

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİNKO PROTEİNLERİNİN BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN *İN SİLİKO*  
OPTİMİZASYONLARI

RECEP ADIYAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN  
YRD. DOÇ .DR. GÜNDOĞ YÜCESAN

İSTANBUL, 2014

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİNKO PROTEİNLERİNİN BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN *İN SİLİKO***  
**OPTİMİZASYONLARI**

Recep ADIYAMAN tarafından hazırlanan tez çalışması 07.08.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Yrd. Doç.Dr. Gündoğ YÜCESAN  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Yrd. Doç.Dr. Gündoğ YÜCESAN  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tarık EREN  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç.Dr. Alper YILMAZ  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ÖNSÖZ

---

Tez çalışmamda bana yardımcı olan ve yol gösteren hocam Yrd. Doç. Dr. Gündoğ YÜCESAN'a, çalışmalarımın her adımında bulunan ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Alper YILMAZ'a, makalesi ve çalışmama sunduğu dokümantasyonlarla yardımcı olan Prof. Dr. Daniel HOFFMANN'a ve eğitim hayatım boyunca desteğini eksik etmeyen aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Ağustos, 2014

Recep ADIYAMAN

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vi
KISALTIMA LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiv
<b>BÖLÜM 1</b>	
GİRİŞ.....	1
1.1    Literatür Özeti .....	1
1.2    Tezin Amacı .....	1
1.3    Hipotez.....	2
<b>BÖLÜM 2</b>	
ÇİNKO BAĞLANAN PROTEİNLERİN YAPISAL ANALİZİ .....	3
2.1    Çinkonun Konsantrasyonunun Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler.....	3
2.1.1    Çinkonun Biyolojik Önemi .....	3
2.1.2    Çinko Tespitinde Kullanılan Yöntemler .....	6
2.1.3    Protein Tabanlı Çinko Biyosensörler.....	7
2.2    Hesapsal Yöntemlerde Kullanılan Veri Tabanları ve Yazılımlar .....	8
2.2.1    Protein Data Bank.....	8
2.2.2    FoldX.....	9
2.2.3    Gene Ontology (GO) Term.....	10
2.2.4    Autodock Vina .....	10
2.2.5    UCSF Chimera ve PyMOL.....	11
<b>BÖLÜM 3</b>	
MATERYAL VE METOTLAR.....	12

3.1	GO Terimleri ve Protein Data Bank 'tan Verilerin Eldesi .....	13
3.2	Hesapsal Yöntemlerle Mutantların Belirlenmesi.....	14
3.3	Mutantların Metal Bağlanma Afinitelerinin ve Stabilitelerinin Hesabı ....	17
<b>BÖLÜM 4</b>		
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>		<b>20</b>
4.1	Belirlenen Proteinlerin Çinko Bağlanma Afinitesi ve Stabilitate Grafikleri ..	22
4.2	Belirli Bir Proteinde Çinko İyonuna Erişebilirliğinin İncelenmesi.....	56
<b>KAYNAKLAR .....</b>		<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>		<b>67</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

$A^{\circ}$	Angstrom
$K_d$	Ayrışma sabiti
$R$	Gaz sabiti
$r$	Korelasyon katsayısı
$T$	Sıcaklık (Kelvin)
$\Delta G$	Serbest enerji
$\Delta G_{vdw}$	Van der Waals etkileşimlerinden serbest enerjiye gelen katkı
$\Delta G_{solvH}$	Apolar gruplardan serbest enerjiye gelen katkı
$\Delta G_{solvP}$	Polar gruplardan serbest enerjiye gelen katkı
$\Delta G_{hbond}$	Hidrojen bağlarından serbest enerjiye gelen katkı
$\Delta G_{wb}$	Su moleküllerinden serbest enerjiye gelen katkı
$\Delta G_{el}$	Yüklü gruplardan ve elektrostatikten serbest enerjiye gelen katkı
$\Delta S_{mc}, \Delta S_{sc}$	Entropiden serbest enerjiye gelen katkı

## KISALTMA LİSTESİ

---

AF594	AlexaFluor 594
CA(II)	Carbonic Anhydrase Isozyme II
DPS	Dapoxyl Sulfonamide
FRET	Förster resonance energy transfer
NMR	Nuclear magnetic resonance
PDB	Protein Data Bank
XRF	X-ray Fluorescence Spectrometry

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1	Çalışmamızdaki adımları gösteren diyagram ..... 12
Şekil 3.2	Protein Data Bank “Ligand File Download” aracılığıyla üç boyutlu yapısında çinko içeren pdb dosyalarının indirilmesi.....13
Şekil 3.3	Chimera yazılımıyla Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 18 amino asitlik bölgesinin görüntüsü ..... 15
Şekil 3.4	Chimera yazılımıyla Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 18 amino asitlik bölgesinin 6. amino asit olan histidin yerine fenilalaninle değiştirilmesinin gösterilmiştir..... 16
Şekil 3.5	Chimera yazılımıyla Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 18 amino asitlik bölgesinin 6. amino asidi olan histidin yerine fenilalaninle değiştirilmesinden önceki ve sonraki üç boyutlu yapısı (açık mavi aa değişikliğinden sonraki hali )..... 16
Şekil 3.6	FoldX yazılımının 3.0 beta6 sürümüyle mutant dosyalarının aminoasit değişikliğinden sonraki yapısının hesabı ..... 17
Şekil 3.7	FoldX yazılımının 2.5.2 sürümüyle mutant dosyalarının aminoasit değişikliğinden sonraki yapısının stabilite hesabı ..... 19
Şekil 3.8	FoldX yazılımının 2.5.2 sürümüyle mutant dosyalarının aminoasit değişikliğinden sonraki yapısının afinite hesabı..... 19
Şekil 4.1	Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. .... 23
Şekil 4.2	Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin (18 amino asitlik bölgesi) doğal hali ve mutantlarının Autodock Vina ve FoldX yazılımlarıyla elde edilen çinko bağlanma afinitelerinin grafiği..... 24
Şekil 4.3	Metalotiyonein 1 aktivatörü (bakırdan etkilenen transkripsiyon faktörünün çinko domaini) proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi..... 25
Şekil 4.4	Thermus Thermophilus'den elde edilen L36 ribozomal proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi ..... 26
Şekil 4.5	Methionyl-trna synthetase (metiyonil -trna sentetaz) proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi ..... 27
Şekil 4.6	ZNF265 adlı proteinin çinko parmak domaininin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. .... 28
Şekil 4.7	CREB bağlayıcıyı proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. 29

Şekil 4.8	LASP-1 proteininin amino ucundaki LIM domainin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	30
Şekil 4.9	Mason-Pfizer maymun virüsünün (MPMV) Gag proteininden nükleokapsit kesitinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	31
Şekil 4.10	MMTV virüsü nükleokapsit proteinin P14 (birinci çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	32
Şekil 4.11	Hücre çekirdeği gözenek proteini NUP153 (dördüncü çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	33
Şekil 4.12	Çinko parmak proteini 406 (Sekizinci C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	34
Şekil 4.13	Çinko parmak proteini 347 (C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	35
Şekil 4.14	Çinko parmak proteini 268 ( C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	36
Şekil 4.15	Çinko parmak proteini 28 ( C2H2 çinko parmak bölgesi, insan proteini homologu) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	37
Şekil 4.16	Çinko parmak proteini 484 ( C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	38
Şekil 4.17	Çinko parmak proteini 347 ( C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	39
Şekil 4.18	GATA-1 transkripsiyon faktörü proteinin amino ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	40
Şekil 4.19	CREB bağlayıcı proteinin CH1 bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	41
Şekil 4.20	SWI5 transkripsiyon faktörü proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	42
Şekil 4.21	Transkripsiyon Faktör 2 amino ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	43
Şekil 4.22	SP1F2 transkripsiyon faktörü proteinin çinko parmak bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	44
Şekil 4.23	Çinko parmak proteini ZFPM1 üçüncü çinko parmak bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	45
Şekil 4.24	SecA ATPaz karboksil ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	46
Şekil 4.25	LASP-1 proteini amino ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	47
Şekil 4.26	XFIN proteini otuz birinci çinko parmak bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	48
Şekil 4.27	Çinko parmak proteini 406 ( onuncu C2H2 çinko parmak bölgesi) ve çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	49
Şekil 4.28	Çinko parmak proteini 268 ( C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	50
Şekil 4.29	B hücre lenfoma 6 proteinin (C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. ....	51
Şekil 4.30	Kuş türüne ait pankreas proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	52

Şekil 4.31	MLV virüsünden izole edilmiş GAG proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi.....	53
Şekil 4.32	MMTV virüsü nükleokapsit proteini - P14 (birinci çinko parmak bölgesi) 21 amino asitlik bölgesinin 39.amino asitinin doğal hali olan histidin yerine glutamat olan mutantının çinkoya erişebilirliğinin PyMOL yazılımıyla elde edilen görüntüsü.....	56
Şekil 4.33	MMTV virüsü nükleokapsit proteini - P14 (birinci çinko parmak bölgesi) 21 amino asitlik bölgesinin 41.amino asitinin doğal hali olan lizin yerine glutamat olan mutantının çinkoya erişebilirliğinin PyMOL yazılımıyla elde edilen görüntüsü .....	56
Şekil 4.34	MMTV virüsü nükleokapsit proteini - P14 (birinci çinko parmak bölgesi) 21 amino asitlik bölgesinin doğal halinin çinkoya erişebilirliğinin PyMOL yazılımıyla elde edilen görüntüsü.....	57

## ÇİZELGE LİSTESİ

---

	Sayfa
Çizelge 2.1 Günlük alınması gereken çinko miktarı .....	5

## ÇINKO PROTEİNLERİNİN BİYSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN *İN SİLİKO* OPTİMİZASYONLARI

Recep ADIYAMAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç.Dr. Gündoğ YÜCESAN

Günümüzde proteinlere yeni bir fonksiyon kazandırmak ve geliştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Proteinler, metal iyonlarına geniş bağlanma afinitesi aralığında bağlanarak çeşitli fonksiyonlar gösteren potansiyel sensör moleküllerdir. Proteinlerin metallere bağlanma afinitelerini optimize etmek için çeşitli teknikler mevcuttur. Geleneksel yöntemlerden biri olan “site directed mutagenesis” ile metallerin bağlanma afinitelerini istenilen seviyede optimize etmek zaman alıcı ve zordur. Bu yöntemin bir başka dezavantajı da ekspresyon sırasında inklüzyon cisimcikleri oluşabilmesidir. Ayrıca saflaştırma sırasında eklenen tag dizileri FRET sisteminde spesifik olmayan etkileşimlere yol açabilir. Bu bilgiler ışığında sensör molekülün kararlı ve küçük olması sonucuna varabiliriz. Bu doğrultuda hesapsal bir yaklaşımla daha hızlı sonuçlara ulaşacağımızı öngörmekteyiz. Bu öngörüyle bilgisayar ortamında üç boyutlu yapısı bilinen çinko bağlı kısa peptidlerin optimizasyonunu amaçlamaktayız. Yaptığımız çalışmalarda FoldX programıyla çinko civarındaki, 70 aminoasitten kısa peptidlerdeki aminoasitleri değiştirip mutasyondan önceki ve sonraki afiniteleri elde edebilmekteyiz. Autodock programını da FoldX programını doğrulamak amacıyla birkaç proteinde redocking yöntemiyle kullandık. Çalışmamızın sonucuda hem daha stabil hem çinkonun bağlanma afinitesi artmış mutantlar saptadık. Bu mutantlardan en uygununu seçilip deneysel olarak doğrulanması amaçlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** inko, Biyosensör, FoldX, Amino asit mutasyonu, Autodock Vina

***IN SILICO* OPTIMIZATION OF ZINC BINDING PROTEINS FOR BIOSENSOR  
APPLICATIONS**

Recep ADIYAMAN

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assist.Prof.Dr. Gündoğ YÜCESAN

Currently there are many studies in process aiming to provide proteins a new function and improve their existing functions. Proteins are potential sensor molecules which are binding to metal ions with wide range of binding affinities and performing diverse functions. There are variety of techniques to optimize the metal binding affinities. One of the conventional methods is “site directed mutagenesis”, with which it is hard and time consuming to optimize metal binding affinities at the desired level. Another disadvantage of this technique is inclusion body formation during expression. Also, the tag sequences which are being added in the process of purification might cause non specific interactions in the FRET system. All these information suggest that the sensor molecule should be stable and small. We foresee that improved protein biosensors can be discovered faster by employing a computational approach. Therefore, we aimed optimizing the zinc binding affinity of small peptides with known three dimensional structures computationally. Our study is comprised of mutating amino acids in vicinity of zinc binding region of peptides that are shorter than 70 amino acids. Before and after each mutation, zinc binding affinity is calculated by FoldX software. Autodock Vina software was used to validate our results for few proteins by redocking method. We identified several mutants which have increased zinc binding affinity and greater stability

**Keywords:** Zinc, Biosensor, FoldX, amino acid mutation, Autodock Vina

### GİRİŞ

#### 1.1 Literatür Özeti

Çinko canlı organizmalar ve yaşamsal faaliyetler için önemli geçiş metallerindedir. Çinko protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmalarında, enzimlerin çalışmasında, hücre içi faaliyetlerde, üreme sisteminde, yaraların iyileşmesinde, bağışıklık sistemi başta olmak üzere birçok metabolik faaliyette rol almaktadır.

