. İkincisi ise karşılaştırılmalı yaklaşımdır. Burada deneysel yöntemlerle elde edilen model verileri ve karakteristik rezidü tanımları dikkate alınarak hata tespiti yapılır ve model kalitesi değerlendirilir [110].

3.2.2. Derin Öğrenme Algoritmaları ile Modelleme (trRosetta / Robetta)

Son yıllarda, protein yapısı tahmininde, CASP (Protein Yapı Tahmininin Kritik Değerlendirilmesi) deneylerinin de etkisiyle önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Bu ilerleme, çoğunlukla protein yapısı tahmininin doğruluğunu iyileştirmek için vazgeçilmez bir bileşen haline gelen güçlü derin öğrenme tekniklerinin uygulanmasıyla mümkündür. Derin öğrenme ile protein yapısı tahmin yöntemlerinin çoğunda iki aşamalı bir yaklaşım benimsenmiştir. Derin öğrenme, öncelikle kalıntılar arası iki boyutlu mesafe/temasları tahmin etmek için kullanılır. Daha sonra bu tahminler, üç boyutlu yapının tahmininde kısıtlama olarak kullanılır [114].

trRosetta (dönüşüm kısıtlamalı Rosetta) sunucusu, derin öğrenme ve Rosetta tarafından desteklenen, protein yapısını hızlı ve doğru tahmin edebilen web tabanlı bir platformdur. Girdi olarak bir hedef sekansla, HHblits yazılımı temelinde optimum bir çoklu dizi hizalaması (MSA) üretilir. PDB'den homolog şablonlar bulunduğunda, oluşturulan MSA ile birlikte, mesafe ve üç yön (θ , ω ve ϕ) dahil olmak üzere 2B kalıntılar arası geometrileri tahmin etmek için derin bir sinir ağına beslenirler. Bu geometriler, yapı modellemenin bir sonraki adımına rehberlik etmek için kısıtlamalar olarak kullanılan referans düzeltmeden sonra düzeltilmiş enerji terimlerine dönüştürülür. Yapı tahmini için iki aşamalı bir prosedür uygulanır. 30 kaba taneli model ilk olarak yarı-Newton tabanlı enerji minimizasyonu ile üretilir. Düşük enerjili modeller daha sonra nihai yapı modellerini oluşturmak için hızlı bir kısıtlamalı gevşetme prosedürüne tabi tutulur [114] (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. trRosetta protokolünün akış şeması (Zongyang [114]'dan değiştirilerek alınmıştır)

Robetta, genomik verilerden proteinin yapısının çıkarılması için kullanılan otomatik yapı tahmini ve analiz araçları sağlayan bir internet hizmetidir. Yapı tahmini için, sunucuya gönderilen diziler varsayılan alanlara ayrıştırılır ve karşılaştırmalı modelleme veya de novo yapı tahmin yöntemleri kullanılarak yapısal modeller oluşturulur. BLAST, PSI-BLAST, FFAS03 veya 3D-Jüri kullanılarak bilinen yapıya sahip bir proteinle güvenilir bir eşleşme bulunursa, karşılaştırmalı modelleme için bir şablon olarak kullanılır. Eşleşme bulunamazsa, de novo Rosetta yapı tahmin yöntemi kullanılarak yapı tahmini yapılır. Sunucu ayrıca RosettaNMR protokolünü kullanarak protein yapılarını belirlemek için kullanıcı tarafından sağlanan NMR kısıtlama verilerini de kullanabilir. Ek olarak, çok alanlı proteinlerin kristalleştirilmesi genellikle zor olduğundan ve birçoğu NMR yapı tespiti için çok büyük olduğundan, Robetta kullanılarak alan tahmini, yapıların belirlenebileceği hedef havuzunu genişleterek yapısal genomik çabalara yardımcı olabilir [115].

3.3. Protein Model Kalitesinin Değerlendirilmesi

Kristalleşme, veri toplama, aşamalandırma, model oluşturma ve iyileştirme de dahil her alanda otomasyondaki gelişmeler, kristalografi kullanarak bir yapıyı çözmeyi her zamankinden daha kolay hale getirmiştir. Bu gelişmelere rağmen düşük çözünürlükte, yorumlamayı etkileyebilecek bölgesel hatalar yaygındır. Hatta yüksek çözünürlüklü yapıların neredeyse tamamı, Ramachandran aykırı değerleri veya ters çevrilmiş dallı

protein yan zincirleri gibi en az birkaç yerel hata içerir. Yapılardaki bu tür hataları teşhis edip düzeltebilecek kolay ve güvenilir yöntemlerin bulunması hem kristalograf hem de son kullanıcı için kritik öneme sahiptir [116].

3.3.1. QMEAN

Protein yapı tahmini sırasında, daha sonra nihai modelin seçilmesi için bir dizi alternatif model üretilir. Bu modeller arasındaki en iyi modelin tanımlanması için bir puanlama işlevi, protein yapı tahmininin önemli bir bileşenidir. Bu amaçla, modellerin beklenen doğruluğunu tahmin etmeyi amaçlayan puanlama fonksiyonları geliştirilmiştir [117].

Temel olarak puanlama fonksiyonları iki kategoride incelenir. Bunlar, fizik tabanlı enerji potansiyelleri ve bilgiye dayalı istatistiksel potansiyellerdir. Bunlardan ilki, proteinlerdeki etkileşimleri saptayan gerçek etkili enerji fonksiyonlarıdır. İkincisi ise bilinen protein yapılarının verilerinden türetilen enerji fonksiyonlarıdır [118].

Her iki tür yönteme de erişim sağlayan QMEAN (Niteliksel Model Enerji Analizi), protein yapılarının ana geometrik yönlerini tanımlayabilen bileşik puanlama fonksiyonudur. Tekli modeller bazında hem global hem de yerel (kalıntı başına) kalite tahminlerini hesaplayan QMEAN puanlama işlevi, model seçimine yardımcı olmak ve sonraki iyileştirme adımında sorunlu bölgeleri belirlemek için kullanılabilir [117,118].

3.3.2. MolProbity

MolProbity, 3 boyutlu protein ve nükleik asit modellerinin kalite doğrulamasında yaygın olarak kullanılan bir web hizmetidir [119]. Bu sistem, molekül içerisindeki herhangi bir sterik problemin ayrıntılı tüm atom teması analizini sağlayabilir. Bileşenler arasındaki arayüzlerde H-bağı ve van der Waals temaslarını hesaplayabilir ve görüntüleyebilir. İşlemdeki ayrılmaz bir adım, polar veya apolar tüm hidrojen atomlarının eklenmesi ve tam optimizasyonudur. MolProbity sonuçları genel sayısal puanlar olarak, listeler olarak, indirilebilir PDB ve grafik dosyaları olarak ya da 3B kinemage grafikleri olarak farklı biçimlerde rapor edilebilir [120]. MolProbity, X-ışını kristalografisi için özel olarak tasarlanmış birkaç özelliğe sahiptir ve ayrıca kriyoEM, nötron, NMR ve hesaplamalı modeller için uygun ve kullanışlıdır [119].

3.4. Protein Stabilitesinin Analizi

Mutasyonlar, genomlara çeşitlilik getirerek evrimde temel roller oynarlar. Yapısal genlerdeki yanlış anlamlı mutasyonlar, protein stabilitesini etkileyerek organizma için avantajlı veya dezavantajlı hale gelebilir. Bu nedenle mutasyonların protein stabilitesi ve etkileşimleri üzerindeki etkilerini tahmin etmek, mutasyonların hastalığın ilerlemesi üzerindeki etkilerini anlamada önemlidir. [121].

Yabanıl tip ve mutant proteinler arasındaki stabilite değişikliklerini test etmede deneysel teknikler en doğru olmakla birlikte, zaman alıcı ve maliyetlidir [122]. Kişiselleştirilmiş tıp için gerekli olan dizileme verilerinin hızlı ve rutin olarak analiz edilmesine katkı sunmak amacıyla mutasyonların protein stabilitesi üzerindeki etkilerini tahmin etmede hesaplamalı yöntemlerin geliştirilmesine güçlü bir ihtiyaç vardır [123].

Mutasyonların etkilerini tahmin etmeye yönelik yöntemler, dizi ve yapı tabanlı yaklaşımlar olmak üzere iki farklı sınıfta incelenebilir. Dizi tabanlı yaklaşımda Destek Vektör Makinesi (INPS), sinir ağları ve karar ağaçları (iPTREE-STAB ve MuStab) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Yapı tabanlı yaklaşımda ise mutasyonların etkilerini tahmin etmek için makine öğrenimi teknikleri veya potansiyel enerjiye dayalı yöntemler kullanılır [124].

3.4.1. SDM2

SDM, mutasyonların protein stabilitesi üzerindeki etkilerini tahmin eden güncellenmiş bilgiye dayalı bir yaklaşımdır. SDM2 ise bu yaklaşımın web sunucusudur. SDM, yabanıl tip ile mutant protein arasındaki termal stabilitedeki değişikliği hesaplamak için konformasyonel olarak kısıtlanmış, ortama özgü ikame tablolarının (ESST'ler) kullanılmasına öncülük etmiştir [124]. Ayrıca SDM, mutasyonların protein stabilitesi üzerindeki etkisini daha iyi tahmin etmek için makine öğrenimi teknikleriyle birlikte başarıyla kullanılmıştır [125].

SDM2, yabanıl tip ve mutant protein yapıları arasındaki stabilite farkı skorunu hesaplamak amacıyla yeniden hesaplanmış ESST'ler kullanır. Burada ESST'lerin hesaplanmasına, kalıntı paketleme sıklığına dayalı yeni yapısal parametreler dahil edilmiştir [124].

3.4.2. mCSM

mCSM (Mutasyon Kesinti Tarama Matrisi), yanlış anlamlı mutasyonların davranış biçimlerini grafik tabanlı imzalara dayanarak analiz eden bir makine öğrenme yaklaşımıdır. Bu yaklaşım, protein kalıntı ortamını temsil etmek ve tahmine dayalı modelleri eğitmek için atomlar arasındaki mesafe modellerini kodlar.

Biyolojik sistemlerin ağ topolojisini mesafe modelleriyle temsil eden Kesinti Tarama Matrisi (CSM)'nden türetilen mCSM imzaları, bir mutasyonun etkisinin bir amino asit kalıntısını çevreleyen atomik mesafe kalıpları ile ilişkilendirilebileceğini göstermiştir. Ayrıca, mCSM'nin tümör baskılayıcı protein p53'te meydana gelen çeşitli mutasyonların stabilite değişikliklerini tahmin edebildiği gösterilmiştir [121].

3.4.3. DUET

DUET, proteinlerdeki yanlış anlamlı mutasyonların protein stabilitesi üzerindeki etkilerini incelemek için bütünlük bir hesaplama yaklaşımı sunan web tabanlı bir araçtır. Bu araç, iki tamamlayıcı stabilite analizi yaklaşımını (mCSM ve SDM), Destek Vektör Makineleri (SVM) kullanarak optimize eden birleştirici bir yöntemdir. mCSM ve SDM yöntemleri, farklı özellikleri ölçtükleri ve farklı bakış açıları üzerine inşa edildikleri için tamamlayıcıdır [125].

3.4.4. DynaMut2

DynaMut2, tek ve çok noktalı yanlış anlamlı mutasyonların, protein yapıdaki kararlılığı ve esnekliğini değerlendirmede kullanılan bir web sunucusu aracıdır. Bu araç, protein hareketlerini yakalamak için Normal Mod Analizi (NMA) yöntemlerini ve tek veya çok noktalı yanlış anlamlı mutasyonların protein stabilite ve dinamikleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yabancı tip ortamı temsil eden grafik tabanlı imzaları birleştirir [126].

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında COVID-19 hastalığı etmeni SARS-CoV-2 virüsü ile enfekte 1616 Avrupa (Şekil 4.1) ve 2483 Amerika (Şekil 4.2) izolatına ait nsp13 mutasyon verileri Mega XI (Şekil 4.3) yazılımı kullanılarak derlendi. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteininin Amerika izolatlarında 7 (Ser36Pro, Thr127Asn, His164Tyr, Met233Ile, Ala368Val, Ala389Val, Thr599Ile), Avrupa izolatlarında 2 (Pro77Leu, Gly170Ser) ve her iki izolatta ortak olan 2 (Tyr324Cys, Arg394Cys) mutasyon belirlendi. Elde edilen mutant protein dizi verileri derin öğrenme algoritmaları kullanılarak Robetta aracı ile modellendi. İzolatlara ait mutasyon verileri ile SARS-CoV-2 virüsü nsp13 için toplam 10 protein modeli oluşturuldu ve değerlendirildi. Bu mutasyonların protein yapı ve stabilitesi üzerindeki etkileri SDM2, mCSM, DUET ve DynaMut2 ile analiz edildi. Protein stabilite analizlerinde derin öğrenme algoritmalarıyla oluşturulan 5 farklı yabancı tip SARS-CoV-2 nsp13 referans olarak kullanıldı.

Protein Sequences																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Species/Abbrev		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*


```

nsp13_wt  AVGACVLCNSQTSLRGACIRRPFLCCKCCYDHVISTSHKLVLVSNPYVCNAPGCDVTDV
nsp13_euro AVGACVLCNSQTSLRGACIRRPFLCCKCCYDHVISTSHKLVLVSNPYVCNAPGCDVTDV
nsp13_amer AVGACVLCNSQTSLRGACIRRPFLCCKCCYDHVIPTSHKLVLVSNPYVCNAPGCDVTDV
*****

nsp13_wt  TQLYLGGMSYYCKSHKPPISFPLCANGQVFLYKNTCVGSDNVTDFAIATCDWTNAGDY
nsp13_euro TQLYLGGMSYYCKSHKLPISFPLCANGQVFLYKNTCVGSDNVTDFAIATCDWTNAGDY
nsp13_amer TQLYLGGMSYYCKSHKPPISFPLCANGQVFLYKNTCVGSDNVTDFAIATCDWTNAGDY
*****

nsp13_wt  ILANTCTERLKLFAAETLKATEETFKLSYGIATVREVLSDRELHLSWEVGKPRPPLNRNY
nsp13_euro ILANTCTERLKLFAAETLKATEETFKLSYGIATVREVLSDRELHLSWEVSKPRPPLNRNY
nsp13_amer ILANTCNERLKLFAAETLKATEETFKLSYGIATVREVLSDRELLSWEVGKPRPPLNRNY
*****

nsp13_wt  VFTGYRVTKNSKVQIGEYTFEKGDYGDVAVYRGTTTTYKLVNGDYFVLTSHTVMPLSAPTL
nsp13_euro VFTGYRVTKNSKVQIGEYTFEKGDYGDVAVYRGTTTTYKLVNGDYFVLTSHTVMPLSAPTL
nsp13_amer VFTGYRVTKNSKVQIGEYTFEKGDYGDVAVYRGTTTTYKLVNGDYFVLTSHTVIPLSAPTL
*****

nsp13_wt  VPQEHYVRITGLYPTLNISDEFSSNVANYQKVGMMQKYSTLQGPPGTGKSHFAIGLALYYP
nsp13_euro VPQEHYVRITGLYPTLNISDEFSSNVANYQKVGMMQKYSTLQGPPGTGKSHFAIGLALYYP
nsp13_amer VPQEHYVRITGLYPTLNISDEFSSNVANYQKVGMMQKYSTLQGPPGTGKSHFAIGLALYYP
*****

nsp13_wt  SARIVYTACSHAAMDALCEKALKYLPIDKCSRIIPARARVECFDKFKVNSTLEQYVFCTV
nsp13_euro SARIVYTACSHAAMDALCEKALKCLPIDKCSRIIPARARVECFDKFKVNSTLEQYVFCTV
nsp13_amer SARIVYTACSHAAMDALCEKALKCLPIDKCSRIIPARARVECFDKFKVNSTLEQYVFCTV
*****

nsp13_wt  NALPETTADIVVFDEISMATNYDLSVVNARLRAKHVYVIGDPAQLPAPRTLLTKGTLEPE
nsp13_euro NALPETTADIVVFDEISMATNYDLSVVNARLCAKHVYVIGDPAQLPAPRTLLTKGTLEPE
nsp13_amer NALPETTVDIVVFDEISMATNYDLSVVNVRLCAKHVYVIGDPAQLPAPRTLLTKGTLEPE
*****

nsp13_wt  YFNSVCRLMKTIGPDMFLGTCRRCPAEIVDVSALVYDNKLKAHKDKSAQCCKMFYKGV
nsp13_euro YFNSVCRLMKTIGPDMFLGTCRRCPAEIVDVSALVYDNKLKAHKDKSAQCCKMFYKGV
nsp13_amer YFNSVCRLMKTIGPDMFLGTCRRCPAEIVDVSALVYDNKLKAHKDKSAQCCKMFYKGV
*****

nsp13_wt  THDVSSAINRPQIGVVREFLTRNPAWRKAVFISPYNSQNAVASKILGLPTQTVDSSQGSE
nsp13_euro THDVSSAINRPQIGVVREFLTRNPAWRKAVFISPYNSQNAVASKILGLPTQTVDSSQGSE
nsp13_amer THDVSSAINRPQIGVVREFLTRNPAWRKAVFISPYNSQNAVASKILGLPTQTVDSSQGSE
*****

nsp13_wt  YDYVIFTQTTETAHSCNVNRFNVAITRAKVILCIMSDDLYDKLQFTSLEIPRRNVATL
nsp13_euro YDYVIFTQTTETAHSCNVNRFNVAITRAKVILCIMSDDLYDKLQFTSLEIPRRNVATL
nsp13_amer YDYVIFTQTTETAHSCNVNRFNVAITRAKVILCIMSDDLYDKLQFTSLEIPRRNVAIL
*****

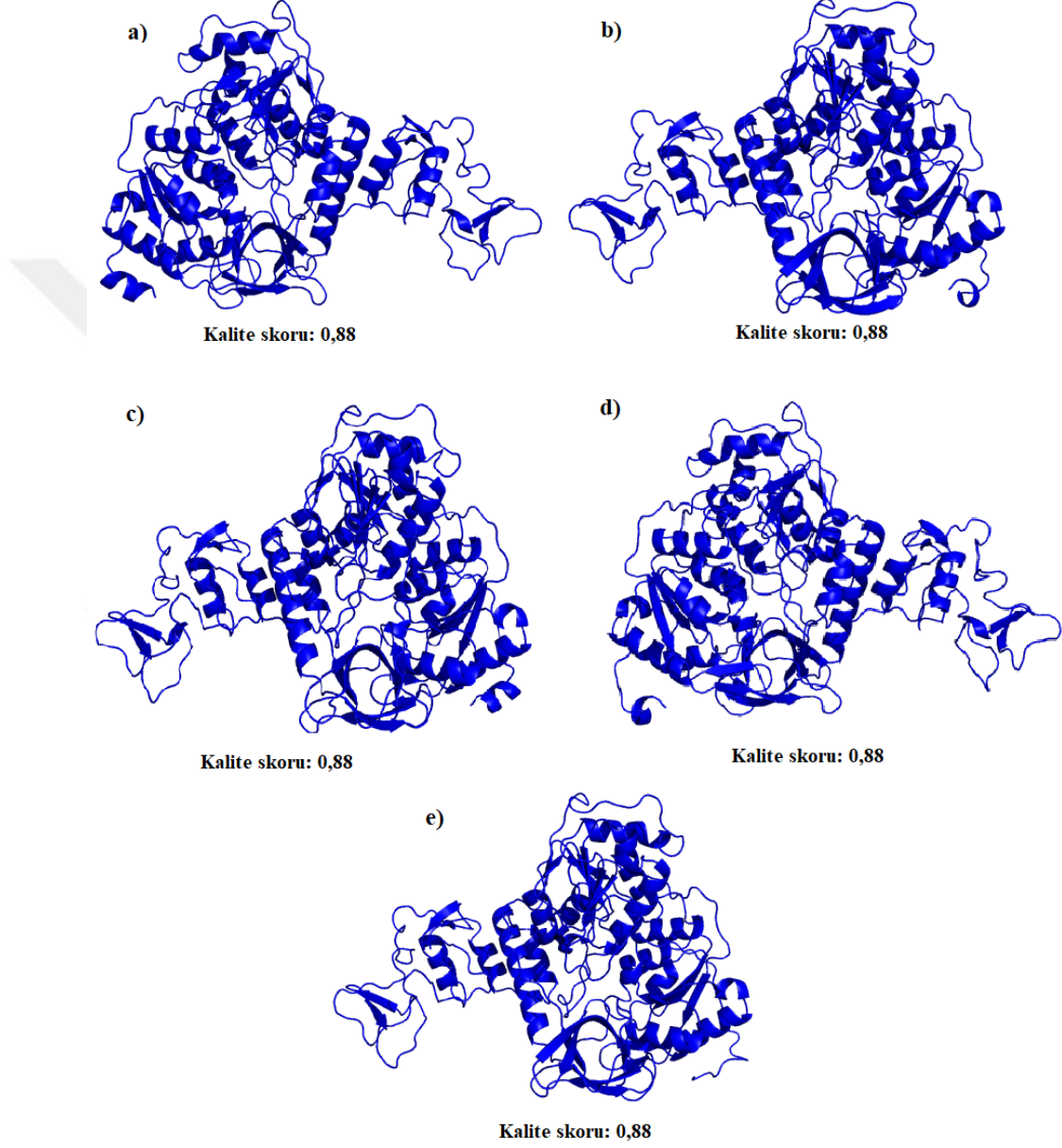
nsp13_wt  Q
nsp13_euro Q
nsp13_amer Q
*
```

Şekil 4.3. SARS-CoV-2'nin nsp13'ünün Avrupa ve Amerika izolatlarından elde edilen mutasyon verilerinin referans dizi ile hizalanmış gösterimi

4.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları

4.1.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Yabanıl Tip Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları

4.1.1.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Yabanıl Tip Homoloji Modelleri



Şekil 4.4. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini yabanıl tip homoloji modelleri