Biyoinformatik analizler de göstermiştir ki insan genomundaki genlerin yaklaşık %3-%10'u çinko bağlanan protein kodlamaktadır. 2000'den fazla çinkoyla alakalı transkripsiyon faktörü gen ekspresyonunda etkindir.

Kompleks ortamlarda çinkonun konsantrasyonunun ölçülmesi hem biyomedikal hem de çevre uygulamaları açısından önemlidir. Çinkonun düzeyinin belirlenmesi insan sağlığı açısından da önemlidir. Ayrıca çinkonun yüksek düzeyde olması durumunda toksisite olabileceğinden, konsantrasyonunun belirlenmesi önem arz etmektedir. Literatürde çinkoya bağlanabilen proteinler kullanılarak oluşturulan FRET biyosensörlerle çinkonun konsantrasyonu ölçüldüğü belirtilmiştir. Fakat biyosensörler çok kompleks molekülerdir ve optimizasyonlarında da büyük zorluklar vardır. Günümüzdeki çalışmalar çinkoya bağlanabilen optimize yapılarda proteinler kullanarak daha kullanışlı biyosensörler geliştirmeye yöneliktir.

#### 1.2 Tezin Amacı

Literatürdeki çalışmalarda kompleks ortamlarda çinko konsantrasyonu ölçebilen protein tabanlı biyosensörlere örnekler vardır. Çalışmalarda kullanılan proteinler kompleks ve büyük yapıdadırlar, bu kompleks yapıların optimizasyonu için "site direct mutagenesis" gibi yöntemler mevcuttur. "Site directed mutagenesis" yöntemini

özetleyecek olursak; özel dizayn edilmiş primerlerle çift sarmal DNA üzerinde istenilen nükleotid değişiklikleri gerçekleştirilir. Nükleotid değişikliğine uğrayan DNA standart moleküller teknikler kullanılarak hücre kültürüne verilir mutasyona uğramış gen ürünü olan protein elde edilir. Proteini saf eldesi için o proteine karşı antikorlar kullanılır. Hali hazırda antikor olmayan proteinler içinse tag dizileri kullanılır. Böylelikle ekspresyondan sonra mutasyona uğramış protein kısa bir tag dizisi taşır ve saflaştırılabilir. Bu yöntemin dezavantajları; ekspresyon sırasında inklüzyon cisimcikleri oluşabilmesidir, ayrıca saflaştırma sırasında eklenen tag dizileri FRET sisteminde spesifik olmayan etkileşimlere yol açabilir. Sonuç olarak bu yöntem zaman alıcı ve istenilen yapıdaki proteinin optimizasyonu zordur. Günümüzdeki çalışmalar çinkoya bağlanabilen daha kısa biyosensörlerin optimizasyonuna yöneliktir. Bu amaca ulaşmak deneysel yöntemlerle oldukça zordur. Bunun yerine moleküler modelleme yazılımları kullanılarak bir proteinde amino asit değişikliğinin yapısal olarak sonuçları tahmin edilebilir. Böylelikle hesapsal olarak optimize edilmiş aday biyosensörler belirlenip deneysel ortama taşınabilir. Sonuç olarak hedefli çalışıldığından dolayı da zaman ve maliyetten büyük kazanç elde edilir. Hesapsal olarak optimize edilmiş çinko biyosensörü geliştirmek için Protein Data Bank'ta bulunan üç boyutlu yapısı bilinen peptidleri kaynak olarak kullandık. Tezin sonucunda elde ettiğimiz veriler çinkonun proteinlere bağlanma afinitesinin temellerin anlaşılmasında yol göstereceğini öngörmekteyiz. Bilgisayar ortamında kararlı bir şekilde optimize edilen mutantları belirledikten sonra deneysel olarak sentezleyip FRET biyosensörü olarak kullanmayı amaçlamaktayız.

### **1.3 Hipotez**

Enzimler belirli görevleri yerine getirmektedirler, çinko proteinler de biyolojik fonksiyonlarını eda edebilecek afiniteye çinkoya bağlanmaktadır. Biyosensör ve biyokatalizör uygulamaları için, istediğimiz afinite değerlerine ulaşmamız gerekmektedir, bu da protein mühendisliği ve "directed evolution" yöntemleriyle gerçekleştirilmekte, fakat dezavantajları dolayısıyla hesapsal metotlar kullanılarak, protein metal iyonu afinitesi belirlemeleri önemlidir. Biz de çalışmamızda çinkonun proteine bağlanma afinitesini hesapsal metotlar ve programlar aracılığıyla biyosensör uygulamaları için optimize etmeyi amaçlamaktayız.

### ÇİNKO BAĞLANAN PROTEİNLERİN YAPISAL ANALİZİ

#### 2.1 Çinkonun Konsantrasyonunun Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler

##### 2.1.1 Çinkonun Biyolojik Önemi

Çinko, bakır, demir ve nikel gibi geçiş metalleri canlı organizmalar için gereklidir. Demirden sonra en çok bulunan eser elementi olan çinko, hücrelerde önemli katalitik, yapısal ve düzenleyici rol oynamaktadır [1], [2], [3], [4]. Çinko; protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmalarında, enzimlerin çalışmasında, hücre içi faaliyetlerde, üreme sisteminde, yaraların iyileşmesinde ve bağışıklık sistemi başta olmak üzere birçok metabolik faaliyette rol almaktadır [5]. Çinko canlılarda her gün belli bir miktarda alınması gerekli mineraller arasındadır [6]. Canlılarda çinko +2 değerlikli olarak bulunan demir ve bakır gibi oksidasyona veya redüksiyona uğramaz [7], [8].

Altı enzim sınıfının tümünü kapsayan 300'den fazla çinko içeren enzim tespit edilmiştir. Birçok enzim de çinko ile etkileşimdedir. 2000 den fazla çinkoyla alakalı transkripsiyon faktörü gen ekspresyonunda etkindir [9], [10], [11]. Biyoinformatik analizler göstermiştir ki insan genomundaki genlerin yaklaşık %3-%10'u çinko bağlanan protein kodlamaktadır [12], [13], [14]. Çinkonun, insandaki proteinlerin yaklaşık %10'una potansiyel olarak bağlanabildiği tahmin edilmektedir [15], [16]. Karbonik anhidraz, alkalin fosfataz, DNA polimeraz, RNA polimeraz, karboksipeptidaz yapısında çinko bulunan başlıca enzimlerdir.

Birçok durumda çinko iyonu metalloenzimlerin biyolojik fonksiyonu için temel bir kofaktördür. Ayrıca, çinko içeren birçok motif vardır ve bu motifler de proteinin yapısal olarak stabilitesi açısından etkili bir faktördür. Bundan dolayı çinko içeren motifler

biyolojik proseslerde aktif rol aldıklarından dolayı önem arz etmektedir [5], [17]. Çinko eksikliği durumunda çinko bağlı enzimlerin işlevlerini tam yerine getirememesi gibi bir durum da ortaya çıkabilir [9].

DNA ve RNA 'ya çinkonun bağlanması protein sentezi ve replikasyonunda önemli bir etkidir. DNA ve RNA sentezinde işlev gören enzimlerin büyük bir çoğunluğunun yapısında çinko bulunmaktadır [7]. Ayrıca çinko hücre içindeki nükleik asitleri de stabilize eden hücre içi organellerin bütünlüğünü korumada, viral ve immün olaylarda etkin rol oynar [6], [7].

Yetişkin bir insanda 1, 4 -2, 5 gr arasında değişen miktarda çinko bulunmaktadır ve başlıca eritrositlerde, prostat, karaciğer, retina, kemik ve kas dokularında bulunmaktadır. Çinkonun kemik ve dişlerdeki konsantrasyonu yüksektir [18], [19]. Bağırsaklardan emilen çinko ardından karaciğere taşınır. Karaciğer, böbrek ve dalakta çinkonun hızlı bir şekilde birikimi ve dönüşümü söz konusudur. Çinko metabolizmasında karaciğer etkili rol oynar. Metabolik faaliyetler için sinir sistemi ve kemiklerde bulunan çinkonun salınımı zordur [7].

Yetişkin bir insanın kanındaki çinko miktarının %75-%88'i eritrositlerde, %12-%22 'si plazmada, %3'ü de lökositlerde bulunmaktadır [18], [19]. Beyindeki çinko miktarı çocukluk döneminde artış göstermektedir. Yetişkin döneminde belli bir düzeyde bulunan çinko miktarı yaşlılık döneminde ise azalmaktadır. Beyindeki çinkonun önemli bir bölümü metalloproteinlere bağlı vaziyette bulunmaktadır [7], [20]. Dokularda bulunan çinkonun ise 1/6'sı proteinlere bağlı vaziyettedir [19]. Ayrıca, çinko insülin mekanizmasının en önemli bileşenlerindedir [21], [22]. Vücuttaki çinkonun ise yaklaşık %20'si deride bulunur, deride ise epidermis tabakasında dermisin 5-6 katı daha fazla çinko bulunur [23].

Çinko günlük belli bir oranda alınması gerekli minarelerdendir [24], [25], [26], [27].  
(Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1 Günlük alınması gereken çinko miktarı [24].

Yaş	Erkek [mg]	Kadın[mg]	Hamilelik Dönemi [mg]	Emzirme Dönemi [mg]
0 - 6 aylık	2	2		
7 - 12 aylık	3	3		
1-3 yaş	3	3		
4 - 8 yaş	5	5		
9 - 13 yaş	8	8		
14 - 18 yaş	11	9	12	13
19 ve üzeri yaşlarda	11	8	11	12

Anne sütünde bebekler için yeterli miktarda çinko bulunmaktadır [28].

Vücuttaki çinko yüksek oranda dışkıyla vücut dışına atılır. Çinko idrar yoluyla 0, 5 mg/gün, bağırsak yoluyla 2-3 mg/gün vücut dışına atılır. İdrardaki çinko miktarının azalması çinko eksikliğinin bir bulgusudur [7], [8]. Ağız yoluyla alınan çinkonun %30 'u emilir. Hayvansal kaynaklı besinlerde ise çinkonun emilim oranı daha fazladır [9], [29].

Görme, koku ve tat alma gibi fonksiyonların yerine gelmesi için de dokularda belli bir düzeyde çinko bulunmalıdır [9], [30], [31]. Çinko düzeyi bakımından iyi bir beslenme sonucunda insan ve hayvanlarda bağışıklık sisteminde düzelme ve kansere karşı vücutsal fonksiyonlarda gelişme gözlemlenmiştir [32]. Beslenme yoluyla alınan çinko miktarının zihinsel faaliyetlerde önemli bir etken olduğu da görülmüştür [20]. Ayrıca insülinin sentezi, depolanması ve birçok aşamasında çinko da rol almaktadır [33]. Çinko iyonları düşük konsantrasyonlarda bile etkili antimikrobiyal maddelerdendir [24]. Tükürük bezi, prostat, bağışıklık sistemi ve bağırsak hücreleri diğer hücrelerle iletişimde çinko rol alır [16], [24], [34].

Çinko kırmızı ette bol miktarda olmak üzere fasulye, fındık, deniz ürünlerinden yengeç, istakoz ve tahıllarda bulunmaktadır [35], [36], [37], [38]. Bazı besinler, vitaminler ve minareler çinkonun emilimini etkileyerek çinko eksikliğine veya fazlalığına neden olabilir. Fitatlar, fosfatlar, lifli besinler, kalsiyum, oksalat, bakır, kadmiyum ve inorganik demir çinko emilimini azaltır. Şarap, metiyonin, D vitamini, B6 vitamini ve D-penisilamin ise çinkonun emilimini artırır [21], [23].

İnsan vücudunda çinko miktarındaki dengesizlik birçok hastalığa yol açabilir [31]. Genetik bozukluklardan veya beslenmeden kaynaklı çinko eksikliğinde zekâ geriliği, uyuşukluk, mide ve bağırsak sorunları, bağışıklık ve üreme sistemlerinde sorunlar ortaya çıkabilir [39].

Deney hayvanlarında çinko eksikliği üzerine yapılan deneylerde öğrenme yeteneğinin olumsuz yönde etkilendiği, gebelik sırasında yavrunun gelişiminde gerilik, kalp hastalıkları riski ve obezite gibi hastalıklar gözlemlenmiştir [40], [41].