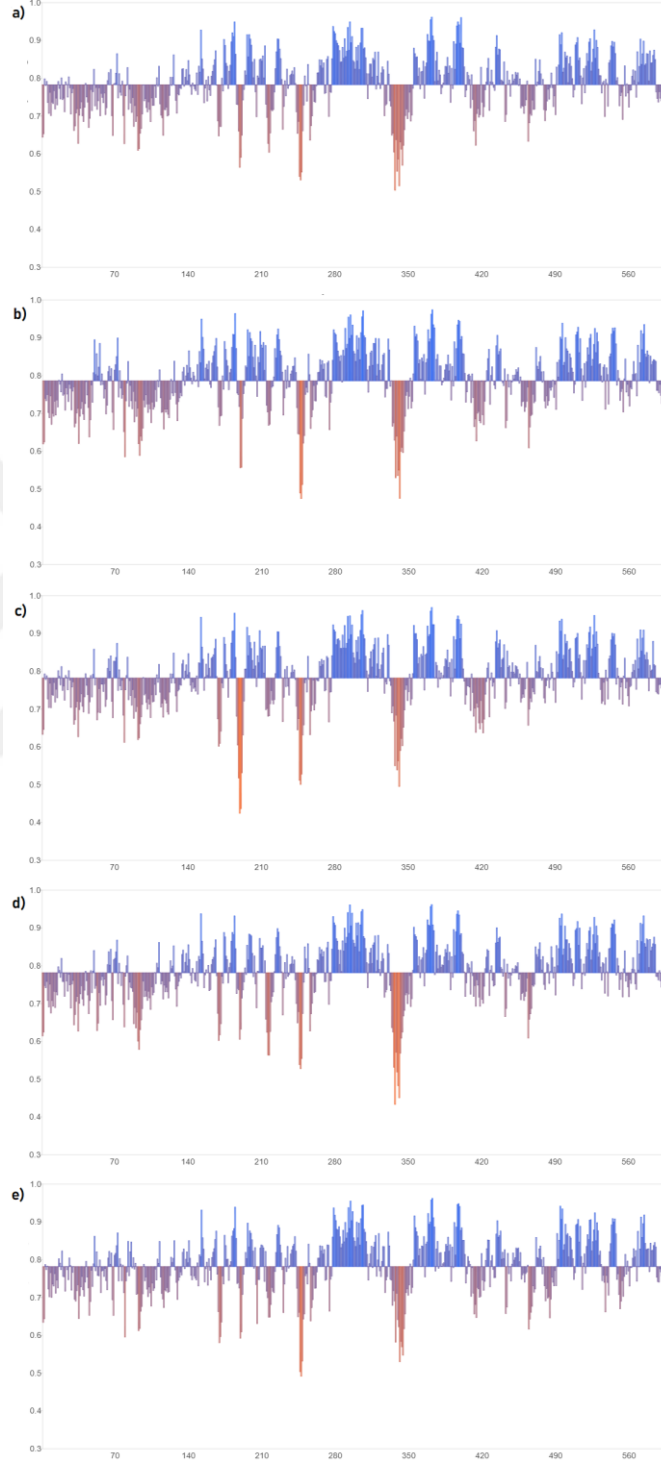
a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5

4.1.1.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Yabanıl Tip Homoloji Modellerinin Molprobit Kalite Skorları

Çizelge 4.1. Yabanıl tip SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Molprobit kalite değerleri

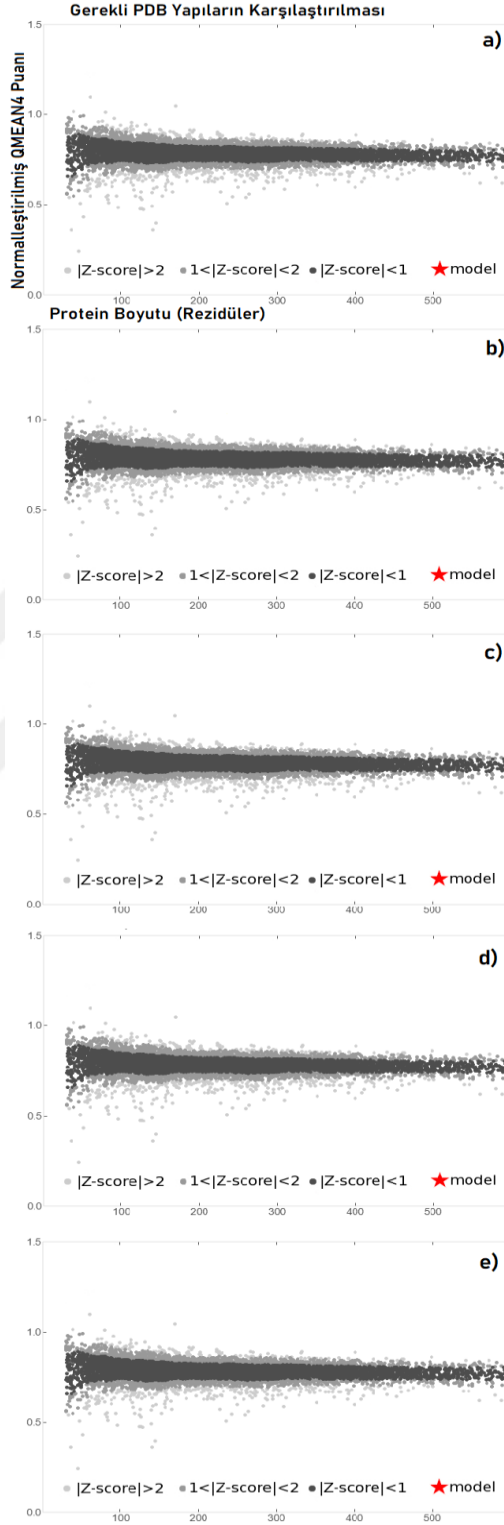
		Yabanıl Tip Model 1		Yabanıl Tip Model 2		Yabanıl Tip Model 3		Yabanıl Tip Model 4		Yabanıl Tip Model 5		Hedef
Protein Geometrisi	Zayıf rotamerler	1	0.19%	0	0.00%	1	0.19%	2	0.38%	0	0.00%	<0.3%
	Tercih edilen rotamerler	521	99.62%	523	100%	521	99.62%	517	98.85%	523	100%	>98%
	Ramachandran aykırı değerleri	2	0.33%	3	0.50%	5	0.83%	1	0.17%	3	0.50%	<0.05%
	Tercih edilen Ramachandran	585	97.66%	587	98.00%	585	97.66%	589	98.33%	582	97.16%	>98%
	Rama dağılımı Z-skoru	0.05 ± 0.32		0.38 ± 0.33		-0.21 ± 0.32		0.21 ± 0.32		0.35 ± 0.33		abs (Z score) < 2
	Cβ sapmalar >0.25Å	0	0.00%	1	0.18%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0
	Kötü bağlar:	2 / 4798	0.04%	9 / 4798	0.19%	6 / 4798	0.13%	4 / 4798	0.08%	5 / 4798	0.10%	0%
	Kötü açılar:	12 / 6528	0.18%	8 / 6528	0.12%	10 / 6528	0.15%	11 / 6528	0.17%	11 / 6528	0.17%	<0.1%
Peptit Omegaları	Cis Prolinler:	0 / 30	0.00%	0 / 30	0.00%	0 / 30	0.00%	0 / 30	0.00%	0 / 30	0.00%	Beklenen: ≤1 zincir başına, or ≤5%
	Cis nonProlinler:	1 / 570	0.18%	2 / 570	0.35%	1 / 570	0.18%	1 / 570	0.18%	1 / 570	0.18%	<0.05%
Düşük Çözünürlüklü Kriterler	CaBLAM aykırı değerler	9	1.5%	13	2.2%	17	2.8%	13	2.2%	10	1.7%	<1.0%
	CA Geometri aykırı değerleri	2	0.34%	3	0.50%	2	0.34%	2	0.34%	3	0.50%	<0.5%
Ek Doğrulamalar	Chiral hacim aykırı değerleri	0 / 751		0 / 751		0 / 751		0 / 751		0 / 751		

4.1.1.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Yabanıl Tip Homoloji Modellerinin QMEAN Kalite Skorları



Şekil 4.5. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini yabanıl tip homoloji modellerinin QMEAN kalite skorları

a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5

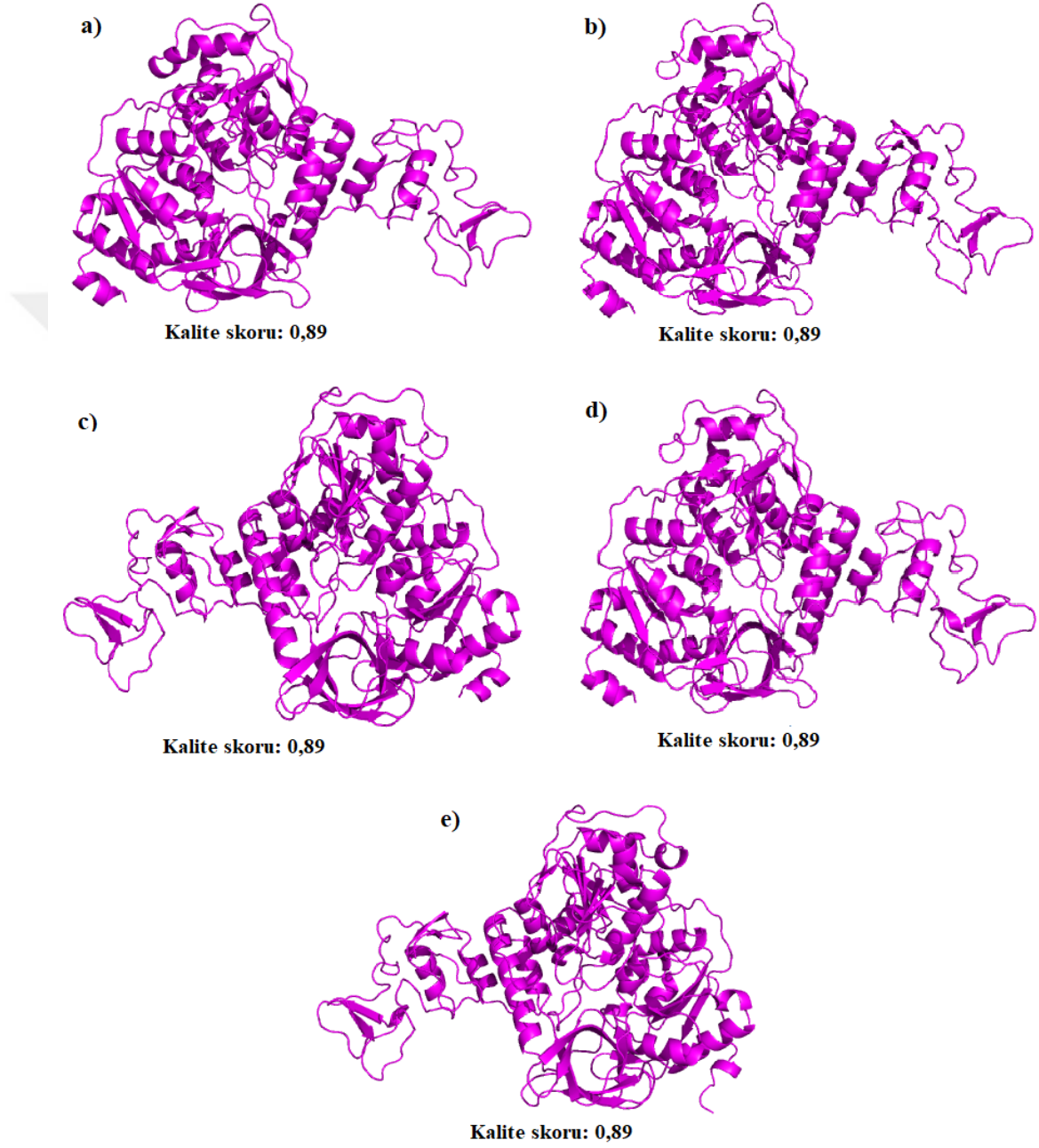


Şekil 4.6. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini yabancı tip homoloji modellerinin Z-kalite skorları

a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5

4.1.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Amerika İzolatları Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları

4.1.2.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Amerika İzolatları Homoloji Modelleri



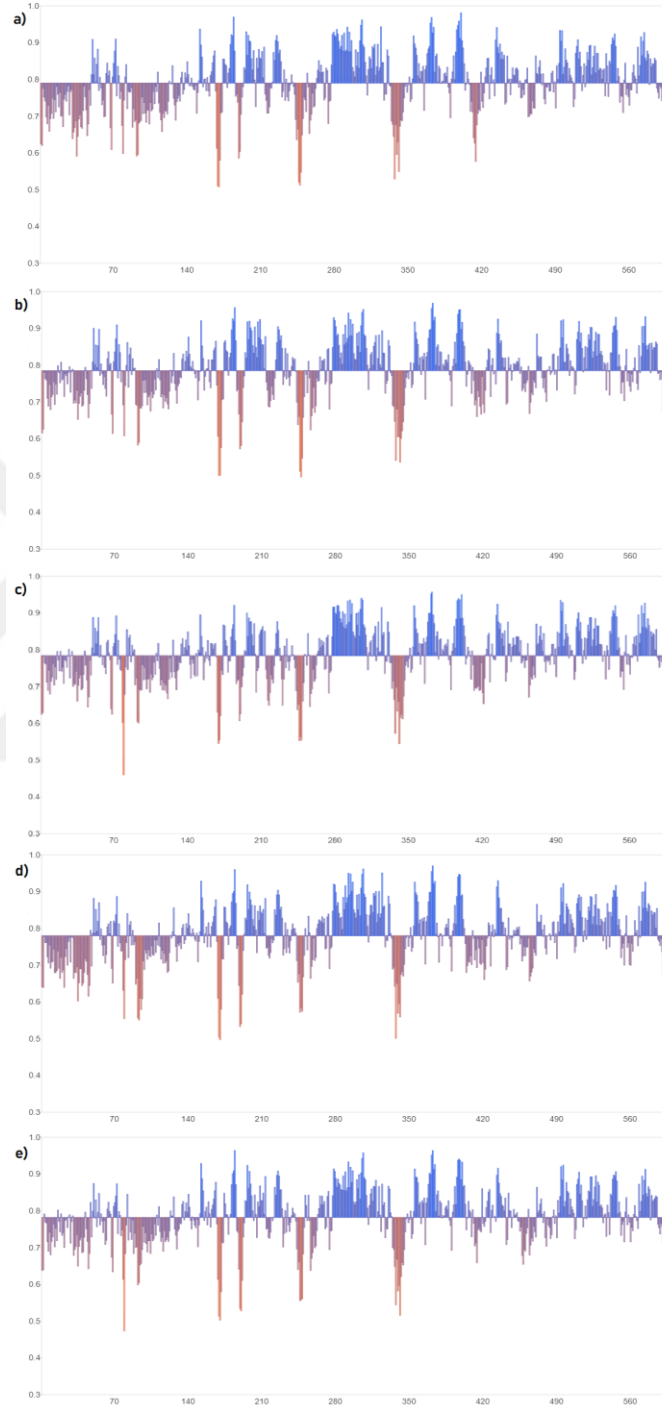
Şekil 4.7. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatları homoloji modelleri
a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5

4.1.2.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteini Amerika İzolatları Homoloji Modellerinin Molprobitiy Kalite Skorları

Çizelge 3.2. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarının Molprobitiy kalite değerleri

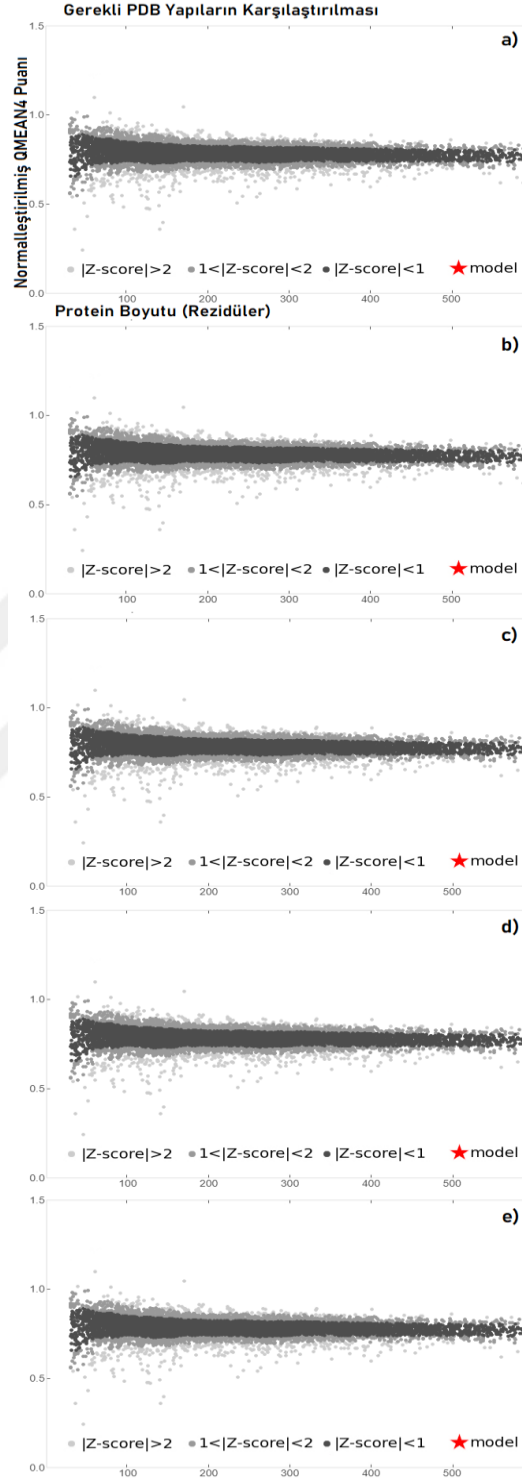
		Amerika Model 1		Amerika Model 2		Amerika Model 3		Amerika Model 4		Amerika Model 5		Hedef
Protein Geometrisi	Zayıf rotamerler	0	0.00%	1	0.19%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	<0.3%
	Tercih edilen rotamerler	524	99.81%	521	99.24%	523	99.62%	517	98.48%	522	99.43%	>98%
	Ramachandran aykırı değerleri	1	0.17%	2	0.33%	2	0.33%	5	0.83%	5	0.83%	<0.05%
	Tercih edilen Ramachandran	585	97.66%	586	97.83%	587	98.00%	581	96.99%	586	97.83%	>98%
	Rama dağılımı Z-skoru	0.67 ± 0.33		-0.09 ± 0.33		-0.06 ± 0.32		0.33 ± 0.33		0.15 ± 0.35		abs (Z score) < 2
	Cβ sapmalar >0.25Å	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0
	Kötü bağlar:	5 / 4796	0.10%	8 / 4796	0.17%	5 / 4796	0.10%	8 / 4796	0.17%	6 / 4796	0.13%	0%
	Kötü açılar:	10 / 6528	0.15%	7 / 6528	0.11%	15 / 6528	0.23%	17 / 6528	0.26%	13 / 6528	0.20%	<0.1%
Peptit Omegaları	Cis Prolinler:	0 / 31	0.00%	0 / 31	0.00%	0 / 31	0.00%	0 / 31	0.00%	0 / 31	0.00%	Beklenen: ≤1 zincir başına, or ≤5%
	Cis nonProlinler:	1 / 569	0.18%	0 / 569	0.00%	2 / 569	0.35%	1 / 569	0.18%	1 / 569	0.18%	<0.05%
Düşük Çözünürlüklü Kriterler	CaBLAM aykırı değerler	7	1.2%	9	1.5%	14	2.3%	14	2.3%	13	2.2%	<1.0%
	CA Geometri aykırı değerleri	4	0.67%	2	0.34%	2	0.34%	2	0.34%	0	0.00%	<0.5%
Ek Doğrulamalar	Chiral hacim aykırı değerleri	0/753		0/753		0/753		0/753		0/753		

4.1.2.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Amerika İzolatları Homoloji Modellerinin QMEAN Kalite Skorları



Şekil 4.8. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarının homoloji modellerinin QMEAN kalite skorları

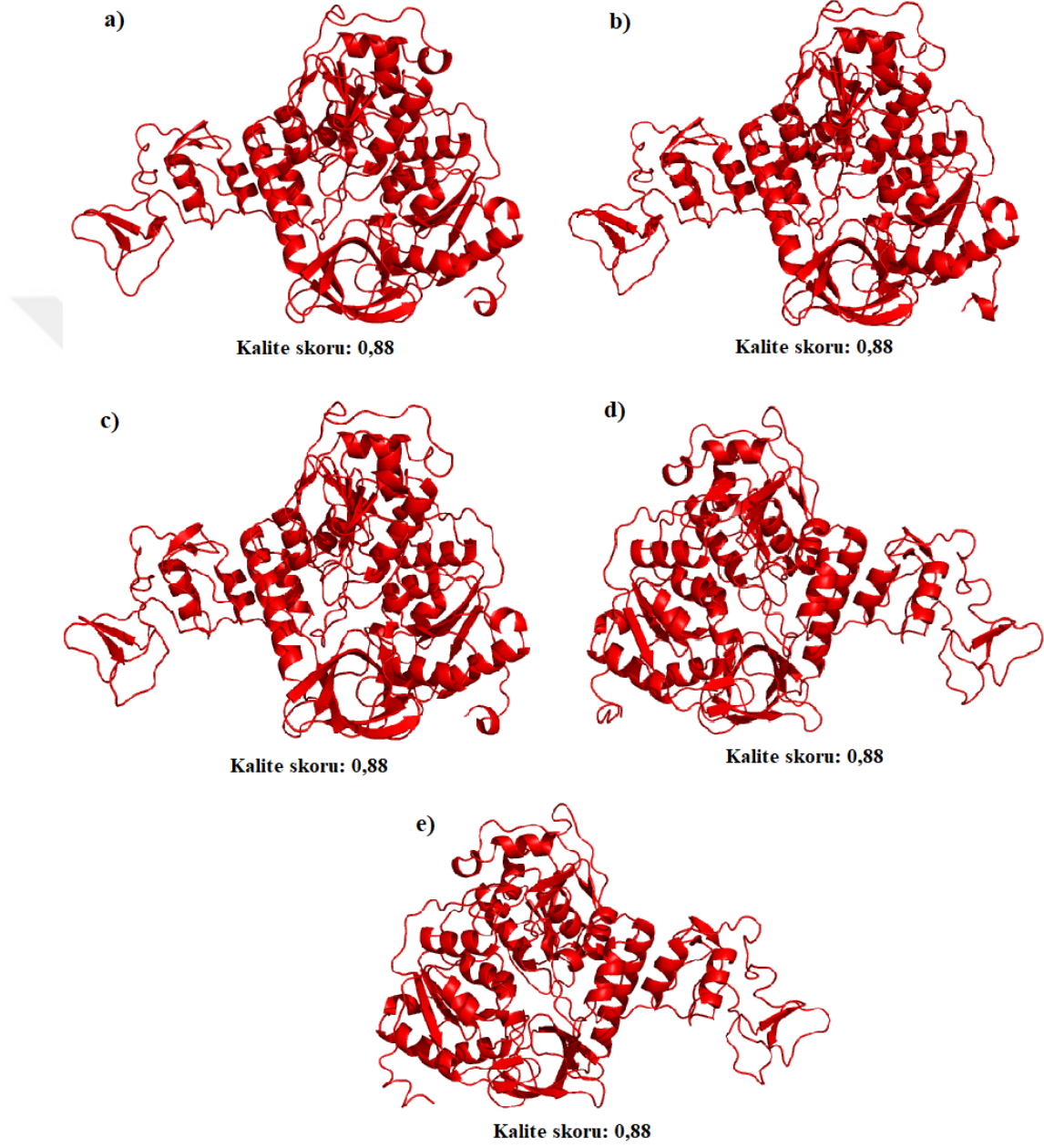
a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5