### **2.1.2 Çinko Tespitinde Kullanılan Yöntemler**

Kompleks ortamlarda metal iyonlarının tespit edilmesi ve miktarının belirlenmesi için birçok yöntem vardır. Deniz suyu ve kan gibi kompleks ortamlarda analitlerin miktarının belirlenmesi hem biyomedikal hem de çevre uygulamaları açısından önemlidir. Çinko başta olmak üzere geçiş metallerinin insan sağlığı açısından ve yüksek düzeyde olması durumunda toksik etkisi olabileceğinden, konsantrasyonlarının belirlenmesi önem arz etmektedir [1].

Demir veya bakırdan farklı olarak, çinkonun d orbitali dolu olduğundan ( $3d^{10} 4s^{10}$ ) dolayı demir ve bakır gibi optik absorpsiyon ve emisyon, elektron paramanyetik rezonans ve benzer tekniklerle konsantrasyonun belirlenmesi zordur. Bu nedenle, çinkonun konsantrasyonunu ölçmek için atomik absorpsiyon spektroskopisi, kütle spektrometresi ve X - ışınları spektroskopisi gibi teknikler kullanılabilir. HPLC, ICP-MS gibi hibrid teknikler de birden fazla metal iyonun konsantrasyonunun saptanması için kullanılan yöntemlerdendir. Fakat bu yöntemin belli başlı dezavantajları vardır; numune analiz sırasında tahrif edilmekte, belirlenen metalin tek başına konsantrasyonu belirlememekte, gerçek zamanlı olarak gözlem yapılamamaktadır [2],[42], [43].

Hücre ve dokularda metal iyonlarının konsantrasyonlarının ölçülmesi için X ışını floresan spektrometresi de (XRF) kullanılmaktadır [44]. XRF, katı ve sıvı elementlerin analizi için tahrif etmeyen fakat hücreler için zararlı ve görüntülemeye önce dehidrasyon gerektiren bir yöntemdir [45], [46], [47]. XRF yönteminin de ICP-MS gibi dezavantajı serbest metal iyonu konsantrasyonunu yerine toplam metal içeriğine bağlı ölçüm yapmaktadır.

Bahsettiğimiz yöntemler bir numunedeki toplam metal konsantrasyonunu ölçmekte yararlı olmaktadır. Fakat çinko biyolojik sistemlerde birçok proteine ve küçük moleküllere bağlı vaziyette bulunabilir. Bu nedenle sulu ve biyolojik numunelerde metalin ışına olarak yanıt verdiği göstergelere dayanan +2 değerlikli metallerin ölçülmesi için floresan yöntemler en yaygın yaklaşım haline gelmiştir [48], [49], [50]. Floresan metal iyonu belirteç sisteminin birçok özelliği vardır. Bunlardan başlıcaları; çinko veya diğer metal iyonlarına yüksek afiniteye bağlanması ve seçici olmasıdır [1],[51], [52], [53].

Metallofloresan belirteçler Zn 2+ iyonun izlenmesi için önemli araçlardandır. Bu belirteçler metal iyonlarını tanır ve görüntüler. Floresan sinyalinde bir değişiklik gözlemlenir. Bu değişiklik, yoğunlukta, uyarım ya da emisyon dalga boyunda, bazı durumlarda polarizasyonda veya yaşam süresinde olabilir [54], [55], [56]. Fredrickson dokularda çinko tespit eden (N-6-methoxy-8-quinolyl)-ptoluenesulfonamide (TSQ) geliştirdi. Beyin, pankreas ve diğer dokularda granül çinkonun tespiti mümkün hale geldi. Fakat bu belirteçler de doğru miktar tayini ve hızlı yanıt imkânı sunmamaktadır [57], [58]. Miyawaki'nin geliştirdiği Förster rezonans enerji transferi (FRET) tabanlı sensör bu alanda önemli çalışmalardandır. Bu sensörde çinko iyonu belirli bir proteine bağlanıp konformasyonunu değiştirir, floresan moleküller birbirine yaklaşır ve böylece farklı dalga boyunda ışına yapar [59], [60]. Fakat bu yöntem de hız ve seçicilik bakımından istenilen seviyede değildir [2], [61], [62], [63].

### **2.1.3 Protein Tabanlı Çinko Biyosensörler**

Protein tabanlı çinko biyosensör olarak Karbonik anhidraz II (CA (II)) birçok çalışmada çinko konsantrasyonunun tespiti için kullanılmıştır. Meldrum ve Roughton kırmızı kan hücrelerinde bulunan karbonik anhidrazı keşfetmişlerdir [64], [65]. Daha sonraki

çalışmalarda CA(II) 'ın "site directed mutagenesis" gibi yöntemlerle çinkoya bağlanmasının optmizasyonu yapılmıştır. Yapılan mutasyonlarla CA (II) 'de çinko bağlanma afinitesinin değiştirilebildiği gösterilmiştir [66], [67], [68]. Yapılan mutasyonlarla CA (II) çinkoya bağlanma afinitesi, piko molar (pM) ve mikro molar ( $\mu$ M) arasında değişmektedir [1], [69], [70], [71], [72].

Hücre içine nüfuz edebilen sülfonamid, dapoxyl sülfonamid (DPS) ve CA(II) bağlı ikinci bir florofofor arasında FRET tabanlı ratiometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Donor ve alıcı molekülün konfigürasyonundaki değişimler gözlemlenerek ölçümler yapılır. Bu değişimler, enerji aktarımıyla ilişkilidir. Çinkoya bağlanan DPS, FRET sisteminin donoru rolündedir. CA (II) N-ucuna bağlanan floresans madde olan Alexa Flour594 (AF 594) ise FRET sisteminin akseptörü rolündedir [73], [74], [75], [76]. AF 594 ile çinkoya bağlanan DPS arasında  $Zn^{+2}$  yoluyla enerji aktarımı olur. Alexa Flour 594 enerji aktarımı niceldir. 617 nm dalga boyunda FRET biyosensörle nicelik ölçümü yapılabilir ve böylece çinko miktarı tayin edilebilir [2], [77], [78], [79].

Protein tabanlı çinko sensörler, biyoteknolojik yöntemler ile klonlanıp hücrelere aktarılabilir ve hücre içinde hızlıca ifade edilebilir. CA(II) proteininden nispeten daha küçük alternatifleri bulunup DPS donörüyle daha verimli bir enerji transferi olabilir [2].

Genetik mühendisliği ve de novo tasarım yoluyla çinko iyonlarının afiniteleri optimize edilebilir ve yeni çinko bağlanma bölgeleri keşfedilip dizayn edilebilir [80], [81], [82]. Ayrıca aktif bölgeyi etkileyen faktörler daha net ortaya konulabilir. Bu konuda çalışmalar yapılmakta ve gün geçtikçe etkenler daha çok ortaya çıkmaktadır. [1]

Ayrıca çinkonun konsantrasyonunu ölçmek için daha kullanışlı sensörlerin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Bunlarla birlikte mutantların etkin tasarımı için gerekli faktörlerin anlaşılması amaçlanmaktadır [1], [80], [81].

## **2.2 Hesapsal Yöntemlerde Kullanılan Veri Tabanları ve Yazılımlar**

### **2.2.1 Protein Data Bank**

Protein Data Bank (PDB), proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerin üç boyutlu yapısal verilerini içeren bir veri deposudur. NMR spektroskopisi ve X - ışını kristalografisi ile elde edilen verilerden oluşur. Dünyadan birçok biyolog, biyokimyacı vb. araştırmacılar tarafından elde edilen veriler Protein Data Bank aracılığıyla depolanır

ve bütün araştırmacıların erişimine açılır. Bakteri, maya, sinek, diğer hayvanlar ve insan da dâhil olmak üzere tüm organizmalarda bulunan biyolojik kökenli moleküllerin yapısını ve nasıl çalıştığını anlamamızı sağlar [83], [84].

### 2.2.2 FoldX

FoldX deneysel force field algoritması kullanan protein dizayn programıdır. Hem mutasyonların hem de protein komplekslerinin enerji ve etkileşimlerini hesaplayabilir. FoldX olasılık tabanlı bir rotamer kütüphanesi kullanarak protein ve DNA yan zincirlerinde mutasyon yapılabilir. Kullanım alanı olarak; protein stabilitesinin tahmini, protein komplekslerinde mutasyon, ayrıca mutasyonlardan sonra afinite ve stabilite tahmini olarak özetleyebiliriz [85],[86]. Enerji fonksiyonu, proteinin stabilitesi için önemli olan terimler içermektedir. Bir proteinin serbest enerjisini şu formül kullanılarak hesaplanır;

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{solvH} + \Delta G_{solvP} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{wb} + \Delta G_{el} + \Delta S_{mc} + \Delta S_{sc} \quad (2.1)$$

$\Delta G_{vdw}$  Van der Waals etkileşimlerinden gelen katkıdır,  $\Delta G_{solvH}$  ve  $\Delta G_{solvP}$  polar ve apolar gruplardan gelen katkıdır,  $\Delta G_{hbond}$  molekül içi hidrojen bağlarından gelen katkıdır,  $\Delta G_{wb}$  birden fazla hidrojen bağı yapan bir su molekülü ile sağlanan ilave stabilize enerjisinden gelen katkıdır,  $\Delta G_{el}$  yüklü gruplardan ve elektrostatikten gelen katkıdır.  $\Delta S_{mc}$  ve  $\Delta S_{sc}$  entropiden gelen katılardır.  $\Delta G_{vdw}$ ,  $\Delta G_{solvH}$ ,  $\Delta G_{solvP}$  ve  $\Delta G_{hbond}$  deneysel verilerden elde edilmektedir.  $\Delta S_{mc}$  ve  $\Delta S_{sc}$  teorik hesaplamalardan türetilmiştir [85], [86].

Modellenen PDB uzantılı peptitler de FoldX repair komutuyla optimizasyonu yapılmaktadır. Repair komutuyla zayıf torsiyon açıları ve Van der Waals çakışmaları düzeltilir.

FoldX programı protein ve protein kompleksleri için hızlı ve nicel olarak stabilite hesabı yapmaktadır. FoldX programı kütüphanesinde tanımlanan metalleri tanır ve proteine bağılı metallerin etkileşim enerjilerini hesaplar. [85], [86], [87].

Deneysel olarak  $K_d$  cinsinden ifade edilen ayrışma sabitini, hesapsal verilerle elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırmak ve kcal/mol cinsinden ifade etmek için aşağıdaki eşitlikten faydalanırız.

$$\Delta G = R.T.\ln K_d \quad (2.2)$$

### 2.2.3 Gene Ontology (GO) Term

Biyoloji ile ilgili alanlarda çalışan araştırmacılar alanlarıyla ilgili bilgileri ararken zorluk çekmektedirler. Bu nedenle gen ontolojisi veya GO, gen ve ürünleri arasında niteliklerini birleştiren önemli bir biyoinformatik girişimdir [88]. Gen ve ürünlerinin nitelikleriyle ilişkili kontrollü bir dilin geliştirilmesi, gen ve ürünleri için açıklama ve özetlenmiş halde veri sağlamak, kolay erişim sağlamak ve analiz yoluyla verilerin zenginleştirilmesi GO kullanım amaçlarından sayılabilir [88], [89].

Ontolojiler belirlenebilir veya doğrudan gözlemlenebilen nesnelerin ve aralarındaki ilişkilerin temsillerinden oluşur. Biyoloji ve ilgi alanlarda evrensel standart bir terminoloji yoktur ve kullanılan terimler bir türe, araştırma alanı ya da belli bir araştırma grubuna özgü olabilir. Bu nedenlerden dolayı veri paylaşımını daha zor hale getirir. Gen Ontolojisi projesi gen ve ürünlerinin özelliklerinin temsillerle tanımlanan terimlerinin bir ontolojisini sağlar [89], [90].

Ontoloji belirli alanları kapsamaktadır; hücrenel bileşenleri, hücre içi ve hücre dışındaki ortamın bileşenleri, gen ve ürünlerinin moleküller fonksiyonları ve temel faaliyetleri, biyolojik süreç, dokular ve organizmalara göre sınıflandırmaktadır. Ontolojideki her bir GO teriminin bir ismi vardır. Bu isim birkaç kelimedenden oluşabilir alfa numerik olarak tanımlanır ve ait olduğu domaine göre tanımlanır. Terimin adı eşdeğer, geniş anlamda, daha dar anlamda veya ilgili olma durumlarına göre sınıflandırılabilir. Diğer veri tabanlarıyla da uyumlu terimler kullanılması göz önünde bulundurulur.[88], [90]

### 2.2.4 Autodock Vina

Autodock moleküler modelleme ve simülasyon yapan bir programdır. Bu “docking” programı protein - ligand etkileşimlerini tahmin etmek ve simülasyon amaçlı kullanılmaktadır. Autodock programı otomatik olarak “docking” yapabilen bir programdır. Küçük moleküllerin reseptörle etkileşimlerini üç boyutlu olarak tahmin etmektedir. Autodock Vina ise Autodock programının yeni sürümlerindedir [91].