Şekil 4.9. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarının homoloji modellerinin Z-kalite skorları
a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5

4.1.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Avrupa İzolatları Homoloji Modelleri ve Kalite Skorları

4.1.3.1. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Avrupa İzolatları Homoloji Modelleri



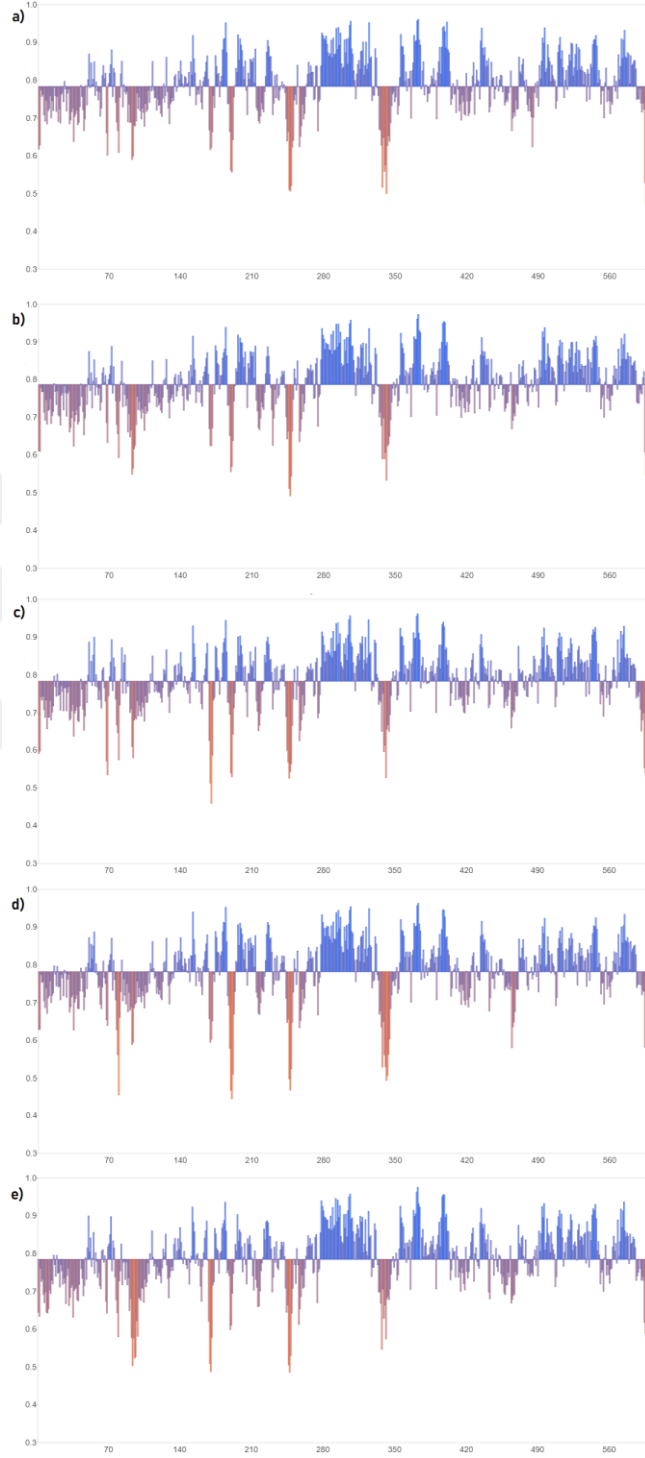
Şekil 4.10. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini Avrupa izolatları homoloji modelleri
a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5

4.1.3.2. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Avrupa İzolatları Homoloji Modellerinin Molprobitiy Kalite Skorları

Çizelge 4.3. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini Avrupa izolatlarının Molprobitiy kalite değerleri

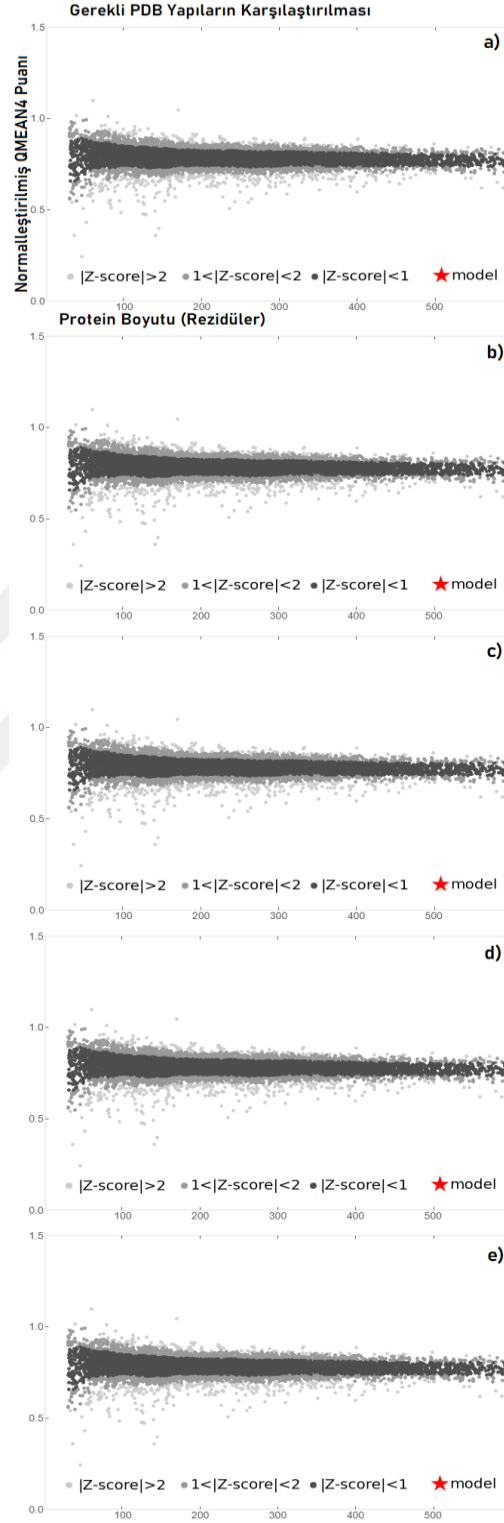
		Avrupa Model 1		Avrupa Model 2		Avrupa Model 3		Avrupa Model 4		Avrupa Model 5		Hedef
Protein Geometrisi	Zayıf rotamerler	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	1	0.19%	0	0.00%	<0.3%
	Tercih edilen rotamerler	522	99.62%	522	99.62%	524	100.00%	520	99.24%	520	99.24%	>98%
	Ramachandran aykırı değerleri	3	0.50%	2	0.33%	4	0.67%	4	0.67%	2	0.33%	<0.05%
	Tercih edilen Ramachandran	585	97.66%	582	97.16%	584	97.50%	584	97.50%	580	96.83%	>98%
	Rama dağılımı Z-skoru	0.55 ± 0.34		0.36 ± 0.32		0.35 ± 0.33		0.10 ± 0.32		0.13 ± 0.32		abs (Z score) < 2
	Cβ sapmalar >0.25Å	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0
	Kötü bağlar:	4 / 4788	0.08%	4 / 4788	0.08%	8 / 4788	0.17%	4 / 4788	0.08%	8 / 4788	0.17%	0%
	Kötü açılar:	9 / 6514	0.14%	8 / 6514	0.12%	8 / 6514	0.12%	18 / 6514	0.28%	8 / 6514	0.12%	<0.1%
Peptit Omegaları	Cis Prolinler:	0 / 29	0.00%	0 / 29	0.00%	0 / 29	0.00%	0 / 29	0.00%	0 / 29	0.00%	Beklenen: ≤1 zincir başına, or ≤5%
	Cis nonProlinler:	13	2.2%	0 / 571	0.00%	1 / 571	0.18%	2 / 571	0.35%	0 / 571	0.00%	<0.05%
Düşük Çözünürlüklü Kriterler	CaBLAM aykırı değerler	2	0.34%	13	2.2%	14	2.3%	11	1.8%	13	2.2%	<1.0%
	CA Geometri aykırı değerleri	0	0.00%	2	0.34%	1	0.17%	2	0.34%	2	0.34%	<0.5%
Ek Doğrulamalar	Chiral hacim aykırı değerleri	0/753		0/753		0/753		0/753		0/753		

4.1.3.3. SARS-CoV-2 Virüsü nsp13 Proteinini Avrupa İzolatları Homoloji Modellerinin QMEAN Kalite Skorları



Şekil 4.11. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarının homoloji modellerinin QMEAN kalite skorları

a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5



Şekil 4.12. SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarının homoloji modellerinin Z-kalite skorları
a) Model 1, b) Model 2, c) Model 3, d) Model 4, e) Model 5

4.2. Protein Stabilite Analizleri

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteininin Amerika izolatlarında 7 (Ser36Pro, Thr127Asn, His164Tyr, Met233Ile, Ala368Val, Ala389Val, Thr599Ile), Avrupa izolatlarında 2 (Pro77Leu, Gly170Ser) ve her iki izolatta ortak olan 2 (Tyr324Cys, Arg394Cys) mutasyon belirlendi. Bu mutasyonların protein yapı ve stabilitesi üzerindeki etkileri SDM2, mCSM, DUET ve DynaMut2 ile analiz edildi. Protein stabilite analizlerinde derin öğrenme algoritmalarıyla oluşturulan 5 farklı yabancı tip SARS-CoV-2 nsp13 referans olarak kullanıldı.

Çizelge 4.4. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 1 için protein stabilite analiz sonuçları
 $\Delta\Delta G$ (kcal.mol⁻¹)

Yabancı Tip	Pozisyon	Mutant	SDM2	mCSM	DUET	DynaMut2
Ser	36	Pro	-1.35	-0.297	-0.206	-0.21
Pro	77	Leu	-0.58	-0.304	0.003	-0.31
Thr	127	Asn	-0.28	-0.309	-0.146	-0.07
His	164	Tyr	0.78	0.717	1.027	1.24
Gly	170	Ser	-4.37	-0.808	-1.374	-0.75
Met	233	Ile	0.61	-0.178	0.449	-0.16
Tyr	324	Cys	-0.46	-1.581	-1.382	-1.43
Ala	368	Val	0.99	-0.681	-0.05	-0.79
Ala	389	Val	-0.84	-0.809	-0.592	-0.67
Arg	392	Cys	-0.21	-0.496	-0.444	0.85
Thr	599	Ile	0.56	-0.167	0.231	-0.07

Çizelge 4.5. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 2 için protein stabilite analiz sonuçları

$\Delta\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)						
Yabancıl Tip	Pozisyon	Mutant	SDM2	mCSM	DUET	DynaMut2
Ser	36	Pro	-1.35	-0.312	-0.222	-0.14
Pro	77	Leu	-0.58	-0.428	-0.127	-0.43
Thr	127	Asn	-0.28	-0.461	-0.306	-0.1
His	164	Tyr	0.78	0.703	1.015	1.22
Gly	170	Ser	-4.37	-0.755	-1.321	-0.22
Met	233	Ile	0.37	-0.157	0.428	-0.09
Tyr	324	Cys	-0.46	-1.67	-1.473	-1.21
Ala	368	Val	0.99	-0.641	-0.008	-0.74
Ala	389	Val	-0.84	-0.796	-0.578	-0.72
Arg	392	Cys	-0.21	-0.531	-0.477	0.85
Thr	599	Ile	1.51	-0.149	0.643	-0.16

Çizelge 4.6. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 3 için protein stabilite analiz sonuçları

$\Delta\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)						
Yabancıl Tip	Pozisyon	Mutant	SDM2	mCSM	DUET	DynaMut2
Ser	36	Pro	-1.35	-0.279	-0.079	-0.12
Pro	77	Leu	-0.58	-0.348	-0.043	-0.32
Thr	127	Asn	-0.28	-0.393	-0.234	-0.22
His	164	Tyr	0.78	0.609	0.932	1.03
Gly	170	Ser	-0.16	-0.744	-0.7	-0.19
Met	233	Ile	0.37	-0.671	-0.089	-0.37
Tyr	324	Cys	-0.46	-1.893	-1.702	-1.66
Ala	368	Val	0.99	-0.685	-0.054	-0.7
Ala	389	Val	-0.84	-0.811	-0.594	-0.69
Arg	392	Cys	-0.21	-0.482	-0.431	0.88
Thr	599	Ile	1.51	-0.163	0.43	-0.07

Çizelge 4.7. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 4 için protein stabilite analiz sonuçları

$\Delta\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)						
Yabancıl Tip	Pozisyon	Mutant	SDM2	mCSM	DUET	DynaMut2
Ser	36	Pro	-1.35	-0.272	-0.179	-0.09
Pro	77	Leu	-0.58	-0.391	-0.024	-0.31
Thr	127	Asn	-0.28	-0.287	-0.123	-0.48
His	164	Tyr	0.91	0.847	1.184	1.29
Gly	170	Ser	-0.16	-0.747	-0.703	-0.19
Met	233	Ile	0.03	-0.136	0.404	-0.04
Tyr	324	Cys	-0.37	-1.715	-1.512	-1.76
Ala	368	Val	0.99	-0.685	-0.054	-0.71
Ala	389	Val	-1.69	-0.747	-0.744	-0.66
Arg	392	Cys	-0.21	-0.495	-0.443	0.86
Thr	599	Ile	1.51	-0.104	0.456	-0.06

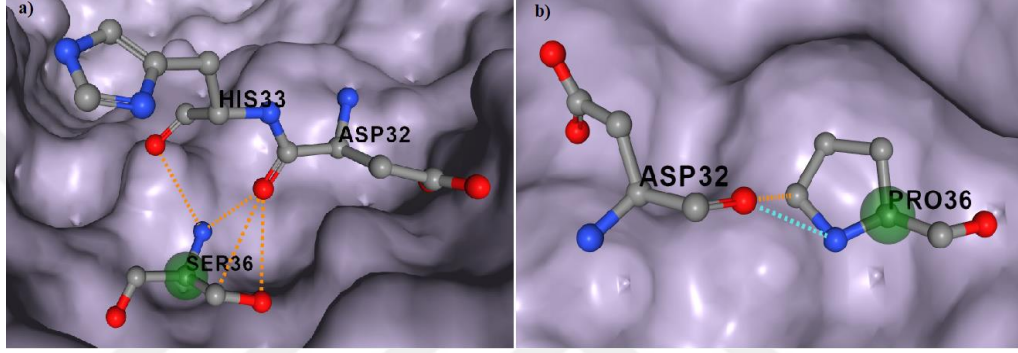
Çizelge 4.8. SARS-CoV-2 nsp13 proteini model 5 için protein stabilite analiz sonuçları

$\Delta\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)						
Yabancıl Tip	Pozisyon	Mutant	SDM2	mCSM	DUET	DynaMut2
Ser	36	Pro	-1.35	-0.251	-0.157	0.01
Pro	77	Leu	-0.58	-0.463	-0.225	-0.51
Thr	127	Asn	-0.33	-0.571	-0.436	-0.19
His	164	Tyr	0.78	0.694	1.007	1.44
Gly	170	Ser	-0.16	-0.729	-0.684	-0.24
Met	233	Ile	0.03	-0.206	0.334	-0.2
Tyr	324	Cys	-0.46	-1.727	-1.532	-1.87
Ala	368	Val	0.99	-0.689	-0.058	-0.55
Ala	389	Val	-0.84	-0.773	-0.553	-0.7
Arg	392	Cys	-0.21	-0.501	-0.449	0.76
Thr	599	Ile	0.98	-0.005	0.54	0.15

4.2.1. SARS-CoV-2 nsp13 Proteinini Model 1’de Görülen Mutasyonlar

4.2.1.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

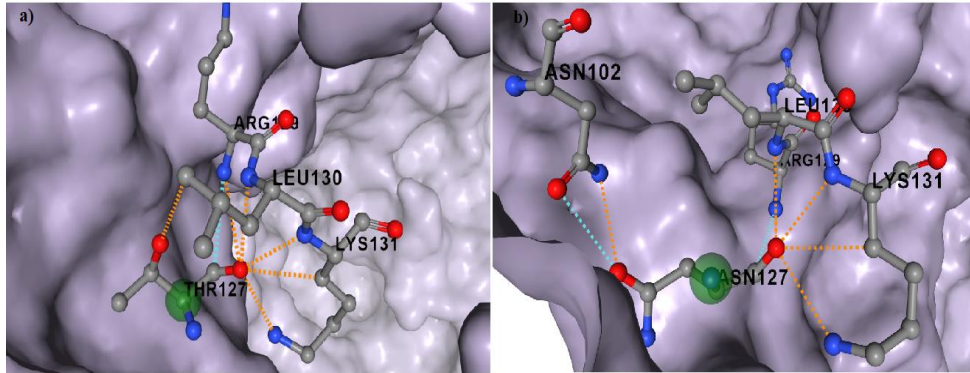
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini Amerika izolatlarında Ser36Pro mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancı tipte 36. pozisyonda Serin’in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 1 polar, 1 Van der Waals etkileşime indirildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi

a) Yabancı tip, b) Mutant

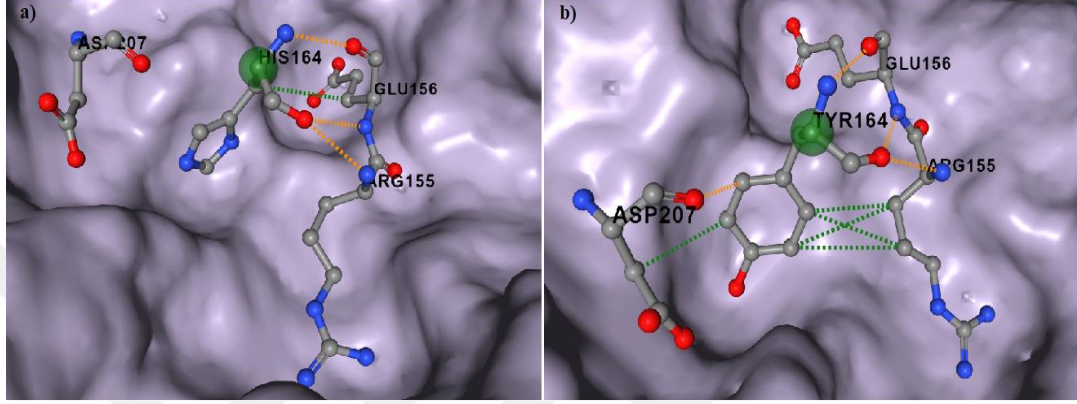
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini Amerika izolatlarında Thr127Asn mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancı tipte 127. pozisyonda Treonin’in 6 polar, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 5 polar, 2 Van der Waals etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi

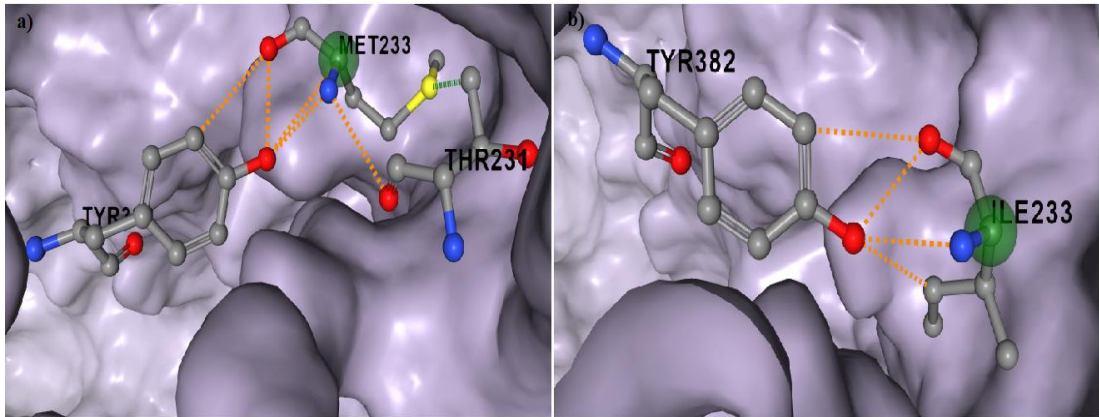
a) Yabancı tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında His164Tyr mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 164. pozisyonda Histidin'in 3 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar 5 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.15).



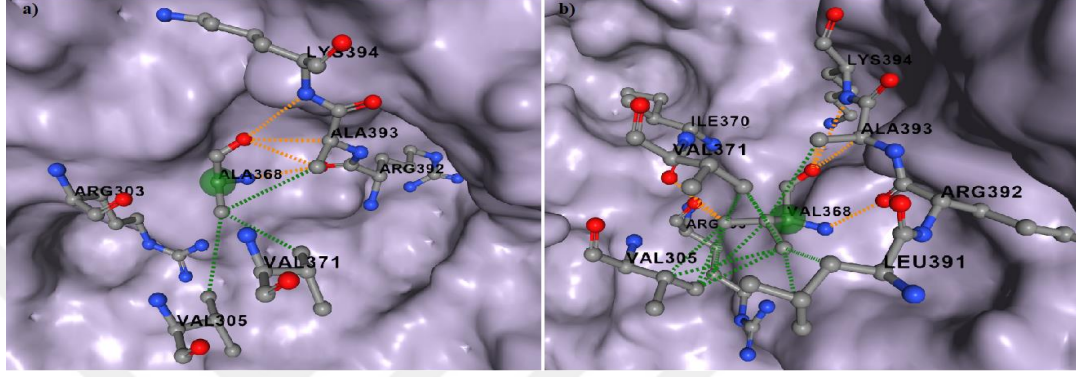
Şekil 4.15. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Met233Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 233. pozisyonda Metiyonin'in 5 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar etkileşime indirgendi (Şekil 4.16).