Autodock uygulama alanları olarak;

X -ışını kristalografisi,

Yapı-bazlı ilaç tasarımı,

Optimizasyona öncülük etmek,

Sanal tarama (HTS),

Protein - protein docking,

Kimyasal mekanizma çalışmaları,

Protein-ligand etkileşimleri uygulama alanlarının başlıcalarındandır [91].

### **2.2.5 UCSF Chimera ve PyMOL**

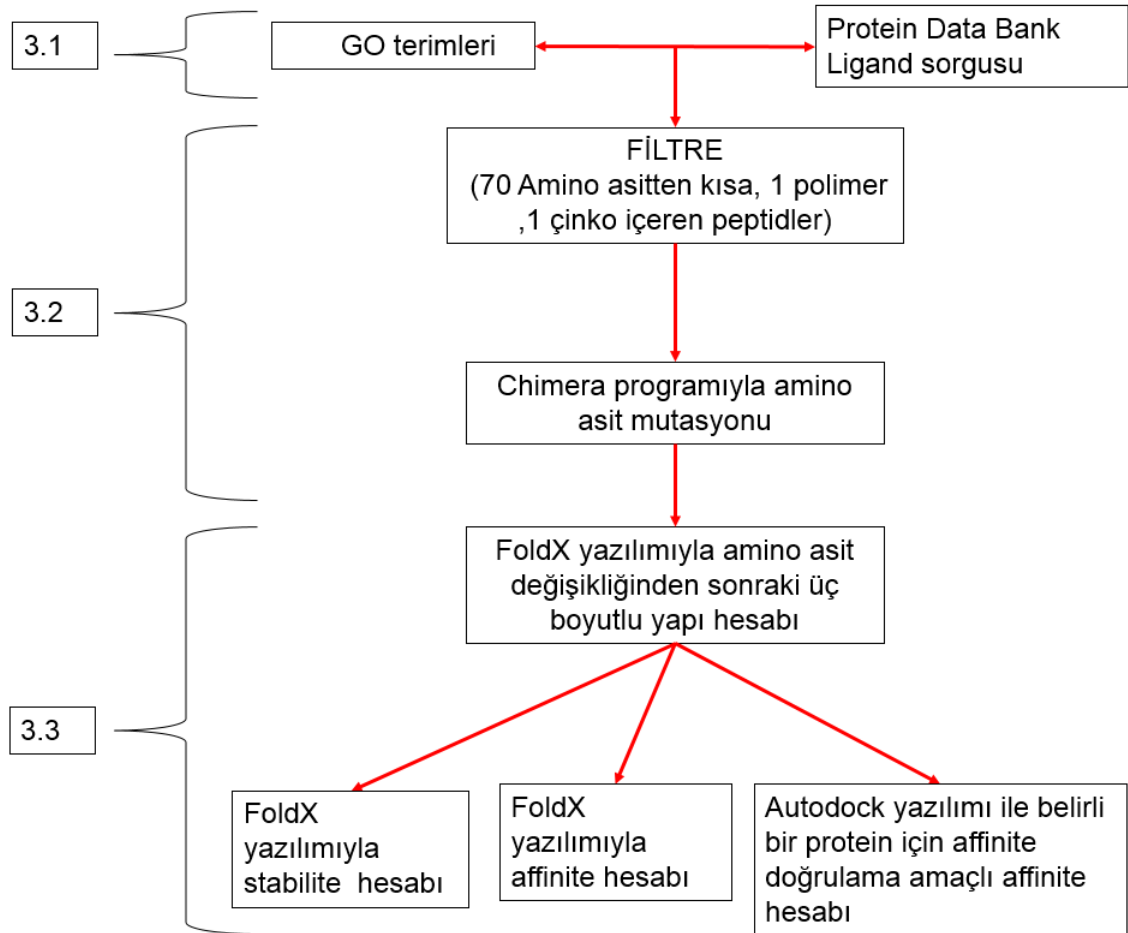
UCSF Chimera belirli uzantılardaki molekülleri, dizileri, yoğunluk haritalarını, üç boyutlu ve etkileşimli olarak görüntüleyebilen, moleküllerin yapılarını ve detaylı olarak verilerin analizini yapabilen ve geliştirilebilen bir programdır. Yüksek kalitede görüntüleme (resim ve videolar) yapılabilir. Chimera geniş dökümantasyonu olan ve ticari olmayan bir programdır. Chimera ayrıca Modeller programının ara yüzü olarak da kullanılabilir. Bu sayede amino asit değişikliği, hidrojen ekleme, minimizasyon gibi işlemlere de olanak sağlar [92], [93].

Üç boyutlu moleküler yapıları görüntülemek ve aminoasit değişikliği için California Üniversitesinin geliştirdiği UCSF Chimera programını kullandık. Dizi analizi, moleküller görüntüleme ve aminoasit değişiminde bize yardımcı olmuştur. “Rotamer” ve “swapa” komutlarıyla Dunbrack kütüphanesinden faydalanarak aminoasit değişikliği yapmamızı sağlamıştır [93].

PyMOL programı açık kaynak kodlu molekülleri görüntülemek için kullanılan bir programdır. Pymol programıyla proteinler gibi küçük moleküller ve biyolojik makromolekülleri yüksek kalitede 3 boyutlu olarak görüntüleyebilir. Programın isminin Py kısmı Python programlama dilinden gelir ve Python programıyla geliştirilebilir [94].

### MATERYAL VE METOTLAR

Çalışmamızdaki adımlar aşağıdaki diyagramda gösterilmiştir. ve ilgili bölümler diyagramda belirtilmiştir (Şekil 3.1);



Şekil 3.1 Çalışmamızdaki adımları gösteren diyagram

### 3.1 GO Terimleri ve Protein Data Bank 'tan Verilerin Eldesi

Çalışmamızın Şekil 3.1 de belirtilen adımında üç boyutlu yapısı bilinen ve Protein Data Bank'ta (PDB) bulunan proteinlerin çinko ile ilgili GO terimleri tespit edildi. Ayrıca PDB bulunmayan ve üç boyutlu yapısı bilinmeyen ve çinko ile ilgili GO terim numaraları da tespit edildi. Aşağıdaki çinko ile ilgili proteinlerin GO terim numaraları elde edildi.

- GO0006829 çinko iyonu taşıyanlar,
- GO0008270 çinko iyonu bağlananlar,
- GO0055069 çinko iyonu homeostazisi,
- GO0061088 çinko iyonu birikimini düzenleyenleri,
- GO0071294 çinko hücrel tepkisinde rol alanlar.

The screenshot displays the 'Ligand File Download' interface on the Protein Data Bank website. The page is divided into several sections:

- Navigation:** Includes tabs for 'Structures', 'Sequences', 'Ligands', and 'Download Services'. A sidebar on the left contains links for 'PDB-101', 'MyPDB', 'Home', 'Deposition', 'Tools', and 'Help'.
- Form:** A text input field labeled 'Enter Ligand Codes:' contains the text 'ZN'. Below it are 'Download options' and 'Filtering options'.
- Download options:** Includes radio buttons for 'Single SDF File', 'Single SDF compressed (gzip)', and 'Individual SDF files'. The 'Instance type' section has radio buttons for 'First instance from each PDB entry', 'All instances from each PDB entry' (which is selected), and 'Ideal coordinates from CCD'.
- Filtering options:** Includes checkboxes for 'Include instances with missing heavy atoms', 'Include non-standard polymeric components', 'Exclude instances with alternative conformations', 'Include hydrogen atoms in SDF files', and 'Exclude atom labels from SDF files'.
- Download Button:** A prominent orange 'Download' button is located below the filtering options.
- Footer:** A note at the bottom states: 'Using these options, you may also directly download all ligands, including ligands that are obsolete or not used, or just all the ligands that are currently used in PDB structures.'

Şekil 3.2 Protein Data Bank "Ligand File Download" aracılığıyla üç boyutlu yapısında çinko içeren pdb dosyalarının indirilmesi

Çalışmamızın ligand sorgusu adımı Şekil 3.2 'de gösterildiği gibi üç boyutlu yapısında çinko içeren bütün pdb dosyalarını

<http://www.pdb.org/pdb/download/downloadLigands.do> adresinden indirdik.

Protein Data Bank'ta 05 Mayıs 2014 tarihi itibarıyla yaklaşık 111000 tane üç boyutlu yapısı bilinen protein vardır. Bunlardan yaklaşık 9355 tanesinin üç boyutlu yapısında çinko bulunmaktadır.

Çalışmamızda bir polimer ve tek çinko atomu içeren ve uzunluğu 16 ile 70 amino asit olan proteinler filtre edildi. Filtre sonucunda 301 tane pdb kodu elde edildi. PDB kodlarına ait PDB REST servisinden her bir PDB için ayrıntılı bilgi elde edildi. SDF formatında indirilen verilerden PDB kodu, pdb uzunluğu, organizma adı, polimer sayısı, bağlı olan ligandlar, çinko iyonu sayısı ve sıra numarası verileri elde edilmiştir. Çalışmamızda 301 proteinin 273 tanesinin FoldX yazılımıyla çinko bağlanma afinitesinin hesabı yapılabildi.

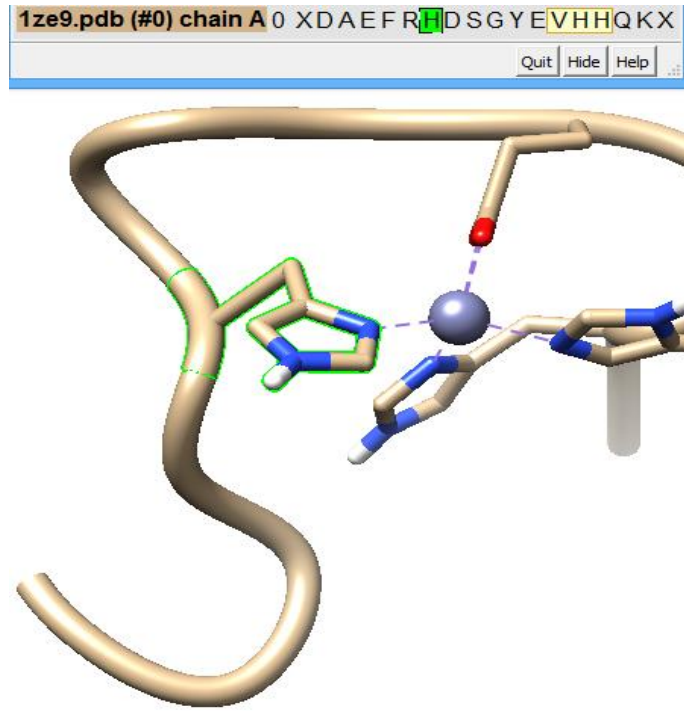
### **3.2 Hesapsal Yöntemlerle Mutantların Belirlenmesi**

PDB dosyaları birbirine çok yakın konformasyonlarda birçok model içermektedir. Bu modeller arasında çalışmamız için ihmal edilebilecek kadar ufak farklılıklar vardır. Bizde çalışmamızda ele aldığımız PDB dosyalarında bulunan birçok modelden her bir pdb dosyası için PyMOL yazılımı aracılığıyla ilk modeli tek başına kayıt ettik.

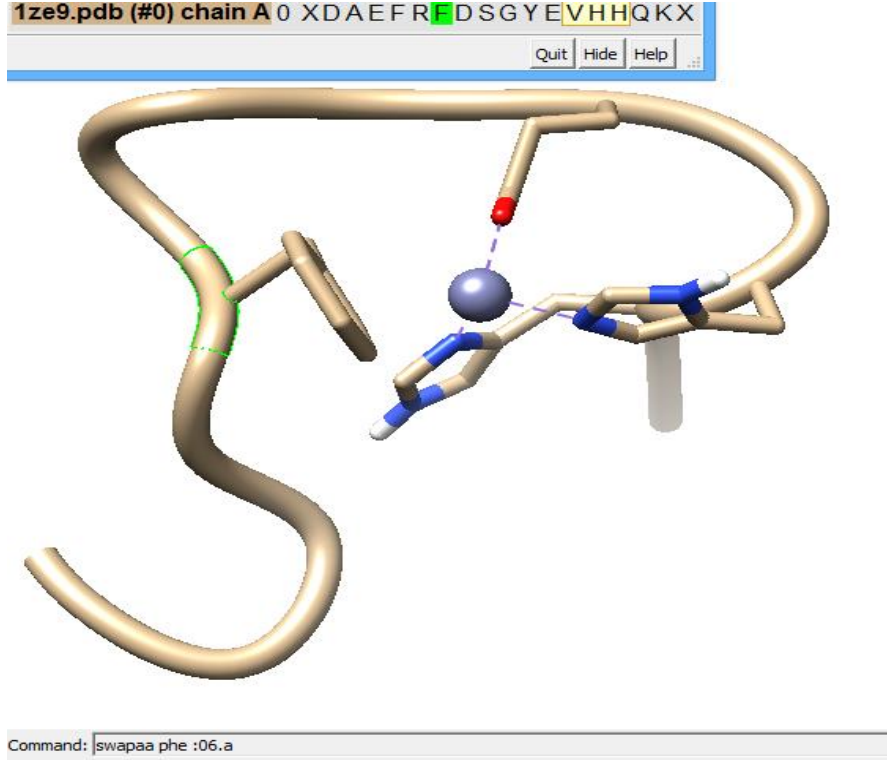
Çalışmamızda çinkoya belirli uzaklıktaki atomun bağlı olduğu amino asidi diğer standart aminoasitlerle değiştirerek çinko bağlanması afinitesi hesaplanmıştır. Bu uzaklık çalışmamızda 5Å<sup>0</sup> olarak belirlenmiştir. PyMOL komutları aracılığıyla her bir pdb dosyasında çinkoya 5Å<sup>0</sup> yakınındaki atomların ait olduğu amino asitlerin ismi ve sırası elde edildi.

Chimera yazılımıyla Şekil 3.3'de gösterildiği gibi pdb dosyaları görüntülenmiştir. Ayrıca Chimera yazılımında "swapaa" komutuyla komut satırından amino asit değişikliğinin nasıl yapıldığı Şekil 3.4 'de gösterilmiştir.

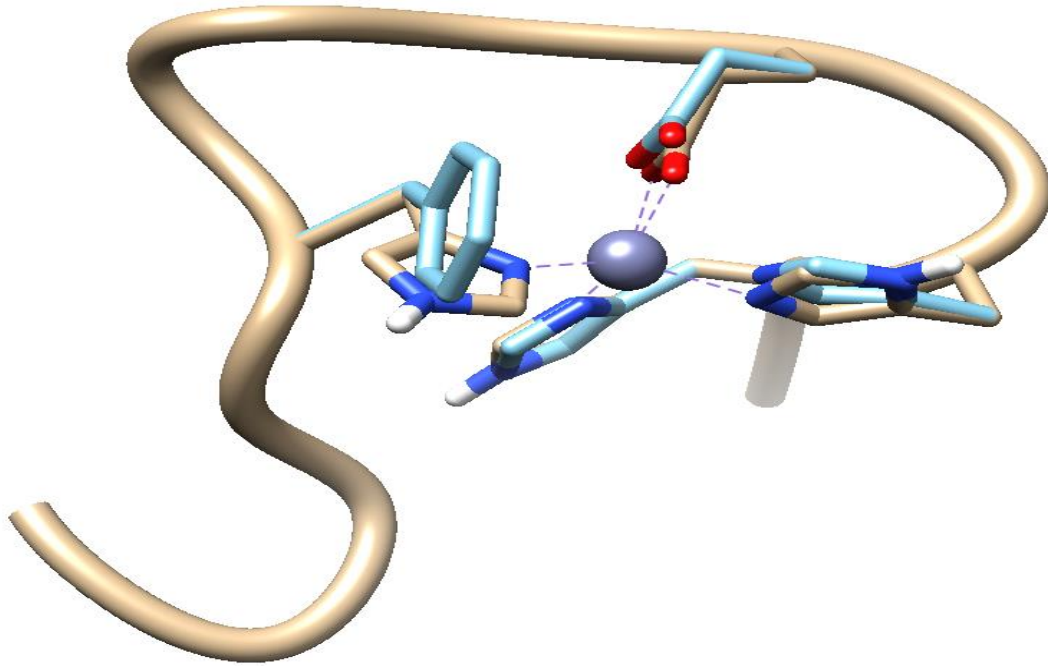
Ayrıca Şekil 3.5 'de Chimera yazılımıyla amino asit değişikliğinden önceki ve sonraki pdb dosyalarının üç boyutlu yapısı arasındaki farklılıklar gösterilmiştir. Buradan sonuçla mutant pdb dosyasının yapısının (açık mavi renkle belirtilmiştir) doğal haldeki pdb dosyasına göre çinkoya bağlanma bölgesinin geometrisinde değişikliklerin gözlemlendiği fakat pdb dosyalarındaki proteinin ana hattında değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 3.3 Chimera yazılımıyla Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 18 amino asitlik bölgesinin görüntüsü



Şekil 3.4 Chimera yazılımıyla Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 18 amino asitlik bölgesinin 6. amino asit olan histidin yerine fenilalaninle Değiştirilmesinin gösterilmiştir



Şekil 3.5 Chimera yazılımıyla Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 18 amino asitlik bölgesinin 6. amino asidi olan histidin yerine fenilalaninle değiştirilmesinden önceki ve sonraki üç boyutlu yapısı (açık mavi aa değişikliğinden sonraki hali )

PyMOL komutlarıyla belirlenen her bir amino asit Chimera yazılımının “swapaa” komutuyla 20 standart aminoasidin her biriyle otomatik olarak değiştirildi ve yeni proteinler pdb formatında kaydedildi. Chimera yazılımında “swapaa” komutuyla amino asit değişikliği varsayılan olarak tanımlanan Dunbrack Kütüphanesi kullanılmıştır.

### 3.3 Mutantların Metal Bağlanma Afinitelerinin ve Stabilitelerinin Hesabı

Çalışmamızın bu adımında Chimera programıyla elde ettiğimiz mutant pdb dosyalarının amino asit değişikliğinden sonraki yapısı hesaplandı. Amino asit değişikliğinden sonraki yapıyı hesaplamak için FoldX yazılımının 3.0 beta6 sürümünün “<RepairPDB>” komutu kullanıldı ve runrepair adlı komut dosyası oluşturuldu Şekil 3.6 ‘da gösterildiği gibi komutlar çalıştırıldı. Her bir mutant pdb dosyası için amino asit değişikliğinden sonraki üç boyutlu yapısının hesabı yapıldı.

```
*****
***                               ***
***           FoldX 3.0 Beta 6 (c)           ***
***                               ***
***       code by the FoldX consortium       ***
***                               ***
***       Jesper Borg, Frederic Rousseau     ***
***       Joost Schymkowitz, Luis Serrano   ***
***       and Francois Stricher            ***
*** and any other of the 5! permutations ***
*** based on an original concept by       ***
*** Raphael Guerois and Luis Serrano     ***
*****

Make a choice by entering a number.
1 - Single Run
2 - Batch Run
3 - Run File
4 - Default Single
5 - Default Batch
9 - end
: 3

enter a valid runfile > runrepair.txt_
```

Şekil 3.6 FoldX yazılımının 3.0 beta6 sürümüyle mutant dosyalarının aminoasit değişikliğinden sonraki yapısının hesabı

Amino asit değişikliğinden sonraki yapısı hesaplanmış mutant dosyalarının FoldX yazılımının 2.5.2 sürümünde "<Stability>" komutunu içeren runstability dosyasını oluşturuldu, Şekil 3.7 gösterildiği gibi komutlar çalıştırıldı ve stabilite hesabı yapıldı. FoldX yazılımının sitesinde de yer alan uyarılardan ve yaptığımız denemelerden yola çıkarak stabilite ve metal bağlanma afinitelerinin hesabı için daha anlamlı sonuçlar elde ettiğimiz FoldX yazılımının 3.0 beta6 sürümüne göre bir önceki sürümü olan FoldX yazılımının 2.5.2 sürümünü tercih ettik.

FoldX yazılımının 2.5.2 sürümünde "<MetalBindingEnergy>" komutunu içeren runaffinity dosyası oluşturuldu ve Şekil 3.8 görüldüğü üzere komutlar çalıştırıldı. Her bir pdb dosyasının doğal hali ve RepairPDB komutu işleminden sonraki bütün mutant dosyaları için afinite hesabı yapıldı.

Her bir mutant pdb dosyası için stabilite ve afinite değerleri birleştirildi. Gnuplot yazılımı ile Stabilite-Afinite grafikleri elde edildi. Gnuplot istatistiksel komutları yardımıyla trend çizgisi hesaplandı. Stabilite ve afinite arasındaki ilişkiyi göstermek için korelasyon katsayısı (r) hesaplandı. Korelasyon katsayısı aşağıdaki (3.1) denkleminde hesaplanmıştır. Korelasyon iki değişken arasındaki ilişkinin ifadesine denir. Korelasyon katsayısı iki değişkenin değişimlerde ne dereceye kadar uygunluk olduğunu belirler. Korelasyon katsayısı iki değişken arasındaki doğrusal ilişkinin gücünü göstermektedir.

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(n - 1)s_x s_y} \quad (3.1)$$

Çinko atomunun erişebilirliğini gözlemek amacıyla PyMOL komutları ile çinko atomuna 5Å<sup>0</sup> uzaklıktan 6 yönden görüntüler alındı.

Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 18 amino asitlik bölgesi için AutoDock Vina yazılımı kullanılarak FoldX ile elde edilen sonuçların doğruluğu kontrol edildi. Autodock Vina'nın hazır komutları aracılığıyla "redocking" yöntemi uygulandı ve çinko afinitesi hesaplandı [95]. FoldX ile AutoDock Vina çıktılarının uyumlu olduğu gözlemlendi.

```

*****
***                               ***
***           FoldX 5.0 (c)       ***
***                               ***
***   code by the FoldX consortium ***
***   @EMBL-Heidelberg.de       ***
***                               ***
***   Jesper Borg, Joost Schymkowitz, ***
***   Frederic Rousseau, Raphael Guerois ***
***   Francois Stricher          ***
***   Jens Nielsen, Luis Serrano ... ***
***   and any other of the 7! permutations ***
*****

Make a choice by entering a number.
1 - Single Run
2 - Batch Run
3 - Run File
4 - Default Single
5 - Default Batch
9 - end
: 3

enter a valid runfile > runstability.txt

```

Şekil 3.7 FoldX yazılımının 2.5.2 sürümüyle mutant dosyalarının aminoasit değişikliğinden sonraki yapısının stabilite hesabı

```

*****
***                               ***
***           FoldX 5.0 (c)       ***
***                               ***
***   code by the FoldX consortium ***
***   @EMBL-Heidelberg.de       ***
***                               ***
***   Jesper Borg, Joost Schymkowitz, ***
***   Frederic Rousseau, Raphael Guerois ***
***   Francois Stricher          ***
***   Jens Nielsen, Luis Serrano ... ***
***   and any other of the 7! permutations ***
*****

Make a choice by entering a number.
1 - Single Run
2 - Batch Run
3 - Run File
4 - Default Single
5 - Default Batch
9 - end
: 3

enter a valid runfile > runaffinity.txt_

```

Şekil 3.8 FoldX yazılımının 2.5.2 sürümüyle mutant dosyalarının aminoasit değişikliğinden sonraki yapısının afinite hesabı

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Tezimizde, üç boyutlu yapısında çinko bulunan materyal ve metotlarda ayrıntılı bir şekilde belirtilen filtre sonucunda onaltı amino asitten uzun yetmiş amino asitten kısa, tek çinko iyonu içeren ve yapısında bir polimer bulunan pdb dosyaları PDB'den elde edildi. Bu filtre sonucunda çalışmamızda 273 pdb dosyası incelenmiştir. Ele aldığımız 273 tane pdb dosyasındaki çinko iyonun 5A<sup>0</sup> civarındaki atomların bağlı buldukları amino asitler tespit edilip Chimera programı aracılığıyla varsayılan olarak kullanılan Dunbrack kütüphanesindeki 20 standart amino asitlerle değiştirip kaydedilmiştir. Elde edilen 50982 mutant pdb dosyasının FoldX programıyla amino asit değişikliğinden sonraki yapısı hesaplanmıştır. Amino asit değişikliğinden sonraki üç boyutlu yapısı hesaplanan mutant pdb dosyalarının ve doğal haldeki pdb dosyaları için çinko bağlanma afinitesi ve stabilite hesabı yapılmıştır. Afinite ve stabilite değişimlerini gösteren 273 tane grafik elde edilmiştir. Çalışmamızda bu grafiklerin tamamından ziyade 30 tane pdb dosyasının sonuçlarına yer verilmiştir.

273 tane grafiğin çoğunluğunda ortak bir karakteristik gözlemlenmektedir. Afinite ve stabilite değerleri arasındaki ilişkiyi ifade etmek için korelasyon katsayısı hesaplandı. Mutant dosyalarının tamamına yakınında stabilite değeri azaldıkça (kararlılık arttıkça) afinite değerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu grafiklerde genellikle; doğal hal (kırmızıyla belirlenmiş) stabilite ve afinite bakımından mutantların medyanında olduğu gözlemlenmektedir. Ayrıca grafiklerde yeşil renkle belirtilmiş mutant pdb dosyaları arasındaki stabilite ve afinite farklarının amino asidin sırası ve amino aside göre değiştiği gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler birçok kimyasal, fiziksel ve biyolojik yaklaşımlarla açıklanabilir.

Grafiklerde kcal/mol cinsinden verilen afinite ve stablitede değerleri Bağlanma katsayısına ( $K_d$ ) evrildiğinde logaritmik olarak 10'un katları Őeklinde ifade edildiğinden pdb dosyalarının afinite değerleri arasındaki farklılıklar daha belirginleŐir. Bundan dolayı grafiklerdeki kck değişiklikler bile deneysel olarak ayırt edilebilir.