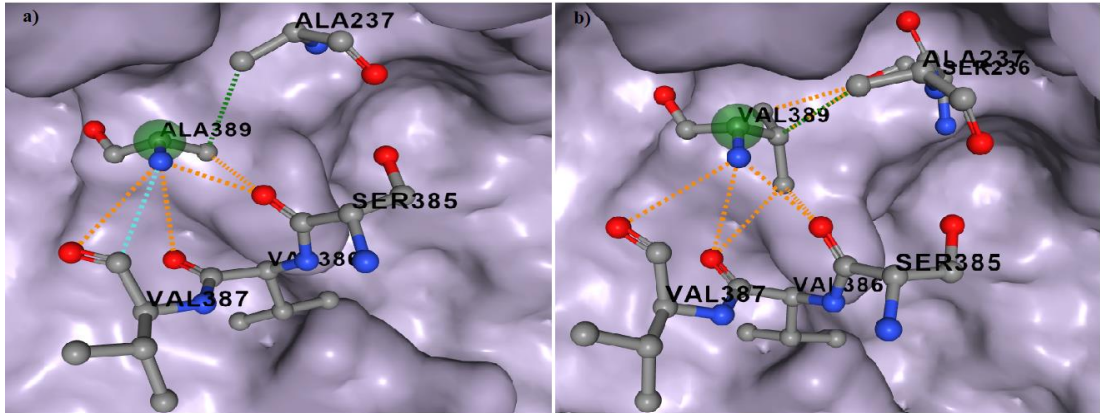
Şekil 4.16. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala368Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 368. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 3 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 6 polar, 12 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.17).



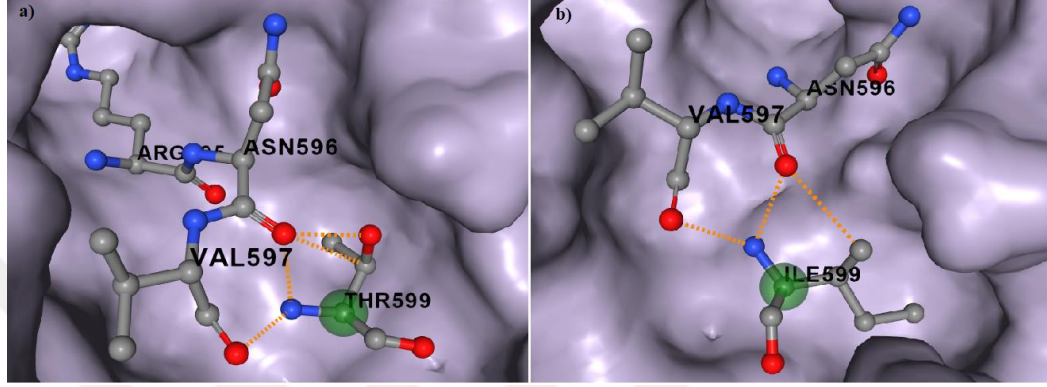
Şekil 4.17. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala389Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 389. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 1 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 7 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

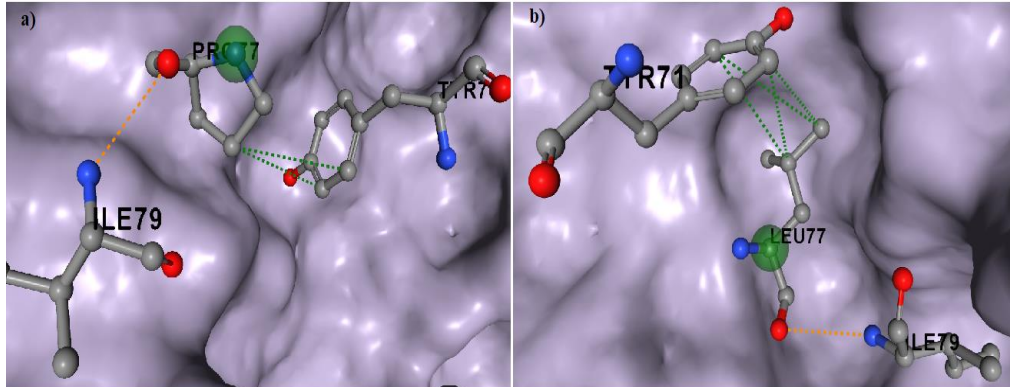
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr599Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 599. pozisyonda Treonin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

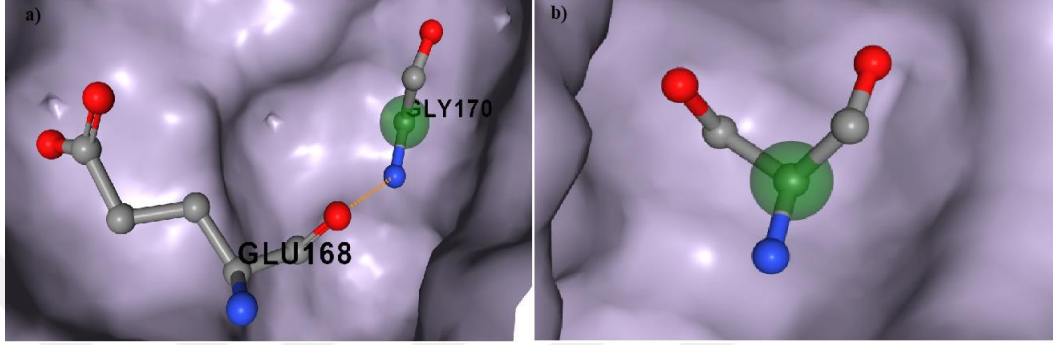
4.2.1.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Pro77Leu mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 77. pozisyonda Prolin'in 1 polar, 2 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 1 polar, 4 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

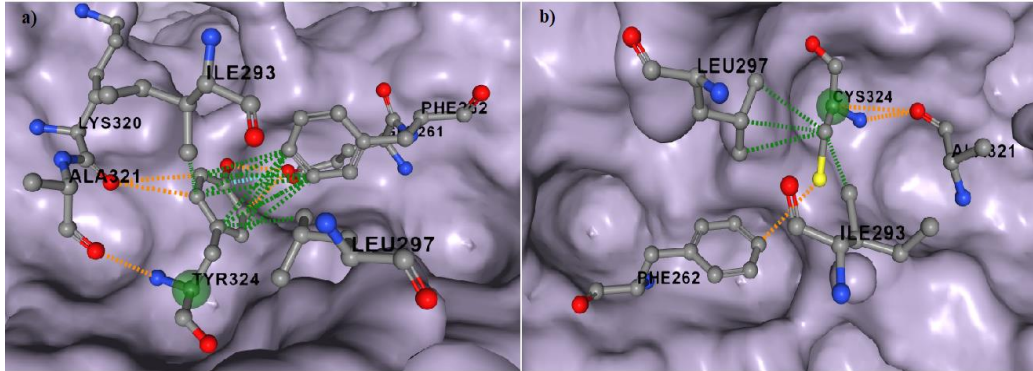
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Gly170Ser mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 170. pozisyonda Glisin'in 1 polar etkileşim ile tersiyer yapı stabilitesini sağlarken, mutasyon sonrası çevre rezidüleri ile bir etkileşim oluşturmadı (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

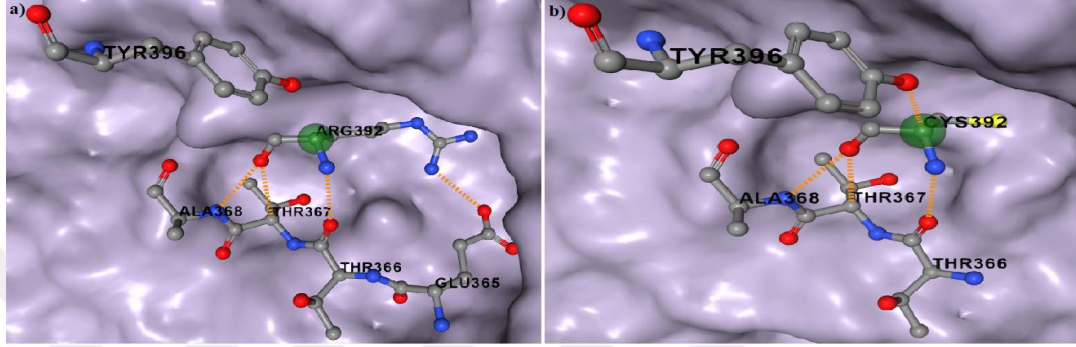
4.2.1.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Tyr324Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 324. pozisyonda Tirozin'in 5 polar, 12 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar, 4 hidrofobik etkileşime indirgendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Arg392Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 392. pozisyonda Arjinin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası yine 4 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.23).

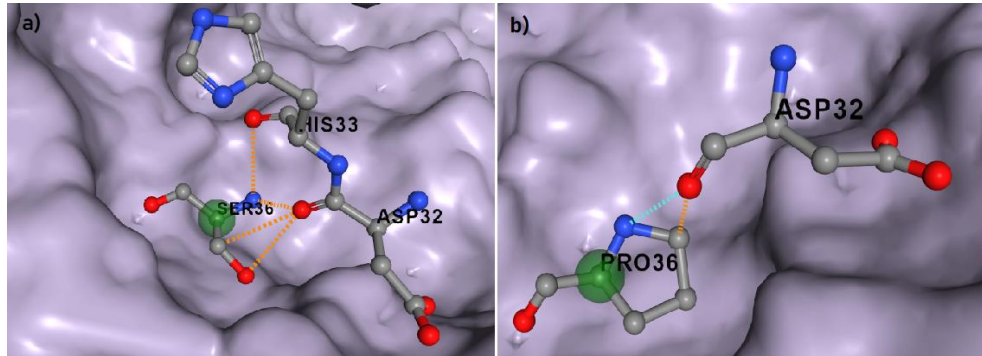


Şekil 4.23. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

4.2.2. SARS-CoV-2 nsp13 Proteini Model 2’de Görülen Mutasyonlar

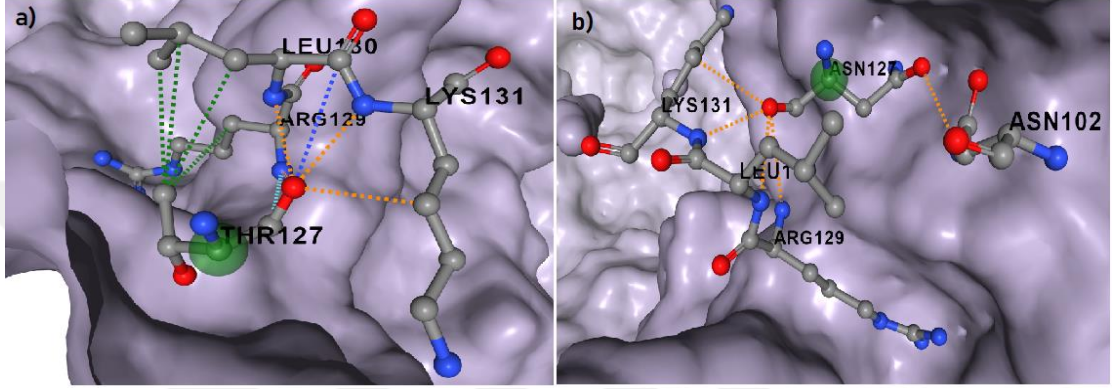
4.2.2.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ser36Pro mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 36. pozisyonda Serin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 1 polar, 1 Van der Waals etkileşime indirildi (Şekil 4.24).



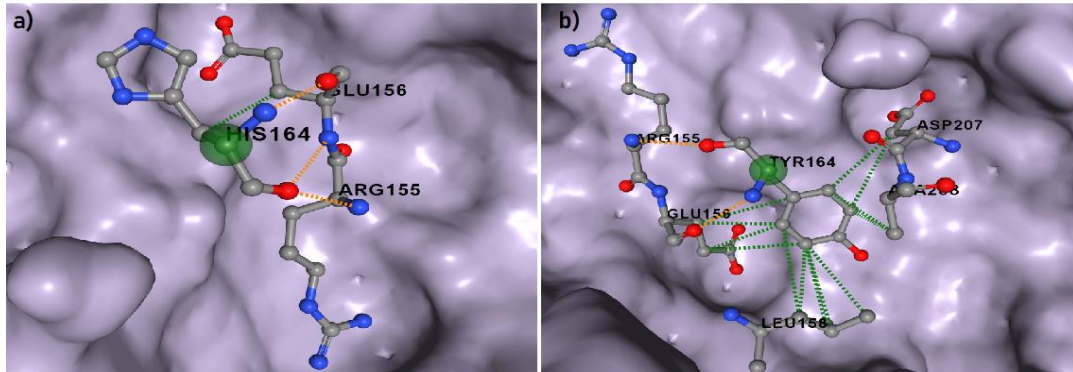
Şekil 4.24. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr127Asn mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 127. pozisyonda Treonin'in 4 polar, 4 hidrofobik, 1 karbonil, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 5 polar etkileşime indirgendi (Şekil 4.25).



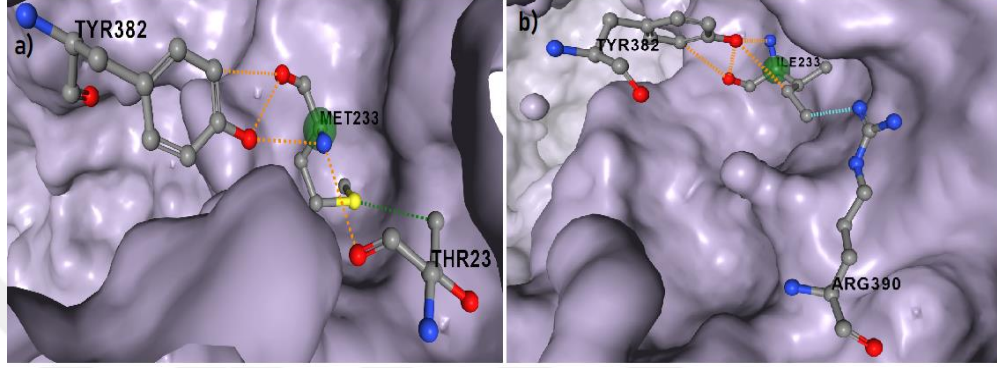
Şekil 4.25. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında His164Tyr mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 164. pozisyonda Histidin'in 3 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 2 polar, 13 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.26).



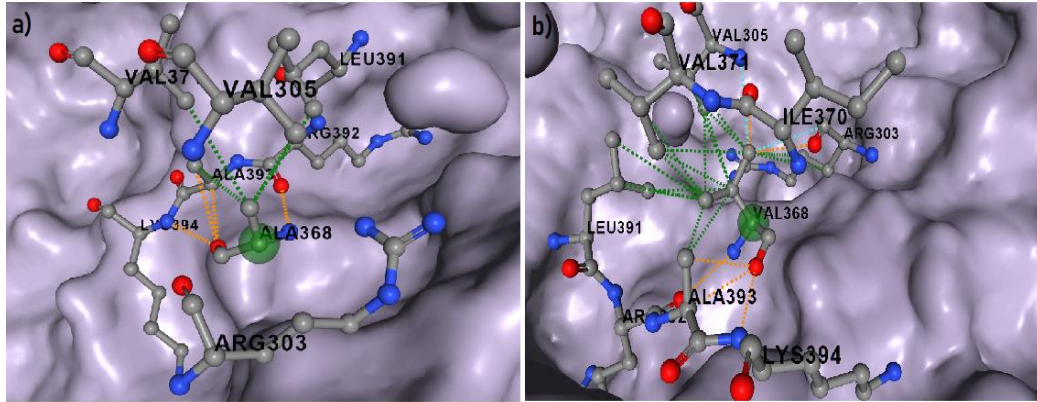
Şekil 4.26. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Met233Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 233. pozisyonda Metiyonin'in 4 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar, 1 Van der Waals etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.27).



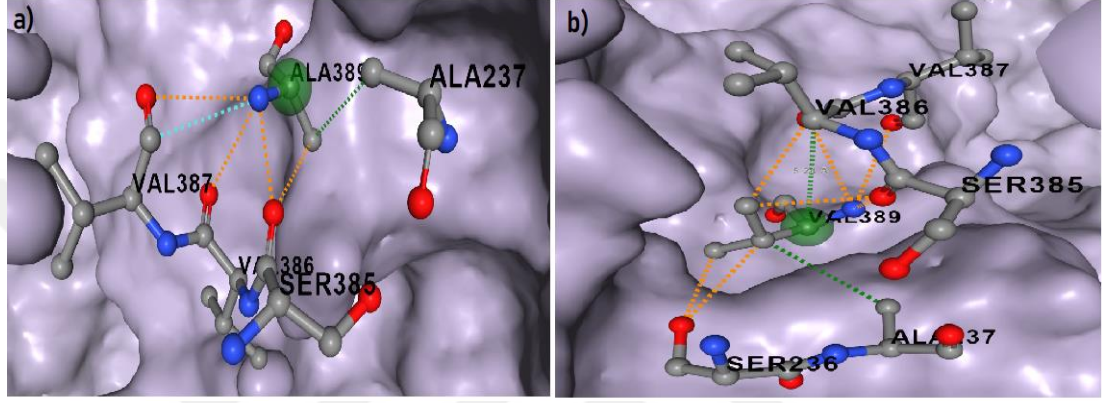
Şekil 4.27. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala368Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 368. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 4 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 6 polar, 16 hidrofobik, 2 Van der Waals etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.28).



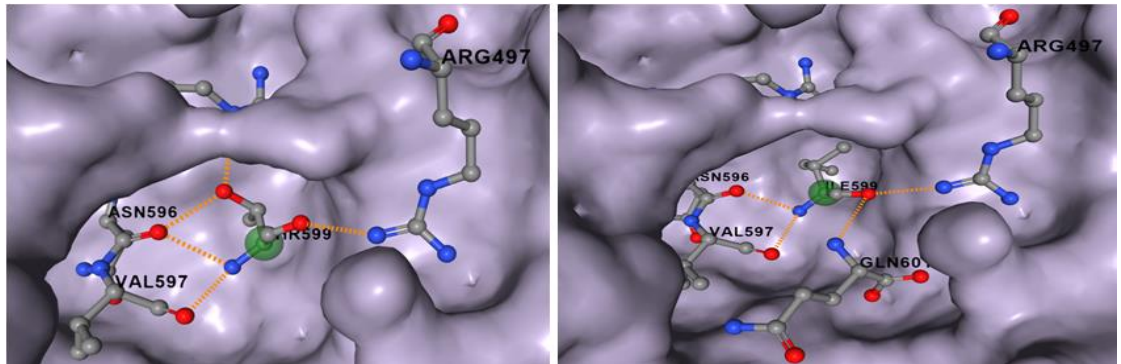
Şekil 4.28. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala389Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 389. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 1 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 7 polar, 2 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

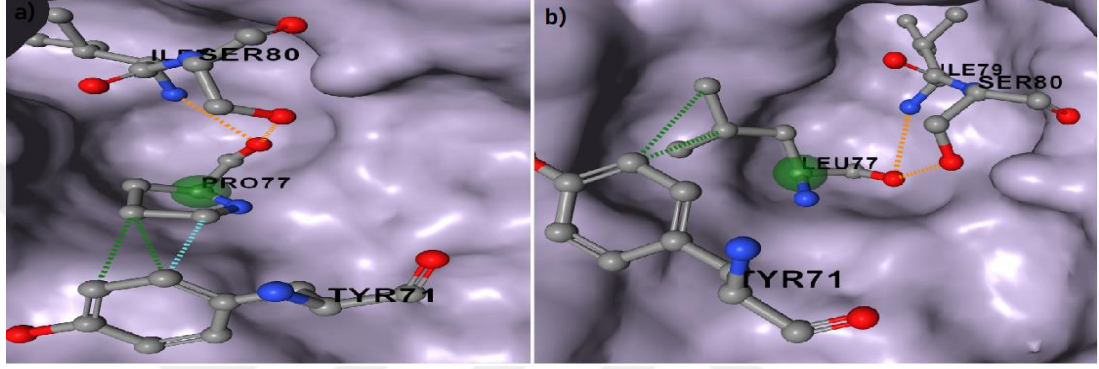
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr599Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 599. pozisyonda Treonin'in 5 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

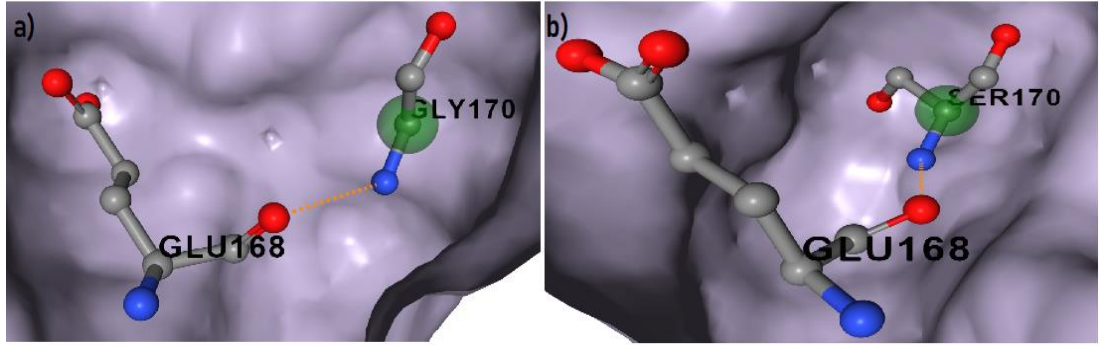
4.2.2.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Pro77Leu mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 77. pozisyonda Prolin'in 2 polar, 2 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 2 polar, 2 hidrofobik etkileşime indirildi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

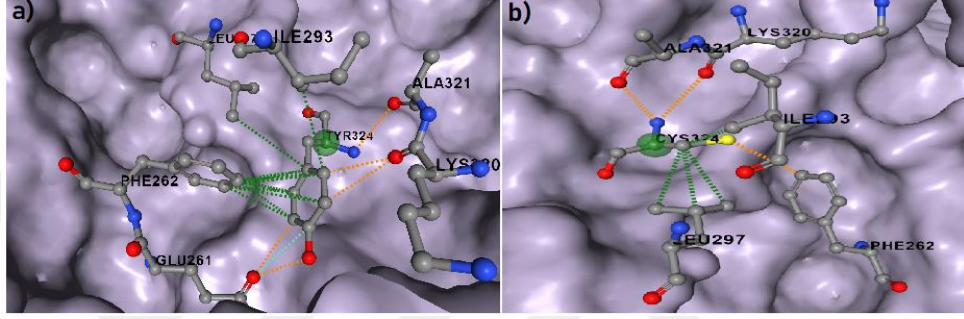
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Gly170Ser mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 170. pozisyonda Glisin'in 1 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası yine 1 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

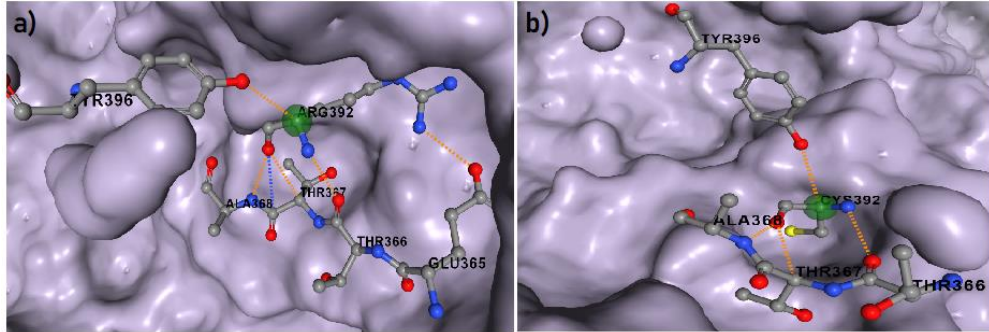
4.2.2.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Tyr324Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 324. pozisyonda Tirozin'in 5 polar, 12 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar, 4 hidrofobik etkileşime indirildi (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Arg392Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 392. pozisyonda Arjinin'in 5 polar, 1 karbonil etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.34).