Çalışmamızda c boyutu yapısı bilinen ve c boyutlu yapısında çinko bulunan proteinler incelenmiştir. İlerleyen çalışmalarda c boyutlu yapısı bilinen fakat c boyutlu yapısında çinko bulunmayan proteinler için "FEATURE metal scanning" web tabanlı servisi kullanılıp çinko iyonunun konumu belirlenebilir.

c boyutlu yapısı bilinmeyen aşağıdaki GO terimleriyle ve çinkoyla ilgili proteinlerin de c boyutlu yapısı "Homology modeling" yöntemiyle belirlenip ardından çinko bağlanma afinitesi ve proteinin stabilitesi hesabı yapılabilir.

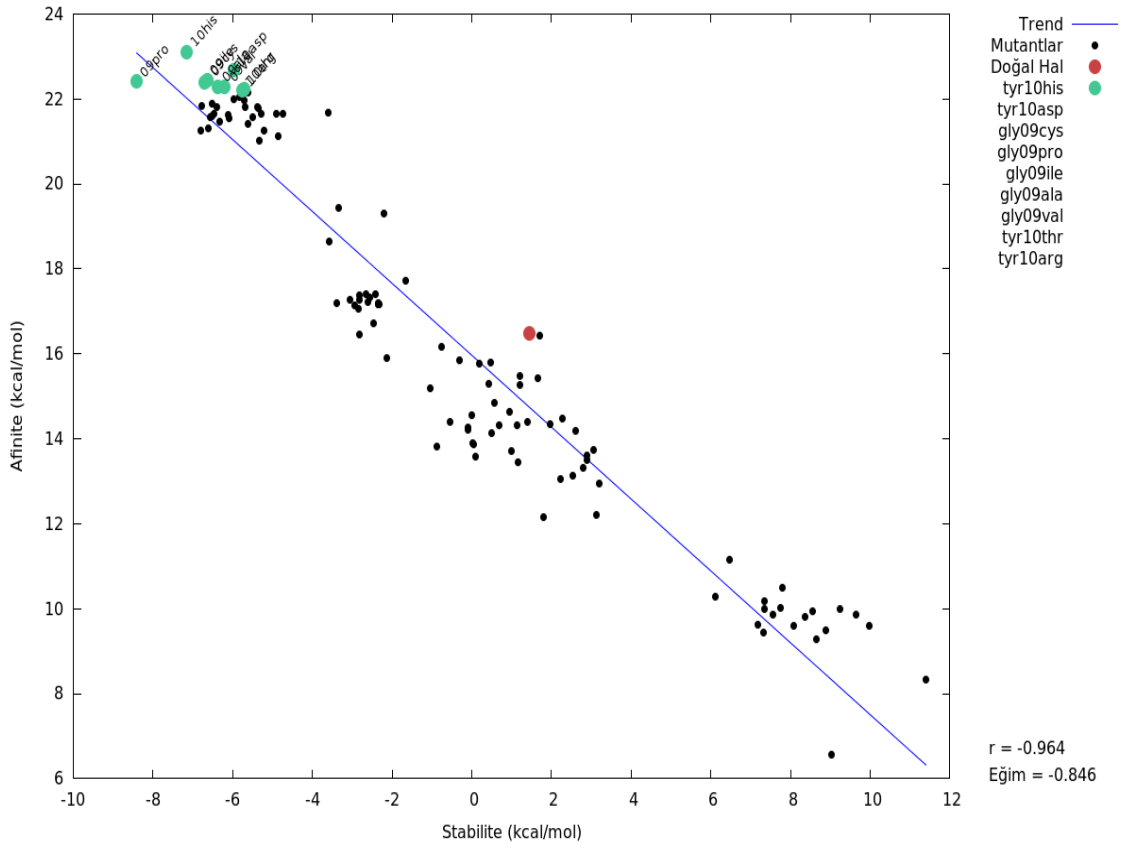
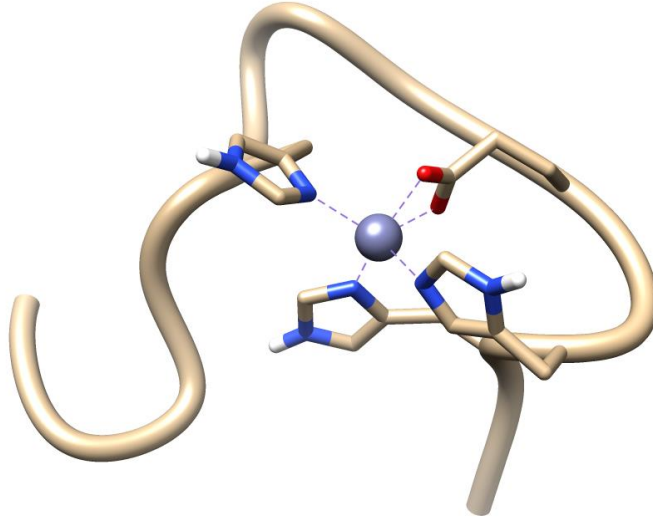
- GO0006829 inko iyonu taşıyanlar,
- GO0008270 inko iyonu bağlananlar,
- GO0055069 inko iyonu homeostazisi,
- GO0061088 inko iyonu birikimini düzenleyenleri
- GO0071294 çinkoya hücre sel tepkisinde rol alanlar.

#### 4.1 Belirlenen Proteinlerin Çinko Bağlanma Afinitesi ve Stabilite Grafikleri

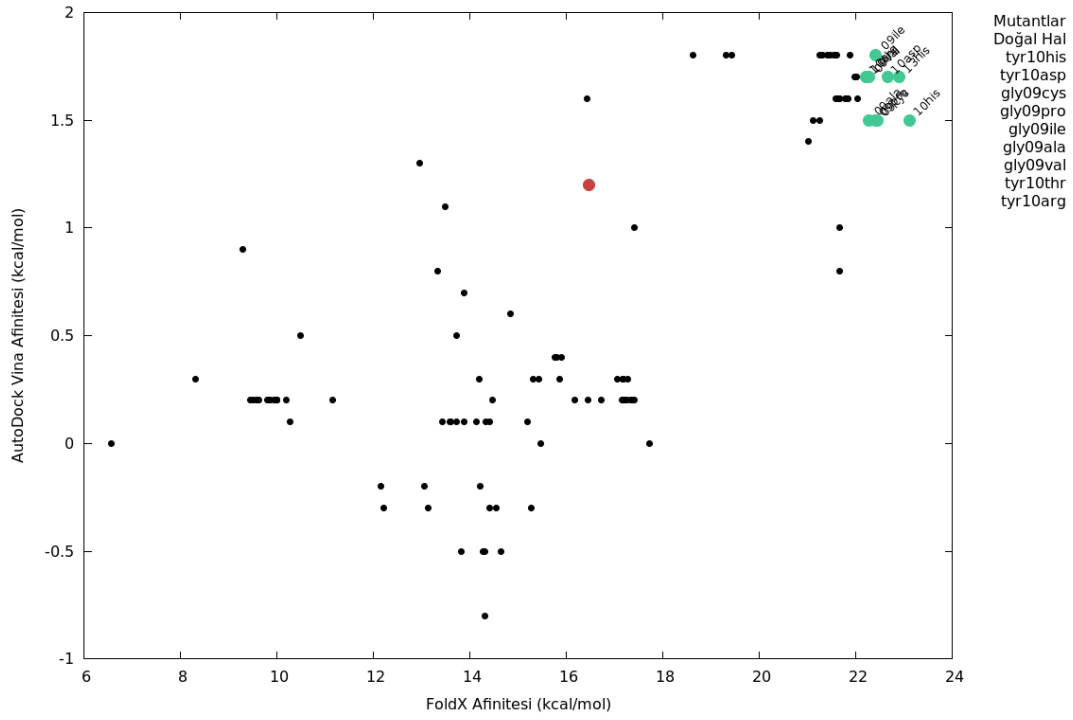
FodX yazılımıyla çinko bağlanma afinitesi ve stabilitelerinin hesaplandığı 273 tane proteinin afinite ve stabilite grafiklerinin ortalama korelasyon katsayısı -0.892 olarak hesaplanmıştır. Bizimde çalışmamızda yer verdiğimiz Şekil 4.1-4.29 afinite ve stabilite grafikleri ortalama korelasyon katsayısına yakın grafiklerdir. Bu grafiklerde afinite ve stabilite birbirine benzer bir ilişki gözlemlenmiştir. Bundan dolayı bu bölümde korelasyon katsayısı bakımından ortalama korelasyon katsayısına yakın Şekil 4.1-4.29 yer verilmiştir. Ortalama korelasyon katsayısından farklı olan afinite ve stabilite grafiklerine Şekil 4.30-4.31'de yer verilmiştir.

Korelasyon katsayısına göre çalışmamızda yer verdiğimiz 30 adet proteinin doğal hali ve mutantların stabilite ve çinko bağlanma afinitesi değerlerini içeren grafikleri üç farklı kategori altında topladık. Bunlardan birincisi; korelasyonu yüksek ve afinite bakımından ayırt edilebilen uygun adayları içeren grafiklerdir, bunlara Şekil 4.1, 4.3, 4.4, 4.7, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.14,4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.24, 4.27, 4.28 örnek olarak gösterilebilir. İkinci kategori ise; korelasyonu yüksek ve afinite bakımından farklılıkları ayırt edilemeyen adayları içeren grafiklerdir, bunlara Şekil 4.5, 4.6, 4.8, 4.15, 4.16, 4.17, 4.22, 4.23, 4.25, 4.26 örnek olarak gösterilebilir. Üçüncü kategori ise korelasyonu düşük olan grafiklerdir bunlara örnek olarak Şekil 4.30, 4.31 örnek olarak gösterilebilir.

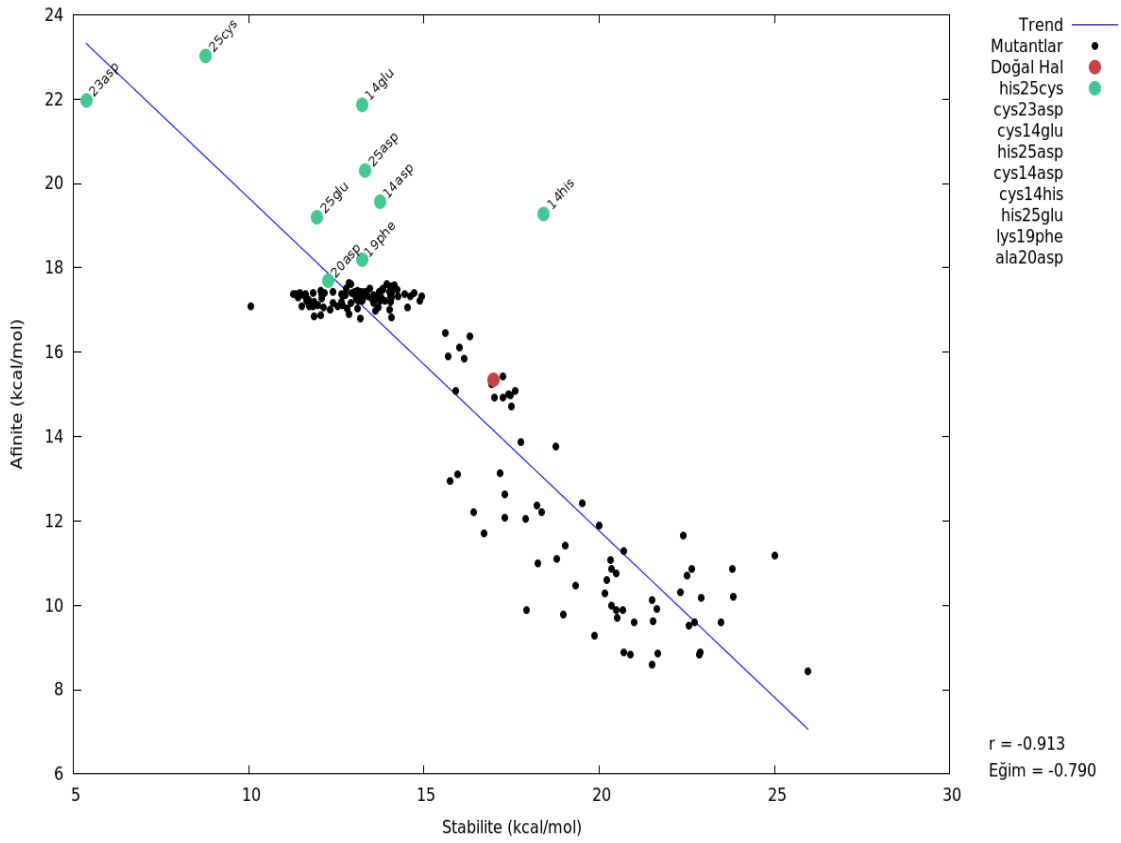
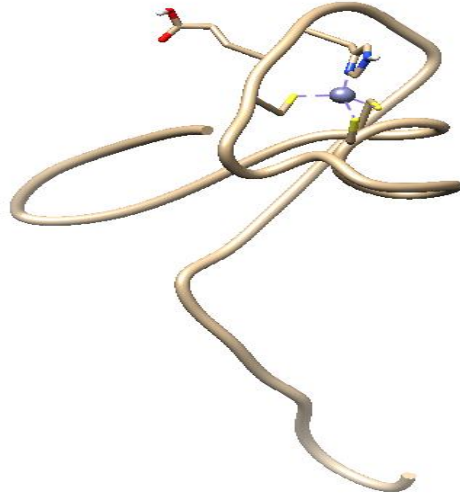
Şekil 4.1-4.31 grafiklerde kırmızı noktayla gösterilenler proteinlerin doğal halidir. Yeşil renkte gösterilenler ise sayısal değer olarak afinitesi artmış stabilitesi ise azalmış (daha kararlı) on tane mutant pdb dosyasını göstermektedir. Siyah renktekiler ise geriye kalan mutant pdb dosyalarını göstermektedir.



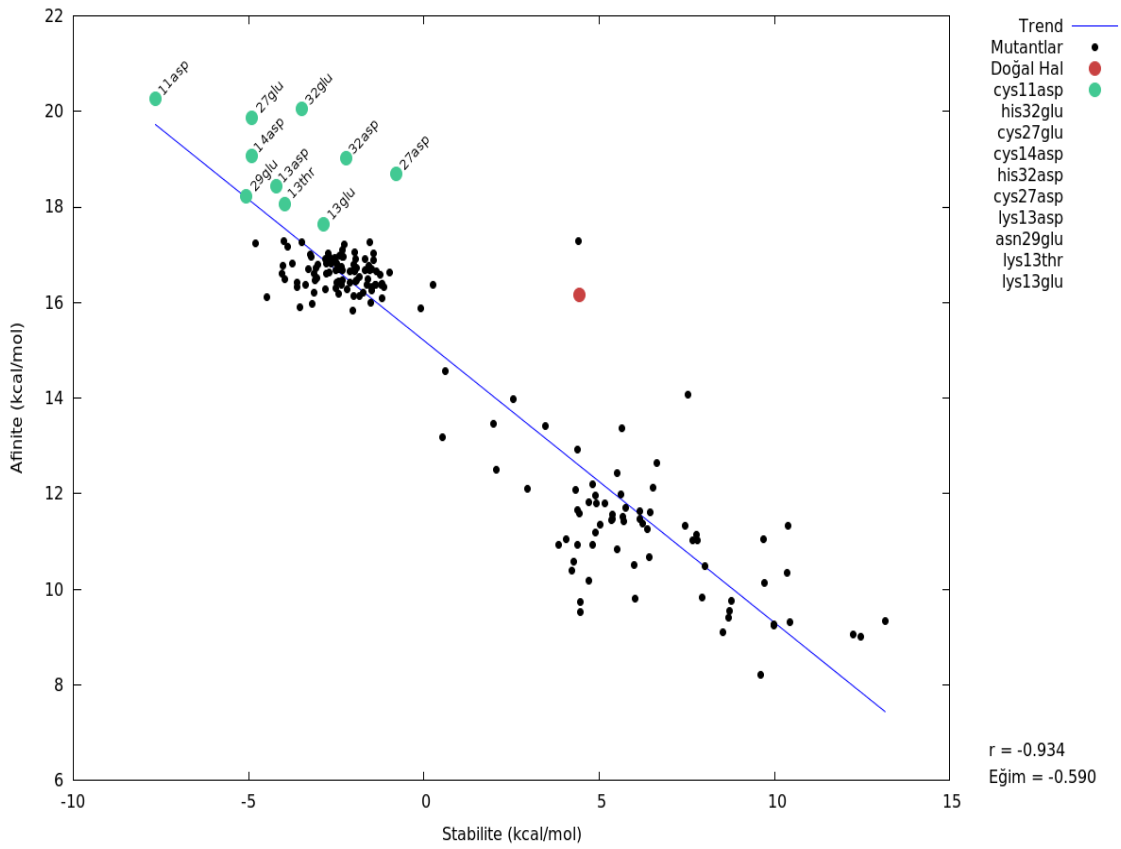
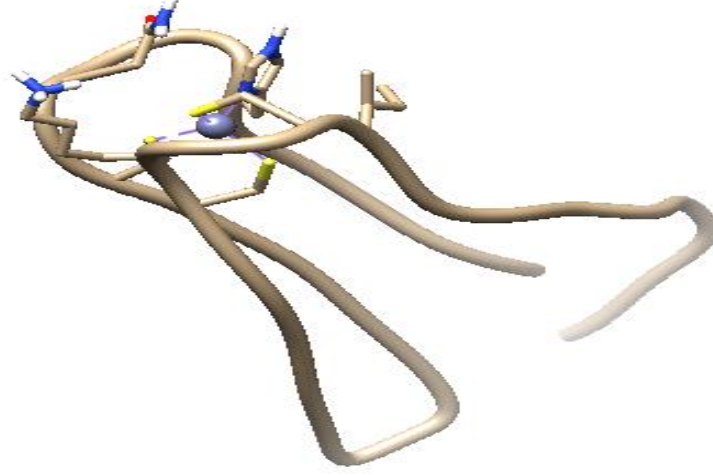
Şekil 4.1 Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (18 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



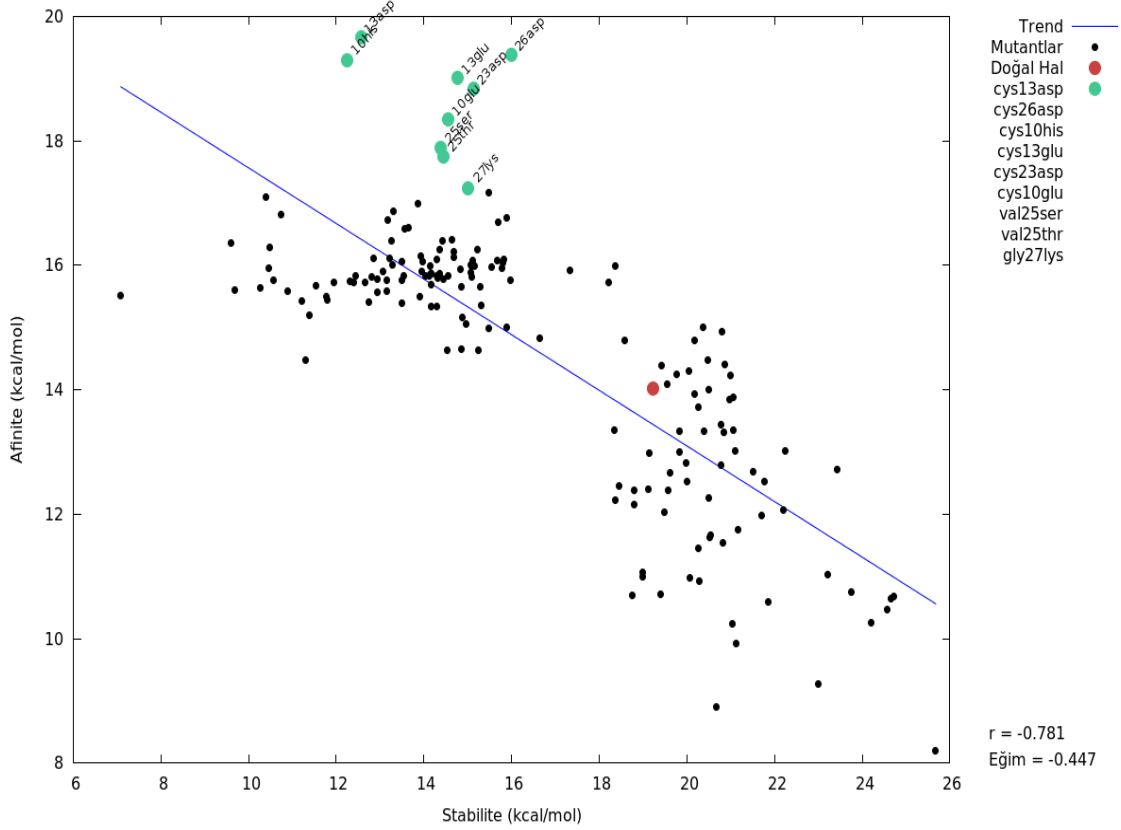
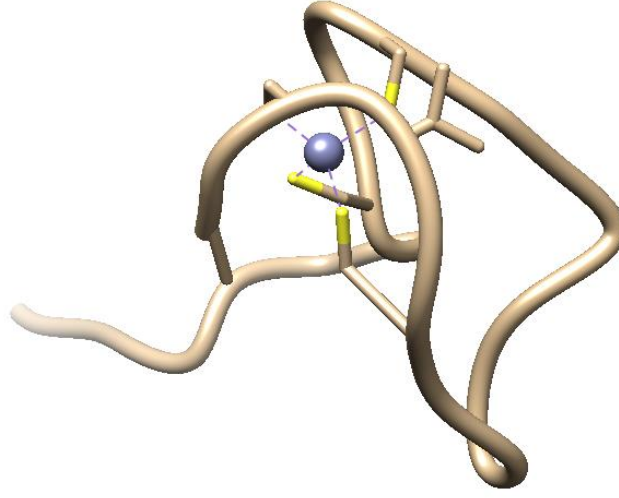
Şekil 4.2 Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin (18 amino asitlik bölgesi) doğal hali ve mutantlarının Autodock Vina ve FoldX yazılımlarıyla elde edilen çinko bağlanma afinitelerinin grafiği



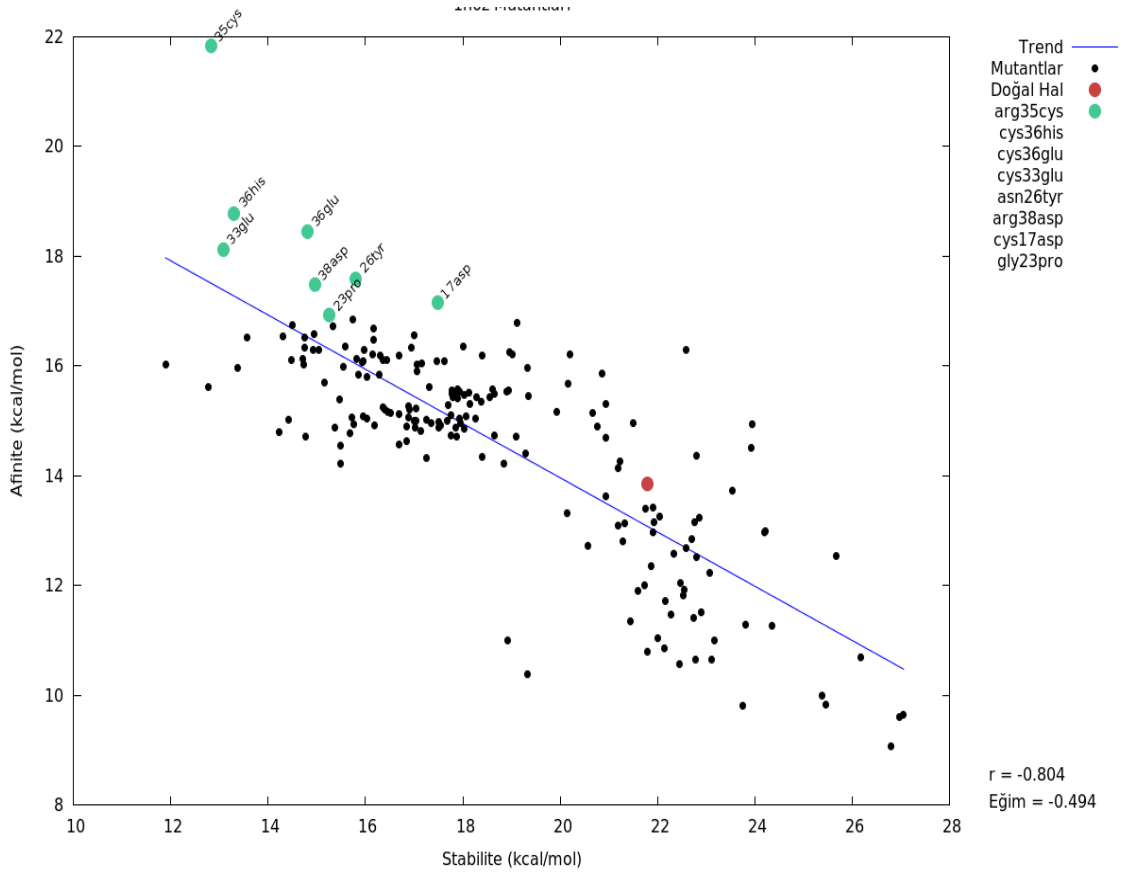
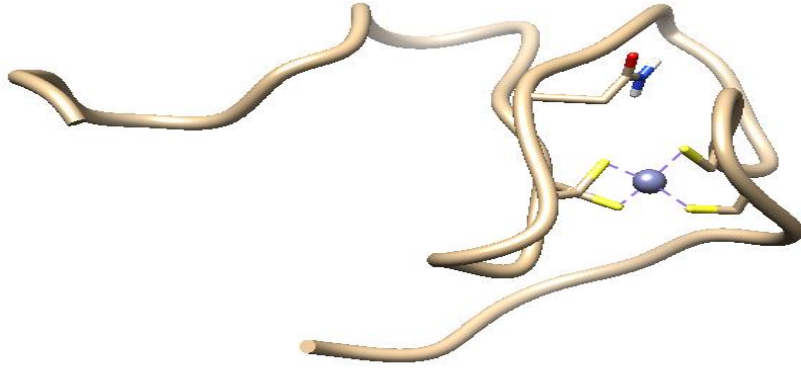
Şekil 4.3 Metalotiyonein 1 aktivatörü (bakırdan etkilenen transkripsiyon faktörünün çinko domaini) proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (42 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