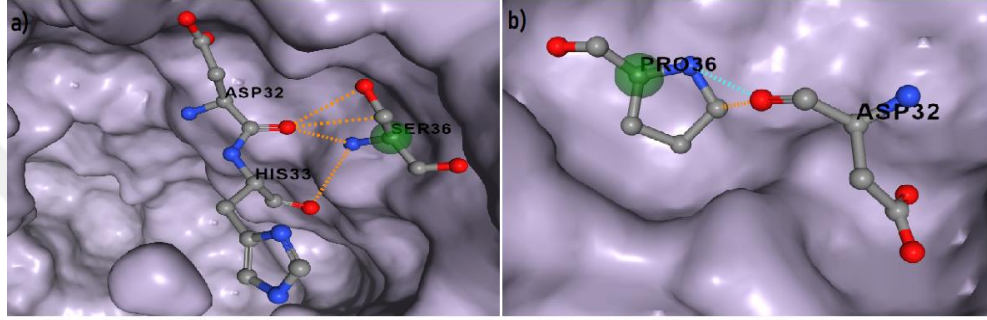


Şekil 4.34. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

4.2.3. SARS-CoV-2 nsp13 Proteinini Model 3'te Görülen Mutasyonlar

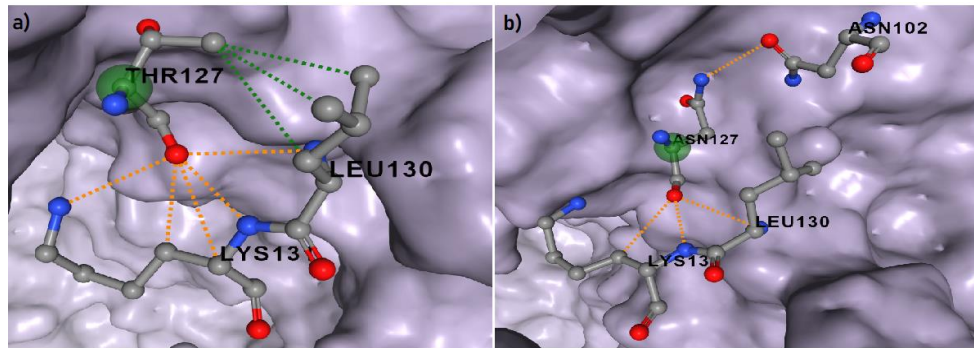
4.2.3.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini Amerika izolatlarında Ser36Pro mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 36. pozisyonda Serin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrasında 1 polar 1 Van der Waals etkileşime indirildi (Şekil 4.35).



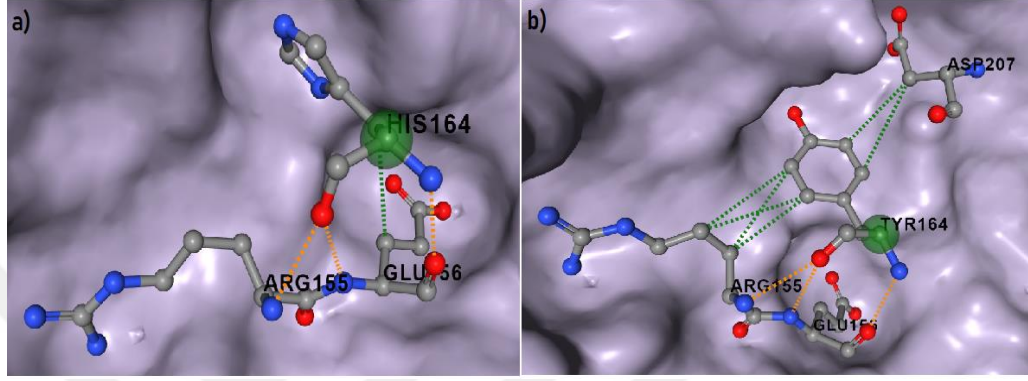
Şekil 4.35. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini Amerika izolatlarında Thr127Asn mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 127. pozisyonda Treonin'in 5 polar, 3 hidrofobik, etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrasında 4 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.36).



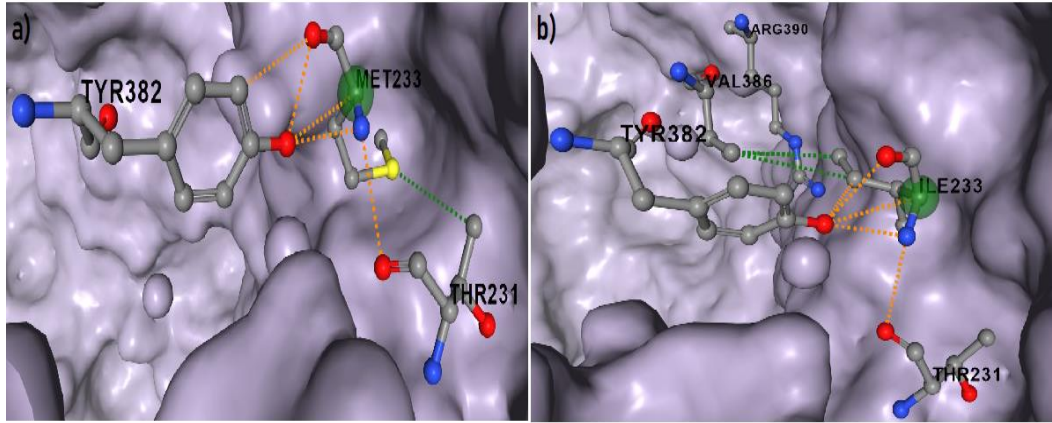
Şekil 4.36. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında His164Tyr mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 164. pozisyonda Histidin'in 3 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar, 6 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.37).



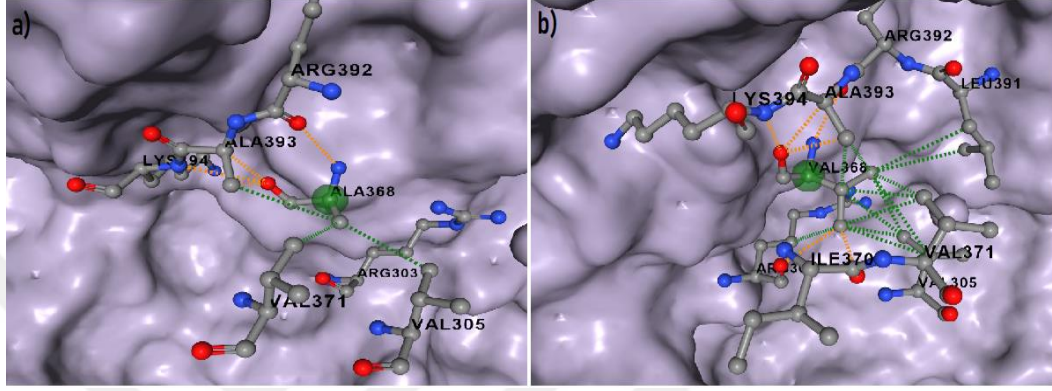
Şekil 4.37. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Met233Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 233. pozisyonda Metiyonin'in 5 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 5 polar, 2 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.38).



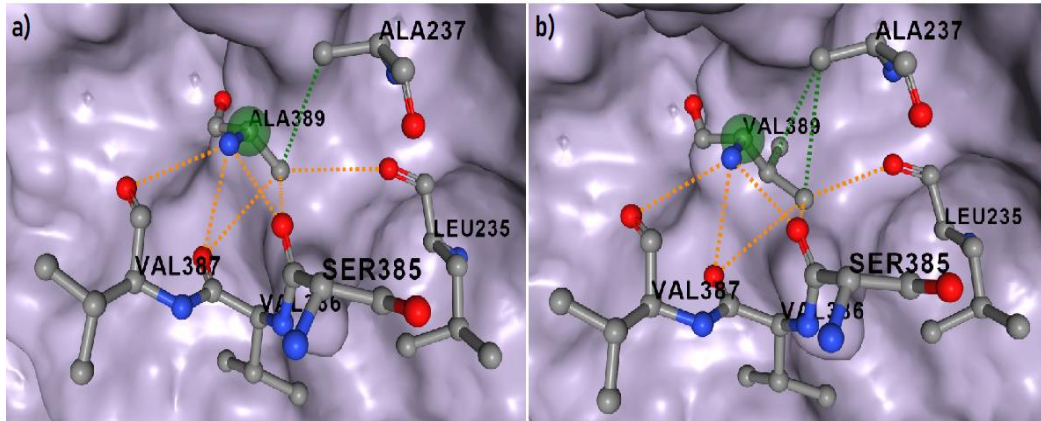
Şekil 4.38. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala368Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 368. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 3 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 5 polar, 12 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.39).



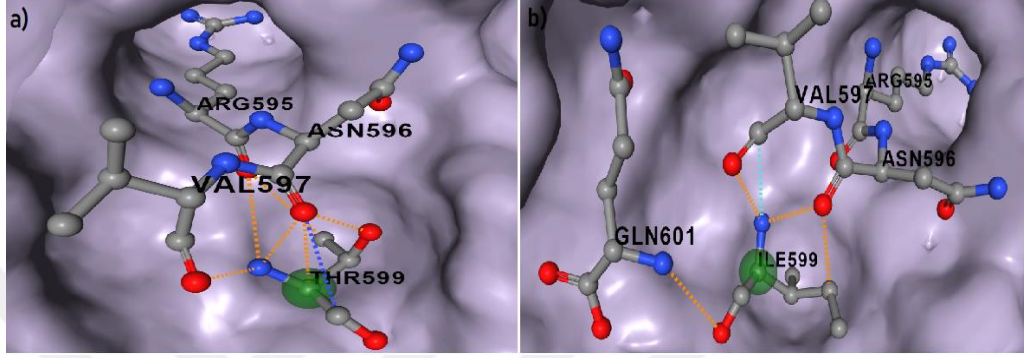
Şekil 4.39. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala389Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 389. pozisyonda Alanin'in 6 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 6 polar, 2 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

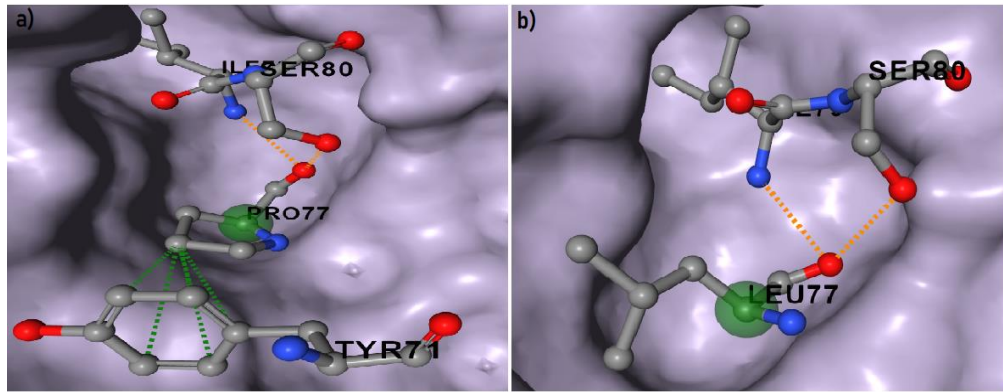
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr599Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 599. pozisyonda Treonin'in 6 polar, 1 karbonil etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar, 1 Van der Waals etkileşime indirildi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

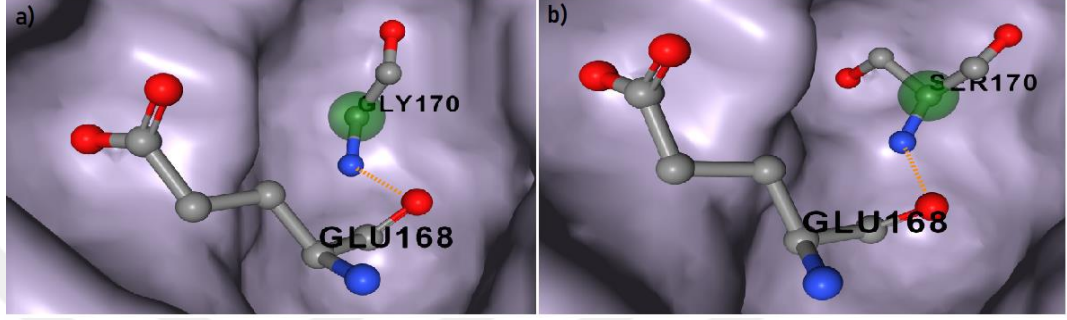
4.2.3.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Pro77Leu mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 77. pozisyonda Prolin'in 2 polar, 5 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 2 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

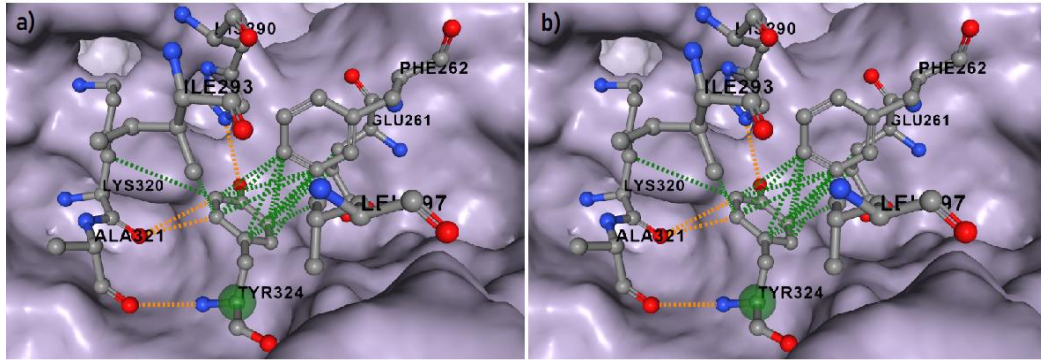
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini Avrupa izolatlarında Gly170Ser mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 170. pozisyonda Glisin'in 1 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası yine 1 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

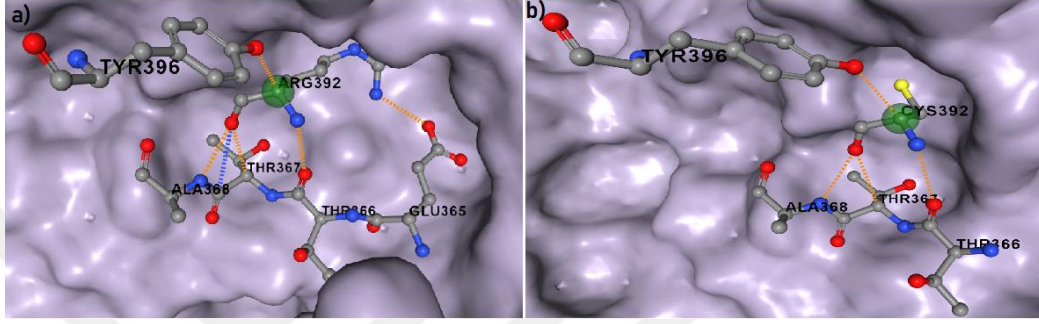
4.2.3.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteinini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Tyr324Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 324. pozisyonda Tirozin'in 4 polar, 15 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar, 5 hidrofobik etkileşime indirgendi (Şekil 4.44).



Şekil 4.44. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Arg392Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 392. pozisyonda Arjinin'in 5 polar, 1 karbonil etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.45).

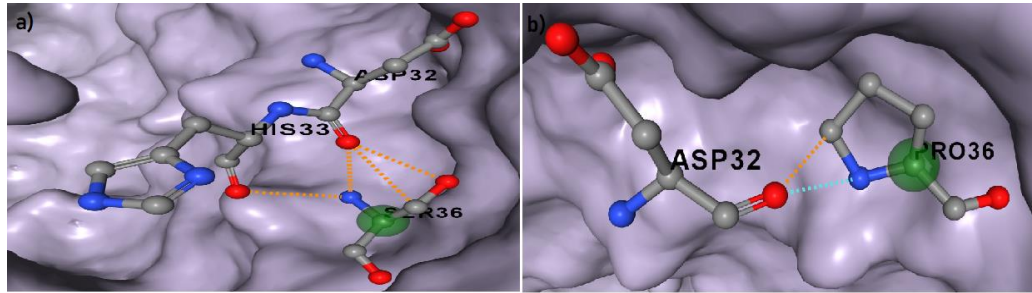


Şekil 4.45. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

4.2.4. SARS-CoV-2 nsp13 Proteini Model 4'te Görülen Mutasyonlar

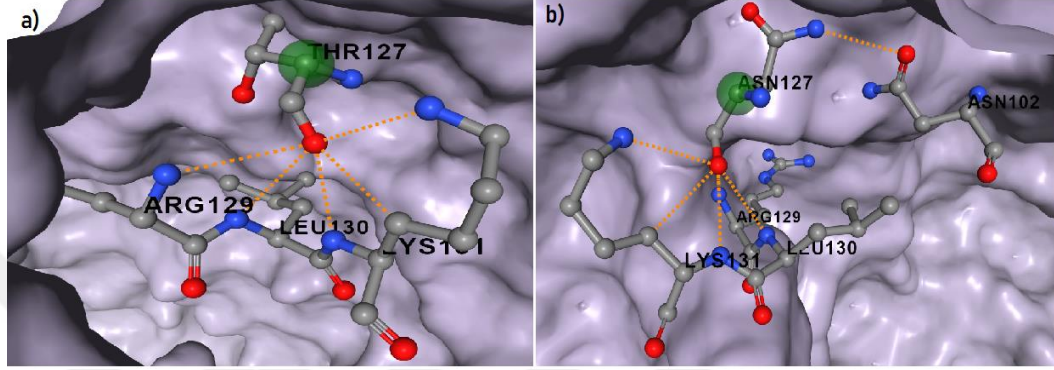
4.2.4.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ser36Pro mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 36. pozisyonda Serin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 1 polar, 1 Van der Waals etkileşime indirildi (Şekil 4.46).



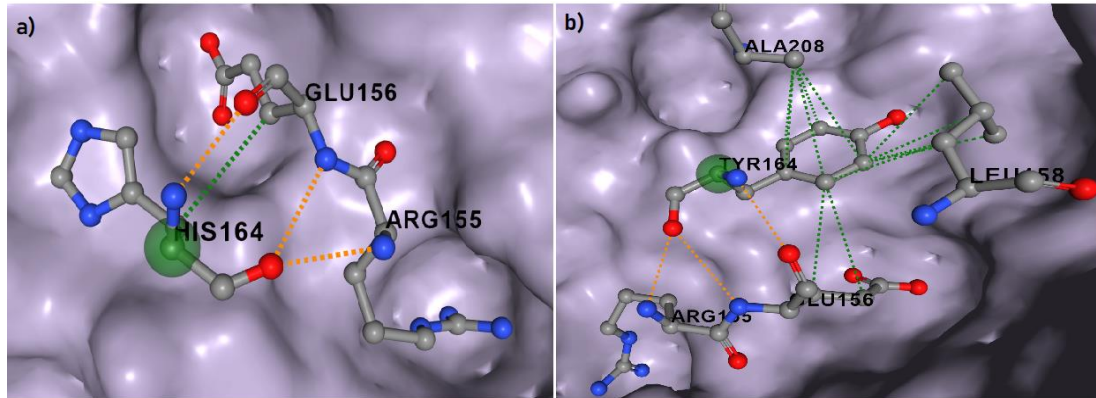
Şekil 4.46. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr127Asn mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 127. pozisyonda Treonin'in 5 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası yine 5 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.47).



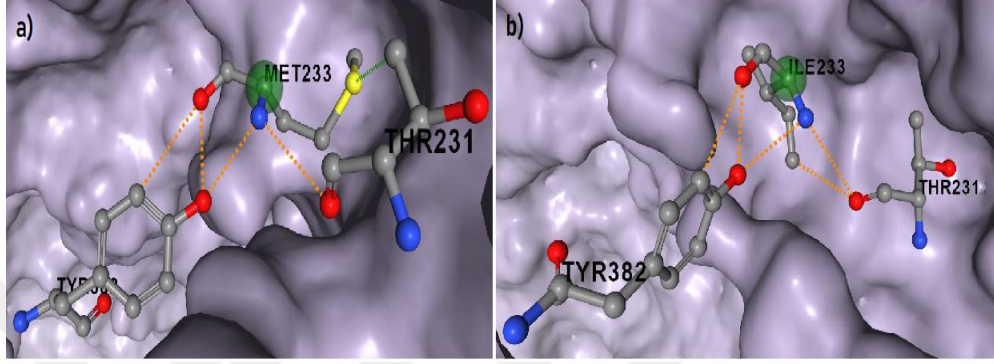
Şekil 4.47. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında His164Tyr mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 164. pozisyonda Histidin'in 3 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar, 12 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.48).



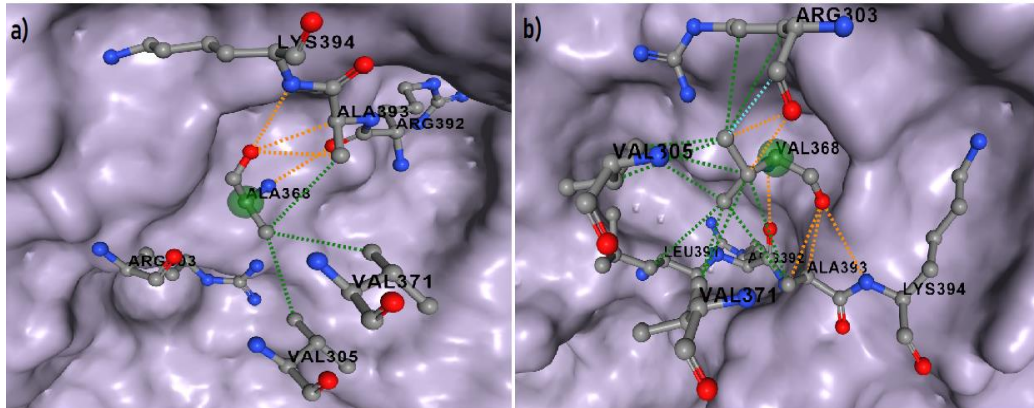
Şekil 4.48. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Met233Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 233. pozisyonda Metiyonin'in 4 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 5 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.49).



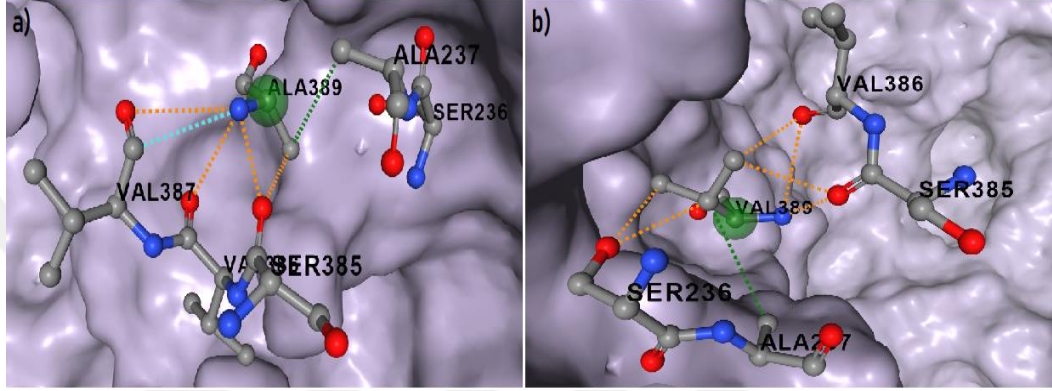
Şekil 4.49. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala368Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 368. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 3 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 6 polar, 11 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.50).



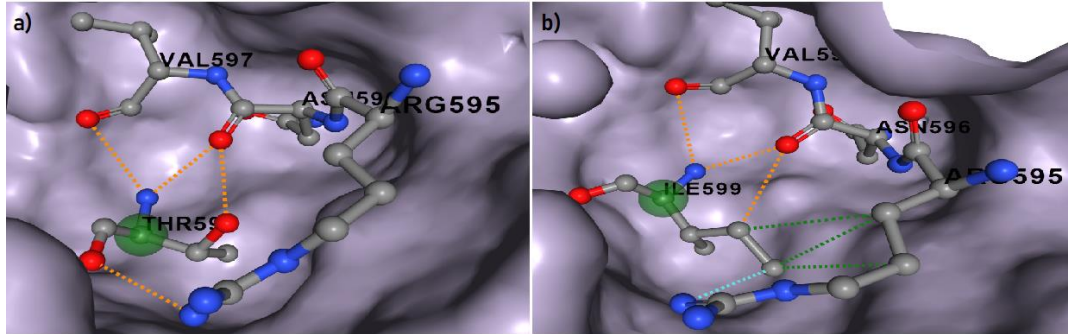
Şekil 4.50. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala389Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 389. pozisyonda Alanin'in 6 polar, 1 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 6 polar, 1 hidrofobik etkileşime indirgendi (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

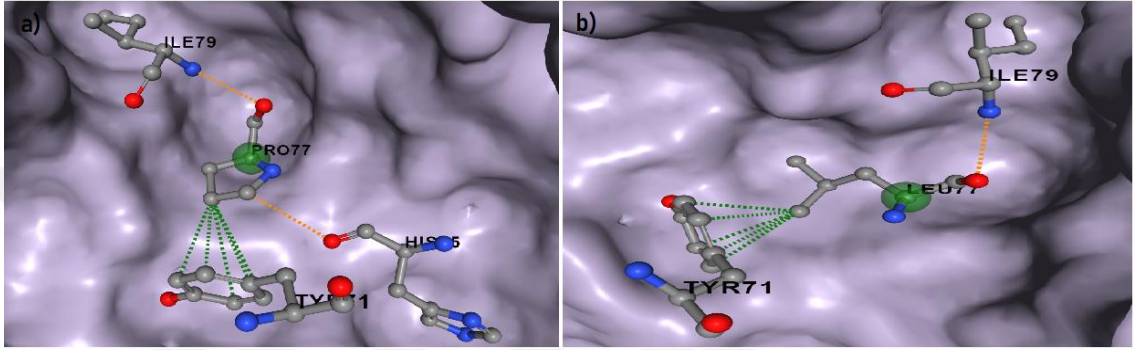
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr599Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 599. pozisyonda Treonin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar, 3 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

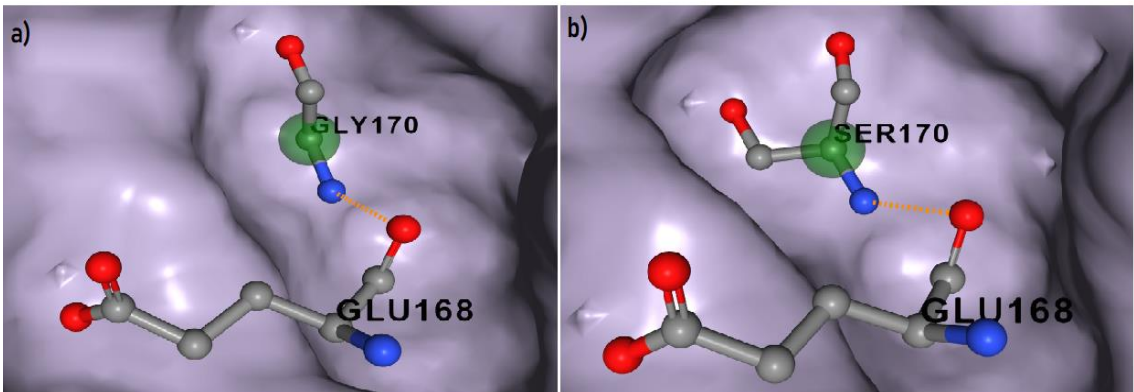
4.2.4.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Pro77Leu mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 77. pozisyonda Prolin'in 2 polar, 5 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 1 polar, 5 hidrofobik etkileşime indirgendi (Şekil 4.53).



Şekil 4.53. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

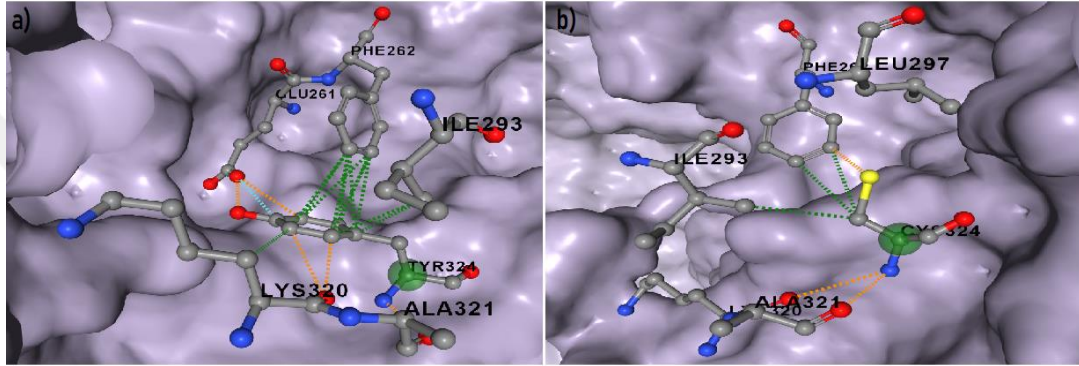
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Gly170Ser mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 170. pozisyonda Glisin'in 1 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası yine 1 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

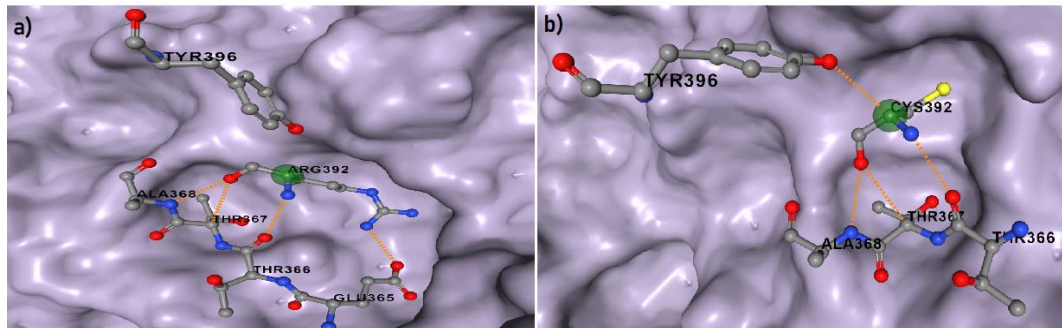
4.2.4.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Tyr324Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 324. pozisyonda Tirozin'in 4 polar, 12 hidrofobik, 1 van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar, 3 hidrofobik etkileşime indirildi (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Arg392Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 392. pozisyonda Arjinin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası yine 4 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.56).

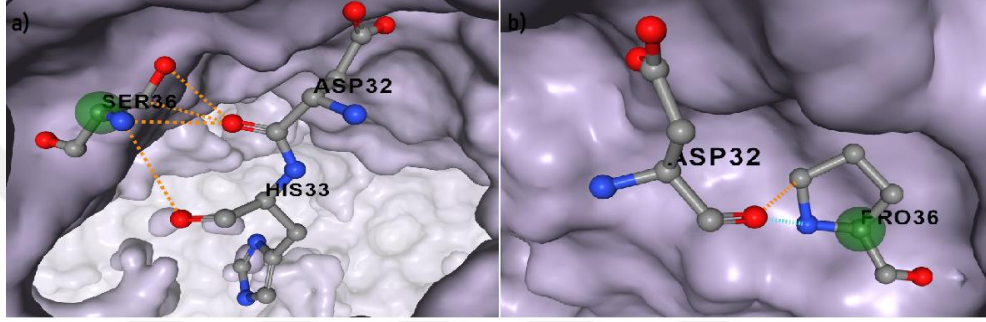


Şekil 4.56. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

4.2.5. SARS-CoV-2 nsp13 Proteinini Model 5'te Görülen Mutasyonlar

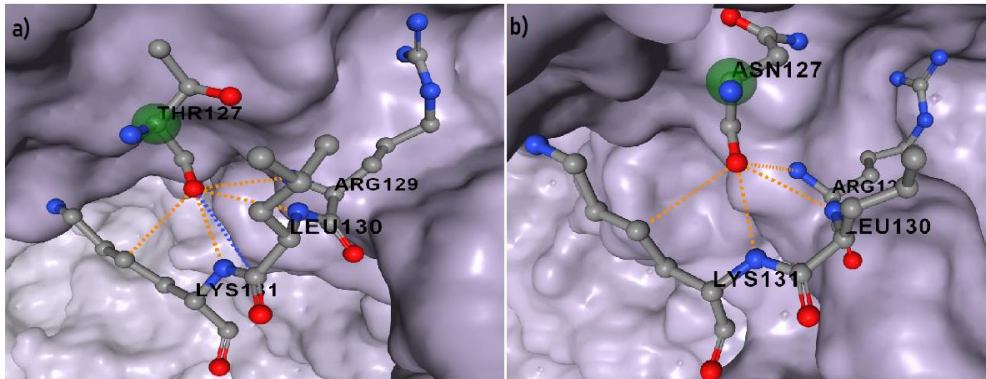
4.2.5.1. Amerika İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ser36Pro mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancı tipte 36. pozisyonda Serin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 1 polar, 1 Van der Waals etkileşime indirildi (Şekil 4.57).



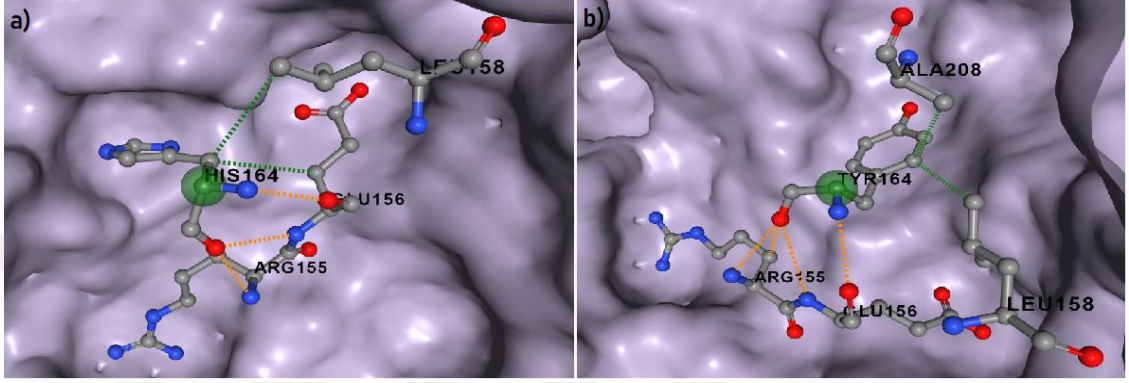
Şekil 4.57. SARS-CoV-2 nsp13 Ser36Pro mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancı tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr127Asn mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancı tipte 127. pozisyonda Treonin'in 4 polar, 1 karbonil etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.58).



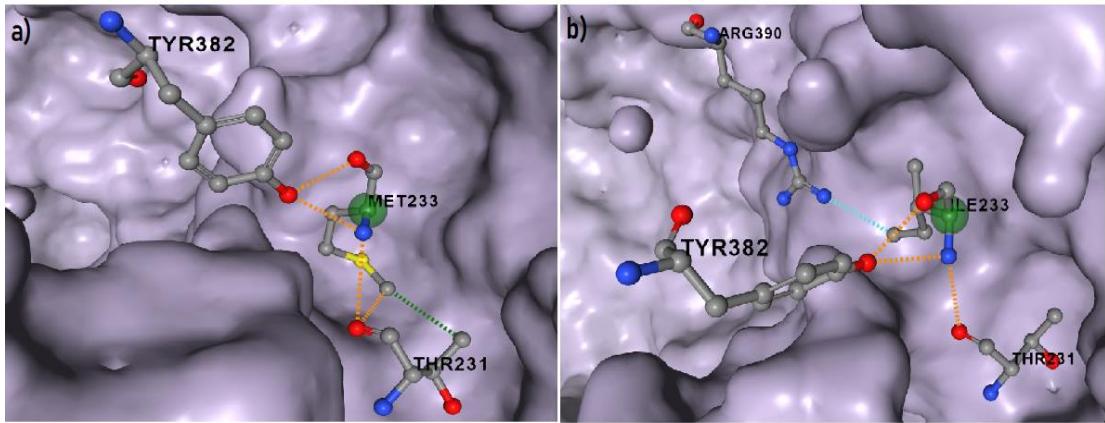
Şekil 4.58. SARS-CoV-2 nsp13 Thr127Asn mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancı tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında His164Tyr mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 164. pozisyonda Histidin'in 3 polar, 2 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 4 polar, 2 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.59).



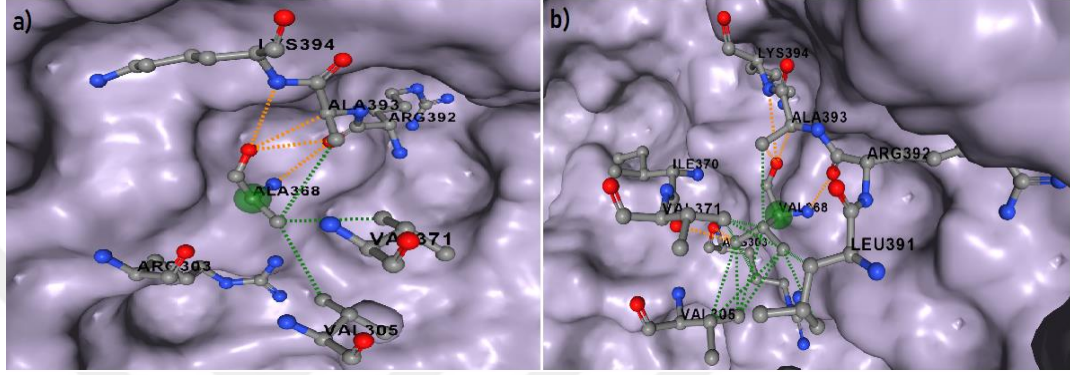
Şekil 4.59. SARS-CoV-2 nsp13 His164Tyr mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Met233Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 233. pozisyonda Metiyonin'in 4 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar, 1 Van der Waals etkileşime indirildi (Şekil 4.60).



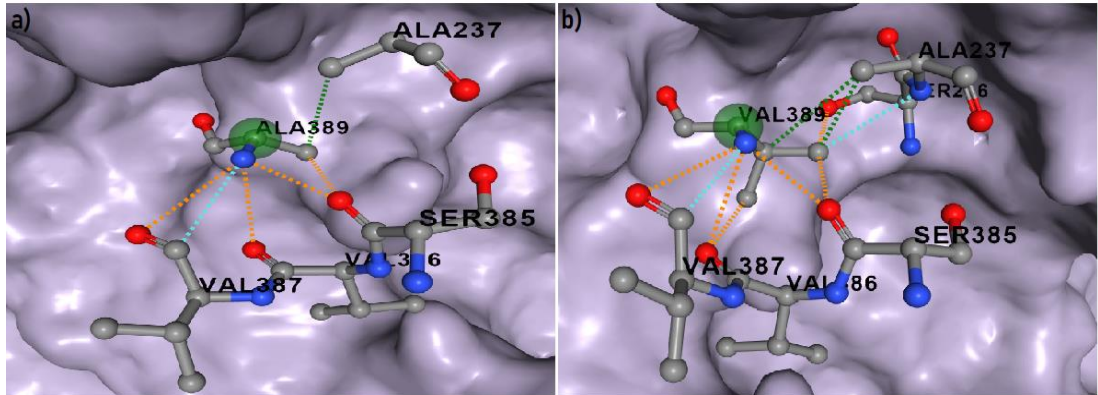
Şekil 4.60. SARS-CoV-2 nsp13 Met233Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala368Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 368. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 3 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 6 polar, 12 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.61).



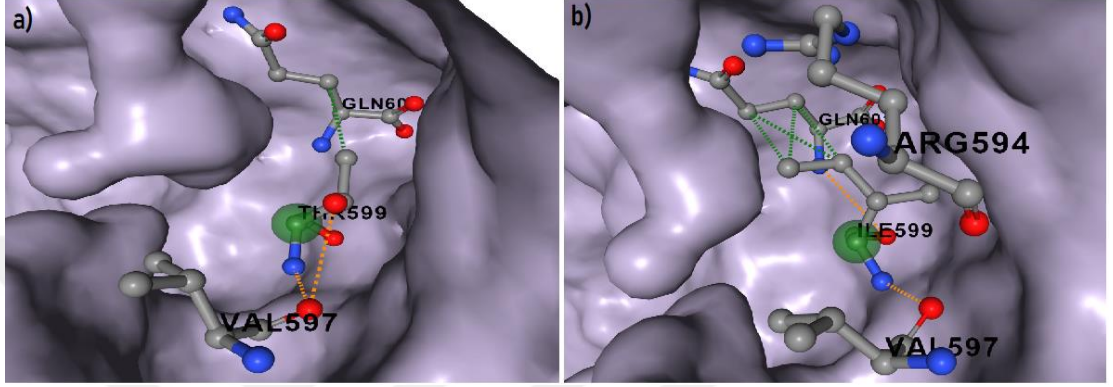
Şekil 4.61. SARS-CoV-2 nsp13 Ala368Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Ala389Val mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 389. pozisyonda Alanin'in 4 polar, 1 hidrofobik, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 6 polar, 2 hidrofobik, 2 Van der Waals etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. SARS-CoV-2 nsp13 Ala389Val mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

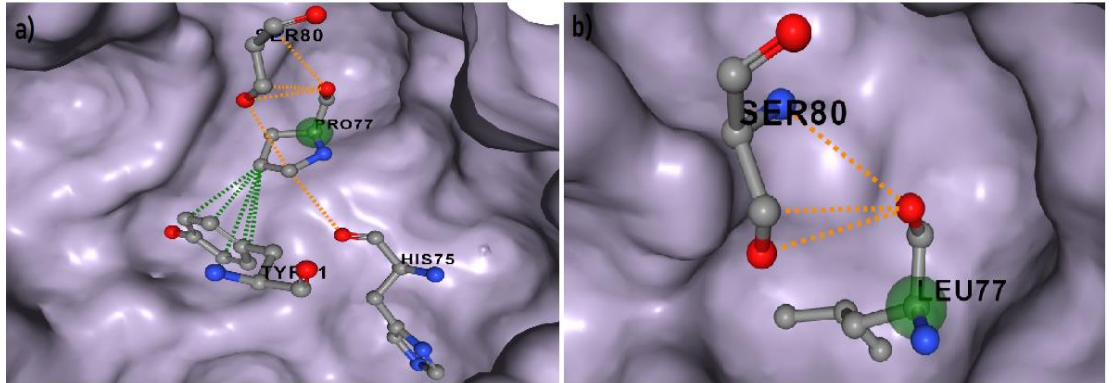
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Amerika izolatlarında Thr599Ile mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 599. pozisyonda Treonin'in 2 polar, 1 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 2 polar, 4 hidrofobik etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.63).



Şekil 4.63. SARS-CoV-2 nsp13 Thr599Ile mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

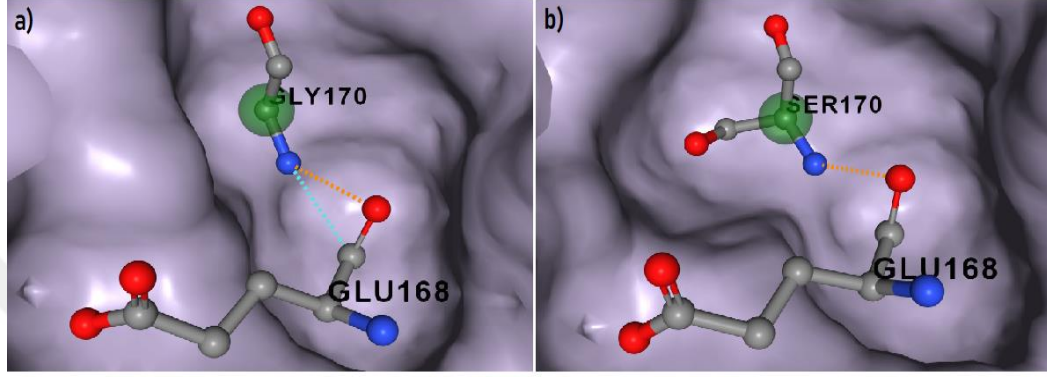
4.2.5.2. Avrupa İzolatlarında Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Pro77Leu mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 77. pozisyonda Prolin'in 5 polar, 5 hidrofobik etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 3 polar etkileşime indirgendi (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. SARS-CoV-2 nsp13 Pro77Leu mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

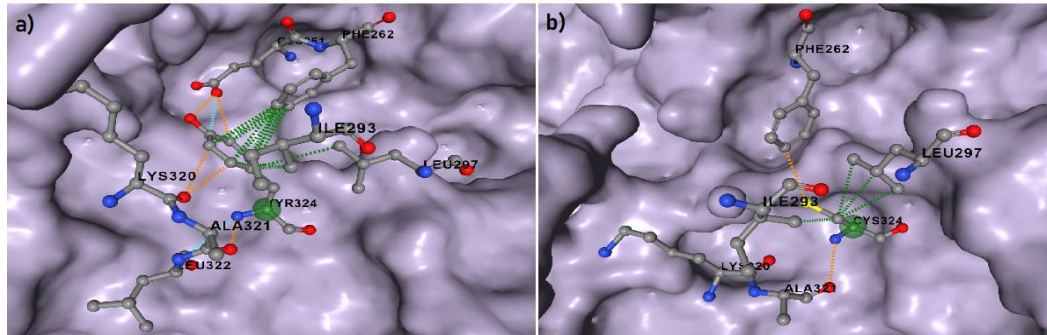
SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini Avrupa izolatlarında Gly170Ser mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 170. pozisyonda Glisin'in 1 polar, 1 Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 1 polar etkileşime indirildi (Şekil 4.65).



Şekil 4.65. SARS-CoV-2 nsp13 Gly170Ser mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

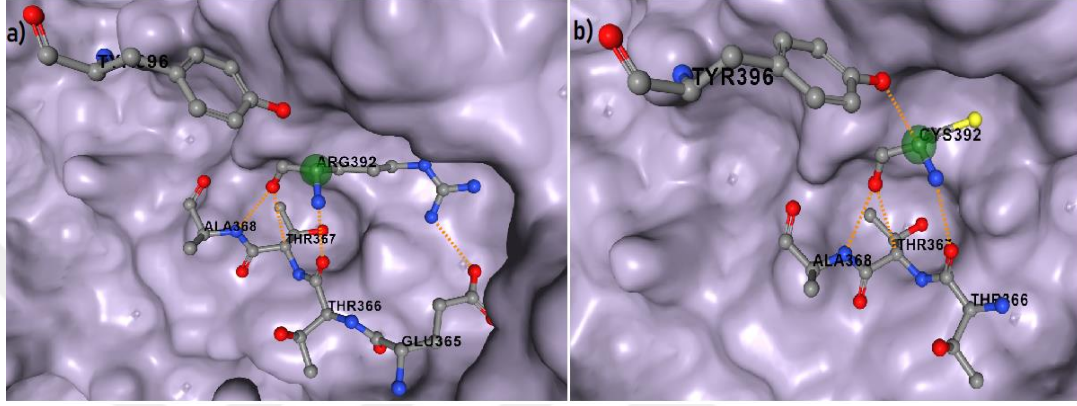
4.2.5.3. Amerika ve Avrupa İzolatlarında Ortak Görülen Mutasyonlar

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Tyr324Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabanıl tipte 324. pozisyonda Tirozin'in 4 polar, 13 hidrofobik, 2 v Van der Waals etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası 2 polar, 4 hidrofobik etkileşime indirildi (Şekil 4.66).



Şekil 4.66. SARS-CoV-2 nsp13 Tyr324Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabanıl tip, b) Mutant

SARS-CoV-2 virüsü nsp13 proteini hem Avrupa hem de Amerika izolatlarında ortak olan Arg392Cys mutasyonu sonrasında tersiyer yapı atomik etkileşiminde değişim gözlemlendi. Yabancıl tipte 392. pozisyonda Arjinin'in 4 polar etkileşim ile sağladığı tersiyer yapı stabilitesi mutasyon sonrası yine 4 polar etkileşim ile sağlandı (Şekil 4.67).



Şekil 4.67. SARS-CoV-2 nsp13 Arg392Cys mutasyonunun rezidü etkileşiminin atomik gösterimi
a) Yabancıl tip, b) Mutant

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bir motor proteini olan helikaz enzimi, rekombinasyon, replikasyon ve onarım gibi biyolojik işlemler sırasında çift sarmallı nükleik asitlerin 5'-3' yönünde çözülmesini katalize eder [127]. SARS-CoV-2 helikazı, insan serin/treonin protein kinazı (TBK1) ile etkileşime girer. Bu etkileşim TBK1 fosforilasyonunu inhibe eder ve interferon düzenleyici faktör-3 fosforilasyonunu %75 oranında azaltır, bu da viral invazyon sürecinin önündeki engellerden biri olan interferon-beta üretiminde azalmaya neden olur [128,129]. Bu çalışma, önemli bir antiviral hedef olan SARS-CoV-2 nsp13'ünün Avrupa ve Amerika izolatlarında görülen mutasyonların protein stabilitesinde değişikliğe neden olduğunu ortaya çıkardı. Proteinlerin fonksiyonel rolleri, moleküllerinin dinamik hareketi ve stabilitesi ile oluşur [75,121,126]. Proteinlerin primer dizilerindeki mutasyonlar üçüncül yapıyı, stabiliteyi ve işlevi değiştirebilir [69,74,130,131]. Mutasyonların özellikle viral salgınlarda bölgesel bazlı değerlendirilmesi, virüsün hücresel invazyon sürecindeki davranışı, salgının ilerlemesi ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından önemlidir [132,133]. SARS-CoV-2, salgının başlangıcından bu yana binlerce mutasyona uğradı ve bunun sonucunda genomunda ve protein yapısında önemli değişiklikler meydana geldi [59,80,134]. Bu değişikliklerin birçoğu anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 reseptörüne artan afinite ve daha hızlı konak geçişi gibi viral özellikler olarak ortaya çıkmıştır [78,135,136]. Konakçı hücrede virüsün artması, artan replikasyon döngüsü ve helikaz aktivitesi ile ilişkilidir. Bunun tersi de mümkündür. Virüste mutasyonların neden olduğu viral proteom yeniden düzenlemeleri virülans etkiyi artırabilir veya azaltabilir [80].

Replikasyon, transkripsiyon ve translasyon işlemlerinin aktivasyonu ve düzenlenmesinde aktif protein molekülleri ile hedef nükleik asit dizisinin etkileşimi, çinko parmaklar gibi özel yapısal motiflerin katkısıyla gerçekleşir [137,138]. Çinko parmak alanı mutasyonları, hedef nükleik asit/protein ve protein/protein etkileşimlerinde değişikliklere neden olur [139–141]. Bulgularımız SARS-CoV-2 nsp13'ünün N-terminalinde yer alan çinko parmak bölgesindeki iki mutasyonun (Ser36Pro ve Pro77Leu), protein stabilitesinde azalmaya ($\Delta\Delta G^{\text{Ser36Pro}}$ -1.35 ile +0.01 kcal.mol⁻¹ aralığında ve $\Delta\Delta G^{\text{Pro77Leu}}$ -0.58 ile +0.003 kcal.mol⁻¹ aralığında) ve konformasyonunda değişikliğe neden olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.4-4.8). Çinko parmak yapısal

motiflerinin fonksiyonel rolleri göz önüne alındığında, protein stabilitesinde görülen bu değişimlerin helikazın fonksiyonel özelliklerinde önemli değişikliklere yol açması muhtemeldir [142,143]. Akbulut, Çin izolatlarında görülen mutasyonları analiz ettiği in-slico çalışmasında N-terminal bölgede yer alan çinko parmak yapısal motifinde görülen mutasyonların protein yapı ve stabilitesinde değişikliğe neden olduğunu ve bu değişimlerin protein-nükleik asit afinitesinde azalma ile sonuçlandığını gösterdi [80].

SARS-CoV-2'nin nsp13'nün 1B domaininde yer alan beta-varil formasyonunda tespit edilen His164Tyr ($0.609 \leq \Delta\Delta G \leq 1.24$ kcal.mol⁻¹) mutasyonu protein stabilitesinde artışa işaret ederken Gly170Ser mutasyonu ($-4.37 \leq \Delta\Delta G \leq -0.16$ kcal.mol⁻¹) protein stabilitesinde kuvvetli azalmaya işaret etmektedir (Çizelge 4.4-4.8). SARS-CoV-2'nin nsp13'ünde iki nükleotid bağlama alanı (1A ve 2A) arasında yer alan ve bir çok katalitik protein yapısında fonksiyonel özellikleri ile öne çıkan beta-varil formasyonunda tespit ettiğimiz bu stabilite değişimlerinin nsp13'ün fonksiyonel özelliklerini etkileyebileceği düşünülmektedir.

SARS-CoV-2'nin nsp13'ünün apo-proteinden holo-proteine çift yönlü dönüşüm hareketinde yer alan nsp13'ün stalk (sap) bölgesinde tespit edilen Thr127Asn ($-0.571 \leq \Delta\Delta G \leq -0.07$ kcal.mol⁻¹) mutasyonu, protein stabilitesinde azalmaya neden oldu (Çizelge 4.4-4.8). Proteinin kinetik özelliklerini etkileyebilecek bu değişim hareketinde ortaya çıkabilecek çok küçük sapmaların dahi substrat bağlama ve protonasyon gibi birçok katalitik özelliği etkileyebileceği bilinmektedir [144–147].

SARS-CoV-2'nin nsp13'ünün 1A domaininde tespit edilen Tyr324Cys, Ala368Val, Ala389Val ve Arg392Cys mutasyonları protein stabilitesinde azalmaya işaret etmektedir (Çizelge 4.4-4.8). SARS-CoV-2'nin nsp13'ünün 1A ve 2A domainleri nükleotid bağlanma bölgelerinde yaygın görülen yapısal motiflerden biri olan Rossman kıvrımı içermektedir. Substrat bağlama özellikleri ile öne çıkan bu yapısal motifin konumlandığı 1A domaininde görülen dört mutasyonun stabilitede ortaya çıkardığı değişimlerin helikazın aktivitesi üzerinde de değişimleri tetikleyebileceği düşünülmektedir. Grimes ve ark. yaptıkları bir çalışmada 1A domaininde yer alan Ala336Val mutasyonunun SARS-CoV-2 helikazının çekirdek replikasyon proteinleri nsp

7, 8 ve 12 ile birleşme yeteneğini koruduğunu, ancak helikaz çözülmesinde ve ATPaz aktivitesinde bozulmaya neden olduğunu ortaya koydu [83].

Sonuç olarak; SARS-CoV-2'nin helikaz proteini üzerine yapılan bu çalışmada Avrupa ve Amerika izolatlarında tespit edilen toplam 11 yanlış anlamlı (missense) mutasyonun 10'u protein stabilitesinde azalmaya işaret ederken 1'i protein stabilitesinde artan kararlılığa işaret etmektedir. Mutasyonlar ve sonucunda oluşan değişimler yalnızca viral proteinlerin fonksiyonel rollerine yönelik bir tehdit değildir, aynı zamanda mevcut terapötiklerin geçerliliği açısından da önemlidir. Hedeflenen terapötik bağlanma bölgelerindeki topolojik ve stabilite değişimleri, geliştirilen terapötiklerin geçerliliği açısından önemlidir. Bu mutasyonlar sonucu açığa çıkan değişimler inhibitörlerin etkinliğini arttırabilir ya da tam tersi azaltabilir. SARS-CoV-2'nin nsp13'ü için Avrupa ve Amerika izolatlarında görülen farklı mutasyonlar viral etkinlik açısından farklı fenotiplerin ortaya çıkışına neden olabilir. Bu nedenle çalışmamız farklı coğrafik bölgelerde farklı tedavi yaklaşımları ile virüse karşı yürütülen mücadele çalışmalarının başarıya ulaşmasına katkı sunacaktır.

6. KAYNAKÇA

- [1] Hulo, C., De Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., Le Mercier, P. (2011). ViralZone: A knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 576–582.
- [2] Chaitanya K. V. (2019). Structure and Organization of Virus Genomes. *Genome Genomics From Archaea to Eukaryotes*.
- [3] Kumar, P., Sah, A.K. (2021). Molecular and Cellular Biochemistry Role of ACE2 receptor and the landscape of treatment options from convalescent plasma therapy to the drug repurposing in COVID-19. *Mol. Cell. Biochem.* **476**, 271–280.
- [4] Tatar, B., Adar, P. (2020). SARS-CoV-2: Mikrobiyoloji and Epidemiology. *J. Tepecik Educ. Res. Hosp.* **30**, 27–35.
- [5] Malik, Y.A. (2020). Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays. J. Pathol.* **42**, 3–11.
- [6] Leao, J.C., Gusmao, T.P. de L., Zarzar, A.M., Leao Filho, J.C., Barkokebas Santos de Faria, A., Morais Silva, I.H., Gueiros, L.A.M., Robinson, N.A., Porter, S., Carvalho, A. de A.T. (2022). Coronaviridae—Old friends, new enemy! *Oral Dis.* **28**, 858–866.
- [7] Chan, J.F.W., Lau, S.K.P., To, K.K.W., Cheng, V.C.C., Woo, P.C.Y., Yue, K.Y. (2015). Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 465–522.
- [8] D, T.G.K.E.C.S.G.R.Z.P.E.T.U.A.C.W.L.E.R.F.D.-E.L.D.H.-J.S.G. (2003). A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**,.
- [9] Cui, J., Li, F., Shi, Z.L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 181–192.
- [10] Tyrrell, D.A.J., Bynoe, M.L. (1965). Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures. *Br. Med. J.* **1**, 1467–1470.
- [11] Memikoğlu, K.O., Genç, V., eds. (2020) *Covid-19*, Ankara Üniversitesi Basımevi.
- [12] Esper, F., Weibel, C., Ferguson, D., Landry, M.L., Kahn, J.S. (2006). Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 775–779.
- [13] Kolifarhood, G., Aghaali, M., Saadati, H.M., Taherpour, N., Rahimi, S., Izadi, N., Nazari, S.S.H. (2020). Epidemiological and Clinical Aspects of COVID-19; a Narrative Review. *Arch. Acad. Emerg. Med.* **8**, e41.
- [14] Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820.
- [15] Gudi, S.K., Tiwari, K.K. (2020). Preparedness and lessons learned from the novel coronavirus disease. *Int. J. Occup. Environ. Med.* **11**, 108–112.

- [16] Singhal, T. (2020). A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* **87**, 281–286.
- [17] Zhou, P., Yang, X. Lou., Wang, X.G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.L., Chen, H.D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di., Liu, M.Q., Chen, Y., Shen, X.R., Wang, X., Zheng, X.S., Zhao, K., Chen, Q.J., Deng, F., Liu, L.L., Yan, B., Zhan, F.X., Wang, Y.Y., Xiao, G.F., Shi, Z.L. (2020). Erratum: Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin (Nature (1988) 81 11 (18-19)). *Nature*. **588**, E6.
- [18] Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733.
- [19] Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.M., Wang, W., Song, Z.G., Hu, Y., Tao, Z.W., Tian, J.H., Pei, Y.Y., Yuan, M.L., Zhang, Y.L., Dai, F.H., Liu, Y., Wang, Q.M., Zheng, J.J., Xu, L., Holmes, E.C., Zhang, Y.Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. **579**, 265–269.
- [20] Zito Marino, F., De Cristofaro, T., Varriale, M., Zannini, G., Ronchi, A., La Mantia, E., Campobasso, C. Pietro., De Micco, F., Mascolo, P., Municinò, M., Municinò, E., Vestini, F., Pinto, O., Moccia, M., De Stefano, N., Nappi, O., Sementa, C., Zotti, G., Pianese, L., Giordano, C., Franco, R. (2022). Variable levels of spike and ORF1ab RNA in post-mortem lung samples of SARS-CoV-2-positive subjects: comparison between ISH and RT-PCR. *Virchows Arch.* **480**, 597–607.
- [21] Rahimi, A., Mirzazadeh, A., Tavakolpour, S. (2021). Genomics Genetics and genomics of SARS-CoV-2 : A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*. **113**, 1221–1232.
- [22] Yazdani, S. (2021). Computational Analysis of Druggability and Genetic Variability of SARS-CoV-2 Pocketome.
- [23] Indwiani Astuti;Ysrafil. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. 407–412.
- [24] Glycoprotein, C.-S., Walls, A.C., Park, Y., Tortorici, M.A., Wall, A., Mcguire, A.T., Veessler, D., Walls, A.C., Park, Y., Tortorici, M.A., Wall, A., Mcguire, A.T. (2020). Structure , Function , and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. **181**, 281-292.e6.
- [25] COVID-19 (SARS-CoV-2) Spike S-1 Rekombinant Proteini, Last updated 2022, Accessed on 2022.
- [26] Schoeman, D., Fielding, B.C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* **16**, 2–22.
- [27] Finkel, Y., Mizrahi, O., Nachshon, A., Weingarten-Gabbay, S., Morgenstern, D., Yahalom-Ronen, Y., Tamir, H., Achdout, H., Stein, D., Israeli, O., Beth-Din, A., Melamed, S., Weiss, S., Israely, T., Paran, N., Schwartz, M., Stern-Ginossar, N. (2021). The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature*. **589**, 125–130.

- [28] Gorla, U.S., Rao, G.S.N.K. (2020). Sars-cov-2: The prominent role of non-structural proteins (nsps) in COVID-19. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **54**, S381–S389.
- [29] Simeoni, M., Cavinato, T., Rodriguez, D., Gatfield, D. (2021). I(nsp1)ecting SARS-CoV-2–ribosome interactions. *Commun. Biol.* **4**, 1–5.
- [30] Yoshimoto, F.K. (2020). The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J.* **39**, 198–216.
- [31] Sakai, Y., Kawachi, K., Terada, Y., Omori, H., Matsuura, Y., Kamitani, W. (2017). Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication. *Virology.* **510**, 165–174.
- [32] Lei, J., Kusov, Y., Hilgenfeld, R. (2018). Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res.* **149**, 58–74.
- [33] Mariano, G., Farthing, R.J., Lale-Farjat, S.L.M., Bergeron, J.R.C. (2020). Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Front. Mol. Biosci.* **7**,.
- [34] Tomar, S., Johnston, M.L., John, S.E.S., Osswald, H.L., Nyalapatla, P.R., Paul, L.N., Ghosh, A.K., Denison, M.R., Mesecar, A.D. (2015). Ligand-induced dimerization of Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus nsp5 protease (3CLpro): Implications for nsp5 regulation and the development of antivirals. *J. Biol. Chem.* **290**, 19403–19422.
- [35] Mitsuda, T., Omi, T., Tanimukai, H., Sakagami, Y., Tagami, S., Okochi, M., Kudo, T., Takeda, M. (2011). Biochemical and Biophysical Research Communications Sigma-1Rs are upregulated via PERK / eIF2 α / ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 519–525.
- [36] Angelini, M.M., Akhlaghpour, M., Neuman, B.W., Buchmeier, M.J. (2013). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *MBio.* **4**, 1–10.
- [37] Te Velthuis, A.J.W., Van Den Worm, S.H.E., Snijder, E.J. (2012). The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1737–1747.
- [38] Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., Yang, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Xu, W., Guddat, L.W., Wang, Q., Lou, Z., Rao, Z. (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science (80-.).* **368**, 779–782.
- [39] Miknis, Z.J., Donaldson, E.F., Umland, T.C., Rimmer, R.A., Baric, R.S., Schultz, L.W. (2009). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus nsp9 Dimerization Is Essential for Efficient Viral Growth. *J. Virol.* **83**, 3007–3018.
- [40] Ong, E., Wong, M.U., Huffman, A., He, Y. (2020). COVID-19 Coronavirus Vaccine Design Using Reverse Vaccinology and Machine Learning. *Front.*

Immunol. **11**, 1581.

- [41] Fang, S.G., Shen, H., Wang, J., Tay, F.P.L., Liu, D.X. (2008). Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology*. **379**, 175–180.
- [42] Kirchdoerfer, R.N., Ward, A.B. (2019). Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat. Commun.* **10**, 1–9.
- [43] Subissi, L., Posthuma, C.C., Collet, A., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Gorbalenya, A.E., Decroly, E., Snijder, E.J., Canard, B., Imbert, I. (2014). One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E3900–E3909.
- [44] Case, J.B., Ashbrook, A.W., Dermody, T.S., Denison, M.R. (2016). Mutagenesis of S⁻-Adenosyl- l⁻-Methionine-Binding Residues in Coronavirus nsp14 N7-Methyltransferase Demonstrates Differing Requirements for Genome Translation and Resistance to Innate Immunity . *J. Virol.* **90**, 7248–7256.
- [45] Xu, L., Khadijah, S., Fang, S., Wang, L., Tay, F.P.L., Liu, D.X. (2010). The Cellular RNA Helicase DDX1 Interacts with Coronavirus Nonstructural Protein 14 and Enhances Viral Replication. *J. Virol.* **84**, 8571–8583.
- [46] Frazier, M.N., Dillard, L.B., Krahn, J.M., Perera, L., Williams, J.G., Wilson, I.M., Stewart, Z.D., Pillon, M.C., Deterding, L.J., Borgnia, M.J., Stanley, R.E. (2021). Characterization of SARS2 Nsp15 nuclease activity reveals it's mad about U. *Nucleic Acids Res.* **49**, 10136–10149.
- [47] Bhardwaj, K., Guarino, L., Kao, C.C. (2004). The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nsp15 Protein Is an Endoribonuclease That Prefers Manganese as a Cofactor. *J. Virol.* **78**, 12218–12224.
- [48] Zhang, L., Li, L., Yan, L., Ming, Z., Jia, Z., Lou, Z., Rao, Z. (2018). Structural and Biochemical Characterization of Endoribonuclease Nsp15 Encoded by Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* **92**, 1–16.
- [49] Vithani, N., Ward, M.D., Zimmerman, M.I., Novak, B., Borowsky, J.H., Singh, S., Bowman, G.R. (2021). SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. *Biophys. J.* **120**, 2880–2889.
- [50] Baday, S. (2021). Drug repurposing against sars-cov-2: Targeting nsp16-nsp10 interaction. *J. Turkish Chem. Soc. Sect. A Chem.* **8**, 933–940.
- [51] Tanner, J.A., Watt, R.M., Chai, Y.B., Lu, L.Y., Lin, M.C., Peiris, J.S.M., Poon, L.L.M., Kung, H.F., Huang, J.D. (2003). The severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/helicase belongs to a distinct class of 5' to 3' viral helicases. *J. Biol. Chem.* **278**, 39578–39582.
- [52] Habtemariam, S., Nabavi, F., Banach, M., Berindan-neagoe, I. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The

COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information .

- [53] Shu, T., Huang, M., Wu, D., Ren, Y., Zhang, X., Han, Y., Mu, J., Wang, R., Qiu, Y., Zhang, D.Y., Zhou, X. (2020). SARS-Coronavirus-2 Nsp13 Possesses NTPase and RNA Helicase Activities That Can Be Inhibited by Bismuth Salts. *Viol. Sin.* **35**, 321–329.
- [54] Jang, K.J., Jeong, S., Kang, D.Y., Sp, N., Yang, Y.M., Kim, D.E. (2020). A high ATP concentration enhances the cooperative translocation of the SARS coronavirus helicase nsP13 in the unwinding of duplex RNA. *Sci. Rep.* **10**, 1–13.
- [55] Newman, J.A., Douangamath, A., Yadzani, S., Yosaatmadja, Y., Aimon, A., Brandão-Neto, J., Dunnett, L., Gorrie-stone, T., Skyner, R., Fearon, D., Schapira, M., von Delft, F., Gileadi, O. (2021). Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase. *Nat. Commun.* **12**, 1–11.
- [56] Ivanov, K.A., Thiel, V., Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Snijder, E.J., Ziebuhr, J. (2004). Multiple Enzymatic Activities Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Helicase. *J. Virol.* **78**, 5619–5632.
- [57] Deng, Z., Lehmann, K.C., Li, X., Feng, C., Wang, G., Zhang, Q., Qi, X., Yu, L., Zhang, X., Feng, W., Wu, W., Gong, P., Tao, Y., Posthuma, C.C., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Chen, Z. (2014). Structural basis for the regulatory function of a complex zinc-binding domain in a replicative arterivirus helicase resembling a nonsense-mediated mRNA decay helicase. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3464–3477.
- [58] Jia, Z., Yan, L., Ren, Z., Wu, L., Wang, J., Guo, J., Zheng, L., Ming, Z., Zhang, L., Lou, Z., Rao, Z. (2019). Delicate structural coordination of the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis. **47**, 6538–6550.
- [59] Akbulut, E. (2021). Mutations in the SARS CoV-2 spike protein may cause functional changes in the protein quaternary structure. *Turkish J. Biochem.* **46**, 137–144.
- [60] Akbulut, E. (2020). SARS CoV-2'nin Karşılaştırmalı Genomik ve Proteomik Analizi – İlaç Hedefleme ve Potansiyel Mutasyon Olasılıkları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.* **13**, 1187–1197.
- [61] Ramanathan, K., Antognini, D., Combes, A., Paden, M., Zakhary, B., Ogino, M., Maclaren, G., Brodie, D. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person to person transmission: a study of a family cluster. *Lancet.* **395**, 514–523.
- [62] Dünya’da Covid-19 salgını verileri, Last updated 2023, Accessed on 2023.
- [63] Abubucker, S., Martin, J., Taylor, C.M., Mitreva, M. (2011). HelmCoP: An online resource for Helminth functional genomics and drug and vaccine targets prioritization. *PLoS One.* **6**, 1–12.
- [64] Badani, H., Garry, R.F., Wimley, W.C. (2014). Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: The importance of interfacial hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 2180–2197.

- [65] Liu, C., Zhou, Q., Li, Y., Garner, L. V., Watkins, S.P., Carter, L.J., Smoot, J., Gregg, A.C., Daniels, A.D., Jervy, S., Albaiu, D. (2020). Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Cent. Sci.* **6**, 315–331.
- [66] Mahajan, M., Chatterjee, D., Bhuvaneswari, K., Pillay, S. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information .
- [67] Shen, S., Wen, Z.L., Liu, D.X. (2003). Emergence of a coronavirus infectious bronchitis virus mutant with a truncated 3b gene: Functional characterization of the 3b protein in pathogenesis and replication. *Virology*. **311**, 16–27.
- [68] Regla-Nava, J.A., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeño, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castaño-Rodríguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., DeDiego, M.L. (2015). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses with Mutations in the E Protein Are Attenuated and Promising Vaccine Candidates. *J. Virol.* **89**, 3870–3887.
- [69] Akbulut, E. (2022). Investigation of changes in protein stability and substrate affinity of 3CL - protease of SARS-CoV-2 caused by mutations. **20210404**,.
- [70] Gezdirici, A., Kalaycık Şengül, Ö., Doğan, M., Y. Özgüven, B., Akbulut, E. (2023). Biallelic Novel USP53 Splicing Variant Disrupting the Gene Function that Causes Cholestasis Phenotype and Review of the Literature. *Mol. Syndr.* 471–484.
- [71] Kalathiya, U., Padariya, M., Baginski, M. (2019). Structural, functional, and stability change predictions in human telomerase upon specific point mutations. *Sci. Rep.* **9**, 1–13.
- [72] Manolaridis, I., Jackson, S.M., Taylor, N.M.I., Kowal, J., Stahlberg, H., Locher, K.P. (2018). Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature*. **563**, 426–430.
- [73] Akbulut, E. (2021). Changes in Interaction Between Accessory Protein 8 and IL-17RA in UK Isolates Caused by Mutations in the SARS-CoV-2 Open Reading Frame 8. *Int. J. Comput. Exp. Sci. Eng.* **7**, 76–83.
- [74] Akbulut, E., Kar, B. (2020). SARS CoV-2 nsp1 Mutasyonlarının Protein Yapıda Ortaya Çıkardığı Değişimler. *Int. J. Pure Appl. Sci.* **6**, 68–76.
- [75] Akbulut, E. (2021). SARS CoV-2 SPIKE GLYCOPROTEIN MUTATIONS AND CHANGES IN PROTEIN STRUCTURE. *Trak. Univ. J. Nat. Sci.* **22**, 23–33.
- [76] Callaway, E. (2020). The coronavirus is mutating - does it matter? *Nature*. **585**, 174–177.
- [77] Yang, H., Yang, M., Ding, Y., Liu, Y., Lou, Z., Zhou, Z., Sun, L., Mo, L., Ye, S., Pang, H., Gao, G.F., Anand, K., Bartlam, M., Hilgenfeld, R., Rao, Z. (2003). The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13190–13195.

- [78] Seyran, M., Takayama, K., Uversky, V.N., Lundstrom, K., Palù, G., Sherchan, S.P., Attrish, D., Rezaei, N., Aljabali, A.A.A., Ghosh, S., Pizzol, D., Chauhan, G., Adadi, P., Mohamed Abd El-Aziz, T., Soares, A.G., Kandimalla, R., Tambuwala, M., Hassan, S.S., Azad, G.K., Pal Choudhury, P., Baetas-da-Cruz, W., Serrano-Aroca, Á., Brufsky, A.M., Uhal, B.D. (2021). The structural basis of accelerated host cell entry by SARS-CoV-2†. *FEBS J.* **288**, 5010–5020.
- [79] Bakhshandeh, B., Jahanafrooz, Z., Abbasi, A., Goli, M.B., Sadeghi, M., Mottaqi, M.S., Zamani, M. (2021). Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus. *Microb. Pathog.* **154**, 104831.
- [80] Akbulut, E. (2022). The Effects of SARS CoV-2 nsp13 Mutations on the Structure and Stability of Helicase in Chinese Isolates. *Eur. J. Biol.* **81**, 11–17.
- [81] Begum, F., Mukherjee, D., Das, S., Thagriki, D., Tripathi, P.P., Banerjee, A.K., Ray, U. (2020). Specific mutations in SARS-CoV2 RNA dependent RNA polymerase and helicase alter protein structure, dynamics and thus function: Effect on viral RNA replication. *bioRxiv*. 2020.04.26.063024.
- [82] Begum, F., Banerjee, A.K., Tripathi, P.P., Ray, U. (2020). Two mutations P/L and Y/C in SARS-CoV-2 helicase domain exist together and influence helicase RNA binding. *bioRxiv*. 2020.05.14.095224.
- [83] Grimes, S.L., Choi, Y.J., Banerjee, A., Small, G., Anderson-daniels, J., Gribble, J., Andrea, J., Agostini, M.L., Abu-shmais, A., Lu, X., Darst, S.A., Campbell, E., Denison, M.R. A Mutation in the Coronavirus nsp13-helicase Impairs Enzymatic Activity and Confers Partial Remdesivir Resistance. **14**,.
- [84] Kumari, D., Kumari, N., Kumari, S., Sinha, P.K., Shahi, S.K., Biswas, N.R., Kumar, A. (2022). Identification and Characterization of Novel Mutants of Nsp13 Protein among Indian SARS-CoV-2 Isolates. *Open Bioinforma. J.* **15**,.
- [85] Banerjee, S., Seal, S., Dey, R., Mondal, K.K., Bhattacharjee, P. (2021). Mutational spectra of SARS-CoV-2 orf1ab polyprotein and signature mutations in the United States of America. *J. Med. Virol.* **93**, 1428–1435.
- [86] Khailany, R.A., Safdar, M., Ozaslan, M. (2020). Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports.* **19**, 100682.
- [87] Mercatelli, D., Giorgi, F.M. (2020). Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. *Front. Microbiol.* **11**, 1–13.
- [88] Kaushal, N., Gupta, Y., Goyal, M., Khaiboullina, S.F., Baranwal, M., Verma, S.C. (2020). Mutational frequencies of SARS-CoV-2 genome during the beginning months of the outbreak in USA. *Pathogens.* **9**, 1–16.
- [89] Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., Masciovecchio, C., Angeletti, S., Ciccozzi, M., Gallo, R.C., Zella, D., Ippodrino, R. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J. Transl. Med.* **18**, 1–9.
- [90] Nagy, Á., Pongor, S., Gyórfy, B. (2021). Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe and mild outcome. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **57**, 0–4.

- [91] Zekri, A.N., Mohanad, M., Hafez, M.M., Soliman, H.K., Ahmed, O.S. (2021). BBA - Molecular Basis of Disease Genome sequencing of SARS-CoV-2 in a cohort of Egyptian patients revealed mutation hotspots that are related to clinical outcomes. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1867**, 166154.
- [92] Chang, T.J., Yang, D.M., Wang, M.L., Liang, K.H., Tsai, P.H., Chiou, S.H., Lin, T.H., Wang, C.T. (2020). Genomic analysis and comparative multiple sequences of SARS-CoV2. *J. Chinese Med. Assoc.* **83**, 537–543.
- [93] Benvenuto, D., Angeletti, S., Giovanetti, M., Bianchi, M., Pascarella, S., Cauda, R., Ciccozzi, M., Cassone, A. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information. *J. Infect.* **81**, e24–e27.
- [94] Voloch, C.M., Da Silva Francisco, R., De Almeida, L.G.P., Brustolini, O.J., Cardoso, C.C., Gerber, A.L., Guimarães, A.P.D.C., Leitão, I.D.C., Mariani, D., Ota, V.A., Lima, C.X., Teixeira, M.M., Dias, A.C.F., Galliez, R.M., Faffe, D.S., Pôrto, L.C., Aguiar, R.S., Castiñeira, T.M.P.P., Ferreira, O.C., Tanuri, A., R De Vasconcelos, A.T. (2021). Intra-host evolution during SARS-CoV-2 prolonged infection. *Virus Evol.* **7**, 1–11.
- [95] Yin, C. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information .
- [96] Wang, L., Wang, Y., Ye, D., Liu, Q. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information .
- [97] Phan, T. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information .
- [98] Toyoshima, Y., Nemoto, K., Matsumoto, S., Nakamura, Y., Kiyotani, K. (2020). SARS-CoV-2 genomic variations associated with mortality rate of COVID-19. *J. Hum. Genet.* **65**, 1075–1082.
- [99] Jalily Hasani, H., Barakat, K. (2017). Homology modeling: An overview of fundamentals and tools. *Int. Rev. Model. Simulations.* **10**, 129–145.
- [100] Kann, M.G. (2007). Protein interactions and disease: Computational approaches to uncover the etiology of diseases. *Brief. Bioinform.* **8**, 333–346.
- [101] Doğan, B. (2015). Artificial Intelligence Based Methods For The Solution Of Protein Folding Problem By Using Coarse-Grained Lattice And Off-Lattice Models.

- [102] Kundrotas, P., Lensink, M., Alexov, E. (2008). Homology-based modeling of 3D structures of protein-protein complexes using alignments of modified sequence profiles. *J. Ijbiomac.* **43**, 198–208.
- [103] Vyas, V.K., Ukawala, R.D., Ghate, M., Chintla, C. (2012). Homology modeling a fast tool for drug discovery: Current perspectives. *Indian J. Pharm. Sci.* **74**, 1–17.
- [104] Cavasotto, C., Phatak, S. (2009). Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Sci. Direct.* **14**, 676–683.
- [105] Mart, M.A., Stuart, A.C., Roberto, S., Melo, F., Andrej, S. (2000). Comparative Protein Structure Modeling of Globulins and Globulins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291–325.
- [106] Apostolico, A., Giancarlo, R. (1998). Sequence alignment in molecular biology. *J. Comput. Biol.* **5**, 173–196.
- [107] Muller, A., MacCallum, R., Sternberg, M. (1999). Benchmarking PSI-BLAST in genome annotation. *J. Mol. Biol.* **293**, 1257–1271.
- [108] Saqi, M.A.S., Russell, R.B., Sternberg, M.J.E. (1998). Misleading local sequence alignments: Implications for comparative protein modelling. *Protein Eng.* **11**, 627–630.
- [109] Johnson, M.S., Overington, J.S. (1993). A structural basis for sequence comparisons: an evaluation of scoring methodologies. *J. Mol. Biol.* **233**, 716–738.
- [110] Krieger, E., Nabuurs, S.B., Vrient, G. (2003). Homology Modeling. *Methods Biochem. Anal.* **44**,.
- [111] Fiser, A., Sali, A. (2003). ModLoop: Automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics.* **19**, 2500–2501.
- [112] Tappura, K. (2001). Influence of rotational energy barriers to the conformational search of protein loops in molecular dynamics and ranking the conformations. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **44**, 167–179.
- [113] Sánchez, R., Šali, A. (1997). Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **29**, 50–58.
- [114] Du, Z., Su, H., Wang, W., Ye, L., Wei, H., Peng, Z., Anishchenko, I., Baker, D., Yang, J. (2021). The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nat. Protoc.* **16**, 5634–5651.
- [115] Kim, D.E., Chivian, D., Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* **32**, 526–531.
- [116] Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21.
- [117] Benkert, P., Künzli, M., Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 510–514.

- [118] Benkert, P., Tosatto, S.C.E., Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **71**, 261–277.
- [119] Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Prisant, M.G., Videau, L.L., Deis, L.N., Verma, V., Keedy, D.A., Hintze, B.J., Chen, V.B., Jain, S., Lewis, S.M., Arendall, W.B., Snoeyink, J., Adams, P.D., Lovell, S.C., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* **27**, 293–315.
- [120] Davis, I.W., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2004). MolProbity: Structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Res.* **32**, 615–619.
- [121] Pires, D.E. V., Ascher, D.B., Blundell, T.L. (2014). Structural bioinformatics mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. **30**, 335–342.
- [122] Magliery, T.J., Lavinder, J.J., Sullivan, B.J. (2011). Protein stability by number: High-throughput and statistical approaches to one of protein science’s most difficult problems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 443–451.
- [123] Rabbani, B., Nakaoka, H., Akhondzadeh, S., Tekin, M., Mahdiah, N. (2016). Next generation sequencing: Implications in personalized medicine and pharmacogenomics. *Mol. Biosyst.* **12**, 1818–1830.
- [124] Pandurangan, A.P., Ochoa-Montano, B., Ascher, D.B., Blundell, T.L. (2017). SDM: A server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res.* **45**, W229–W235.
- [125] Pires, D.E. V., Ascher, D.B., Blundell, T.L. (2014). DUET : a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. **42**, 314–319.
- [126] Rodrigues, C.H.M., Pires, D.E. V., Ascher, D.B. (2020). DynaMut2 : Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. 1–10.
- [127] Chen, J., Malone, B., Llewellyn, E., Grasso, M., Shelton, P.M.M., Olinares, P.D.B., Maruthi, K., Eng, E.T., Vatandaslar, H., Chait, B.T., Kapoor, T.M., Darst, S.A., Campbell, E.A. (2020). Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex. *Cell*. **182**, 1560-1573.e13.
- [128] Xia, H., Cao, Z., Xie, X., Zhang, X., Chen, J.Y.C., Wang, H., Menachery, V.D., Rajsbaum, R., Shi, P.Y. (2020). Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **33**, 108234.
- [129] Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 491–6.
- [130] Nguyen, T.T., Chang, S.-C., Evnouchidou, I., York, I.A., Zikos, C., Rock, K.K., Goldberg, A.L., Stratikos, E., Stern, L.J. (2011). Structural Basis For Antigenic

Peptide Precursor Processing by the Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase ERAP1. *Nat Struct Mol Biol. Author.* **18**, 604–613.

- [131] Wu, S., Tian, C., Liu, P., Guo, D., Zheng, W., Huang, X., Zhang, Y., Liu, L. (2021). Effects of SARS-CoV-2 mutations on protein structures and intraviral protein–protein interactions. *J. Med. Virol.* **93**, 2132–2140.
- [132] Farkas, C., Fuentes-Villalobos, F., Garrido, J.L., Haigh, J., Barría, M.I. (2020). Insights on early mutational events in SARS-CoV-2 virus reveal founder effects across geographical regions. *PeerJ.* **2020**, 1–14.
- [133] Garvin, M.R., T. Prates, E., Pavicic, M., Jones, P., Amos, B.K., Geiger, A., Shah, M.B., Streich, J., Felipe Machado Gazolla, J.G., Kainer, D., Cliff, A., Romero, J., Keith, N., Brown, J.B., Jacobson, D. (2020). Potentially adaptive SARS-CoV-2 mutations discovered with novel spatiotemporal and explainable AI models. *Genome Biol.* **21**, 1–26.
- [134] Alouane, T., Laamarti, M., Essabbar, A., Hakmi, M., Bendani, H., Laamarti, R., Ghrifi, F., Allam, L., Aanniz, T., Mentag, R., Sbabou, L., Nejari, C., Amzazi, S., Belyamani, L. (2020). SARS-CoV-2 Genomes: Moving Toward a Universal Vaccine for the “ Confined Virus ”? 1–19.
- [135] Matyášek, R., Kovařík, A. (2020). Mutation patterns of human SARS-CoV-2 and bat RATG13 coronavirus genomes are strongly biased towards C>U transitions, indicating rapid evolution in their hosts. *Genes (Basel).* **11**, 1–13.
- [136] Wang, R., Hozumi, Y., Zheng, Y.H., Yin, C., Wei, G.W. (2020). Host immune response driving SARS-CoV-2 evolution. *Viruses.* **12**, 1–20.
- [137] Jen, J., Wang, Y.C. (2016). Zinc finger proteins in cancer progression. *J. Biomed. Sci.* **23**, 1–9.
- [138] Iuchi, S. (2001). Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 625–635.
- [139] Filippova, G.N., Ulmer, J.E., Moore, J.M., Ward, M.D., Hu, Y.J., Neiman, P.E., Collins, S.J., Qi, C.F., Loukinov, D.I., Pugacheva, E.M., Morse, H.C., Lobanenko, V. V., Klenova, E.M., Grundy, P.E., Feinberg, A.P., Cleton-Jansen, A.M., Moerland, E.W., Cornelisse, C.J., Suzuki, H., Komiyama, A., Lindblom, A., Dorion-Bonnet, F. (2002). Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Res.* **62**, 48–52.
- [140] Takaku, M., Grimm, S.A., Roberts, J.D., Chrysovergis, K., Bennett, B.D., Myers, P., Perera, L., Tucker, C.J., Perou, C.M., Wade, P.A. (2018). GATA3 zinc finger 2 mutations reprogram the breast cancer transcriptional network. *Nat. Commun.* **9**, 1–14.
- [141] Munro, D., Gherzi, D., Singh, M. (2018). Two critical positions in zinc finger domains are heavily mutated in three human cancer types. *PLoS Comput. Biol.* **14**, 1–17.

- [142] Ma, J., Chen, Y., Wu, W., Chen, Z. (2021). Structure and Function of N-Terminal Zinc Finger Domain of SARS-CoV-2 NSP2. *Virol. Sin.* **36**, 1104–1112.
- [143] Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Lou, Z., Yan, L., Zhang, R., Rao, Z. (2015). Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 9436–9441.
- [144] Liu, Y.K., Chen, H.Y., Chueh, P.J., Liu, P.F. (2019). A one-pot analysis approach to simplify measurements of protein stability and folding kinetics. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* **1867**, 184–193.
- [145] Shoichet, B.K., Baase, W.A., Kuroki, R., Matthews, B.W. (1995). A relationship between protein stability and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 452–456.
- [146] Abdalla, M., Eltayb, W.A., El-Arabey, A.A., Singh, K., Jiang, X. (2022). Molecular dynamic study of SARS-CoV-2 with various S protein mutations and their effect on thermodynamic properties. *Comput. Biol. Med.* **141**, 105025.
- [147] Luque, I., Freire, E. (2000). Structural Stability of Binding Sites: Consequences for Binding Affinity and Allosteric Effects. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* **4**, :63–71.

ÖZGEÇMİŞ