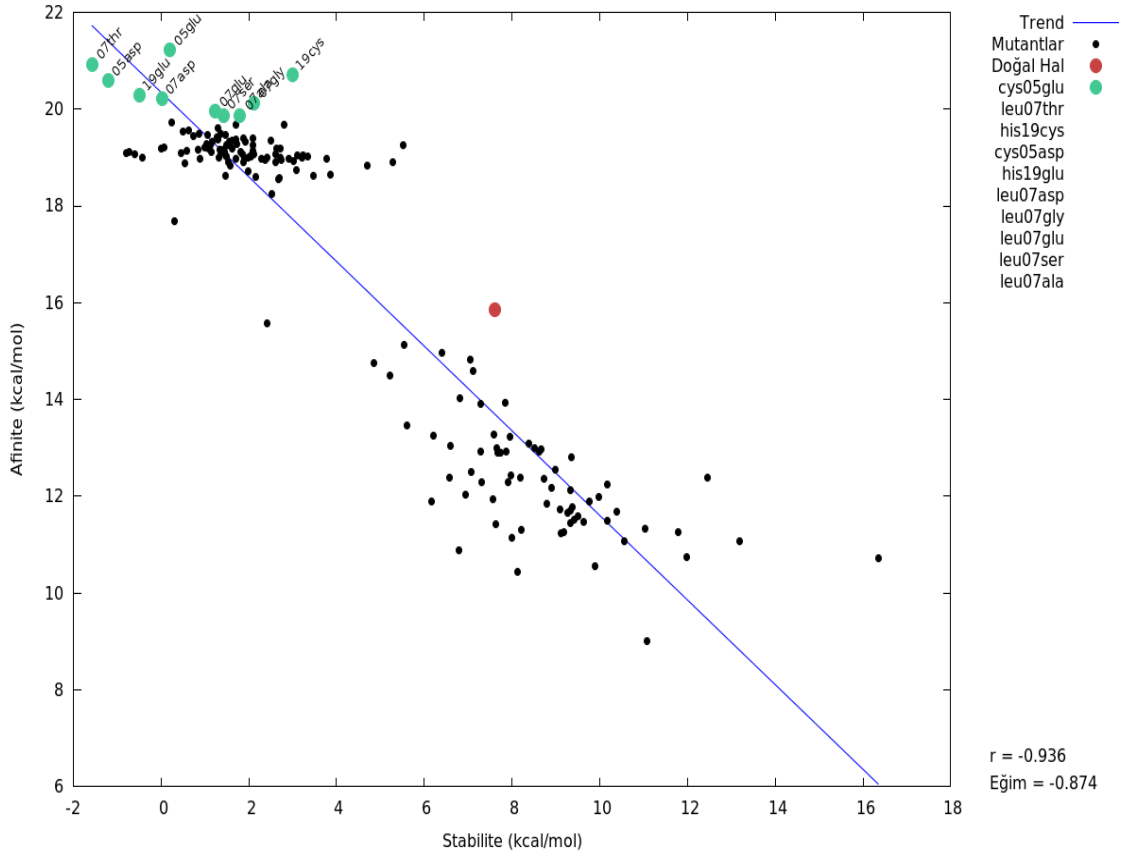
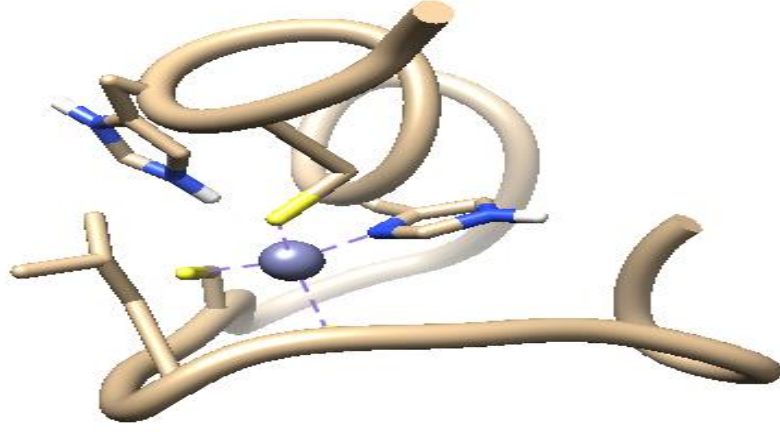
Şekil 4.4 *Thermus Thermophilus*'den elde edilen L36 ribozomal proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (37 amino asitlik bölgesinin NMR yapısı) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



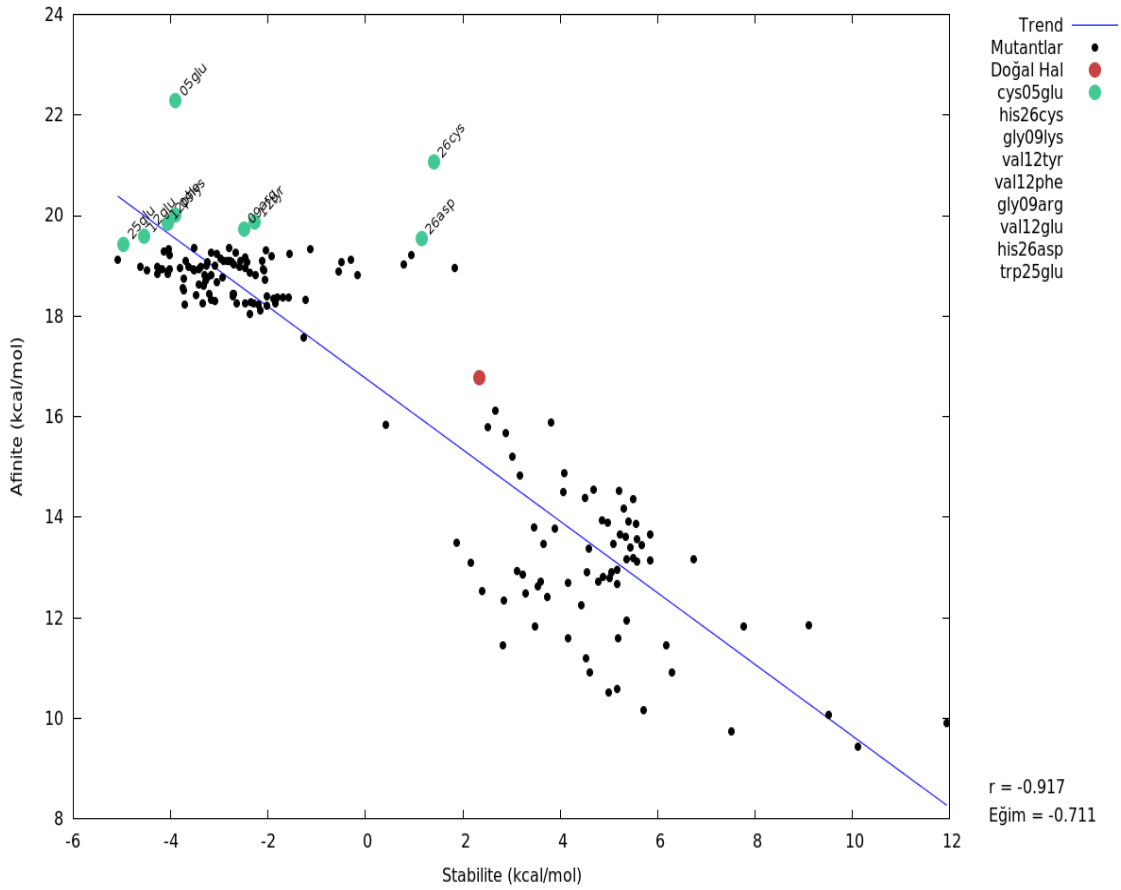
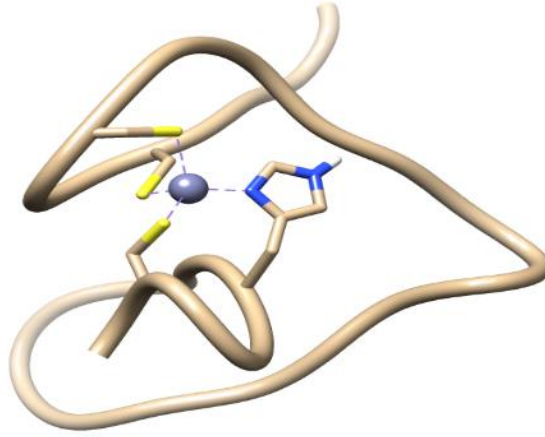
Şekil 4.5 Methionyl-tRNA synthetase (metiyonil -trna sentetaz) proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (28 amino asitlik bölgesinin) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



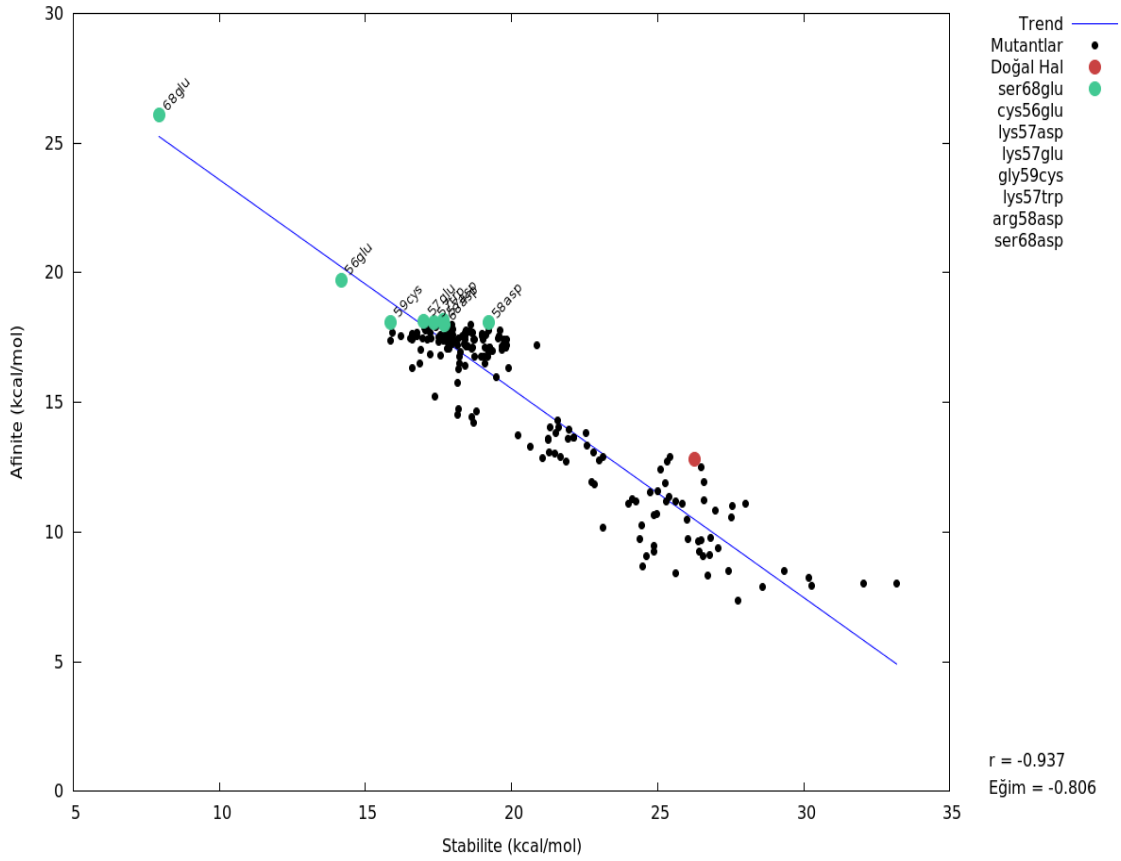
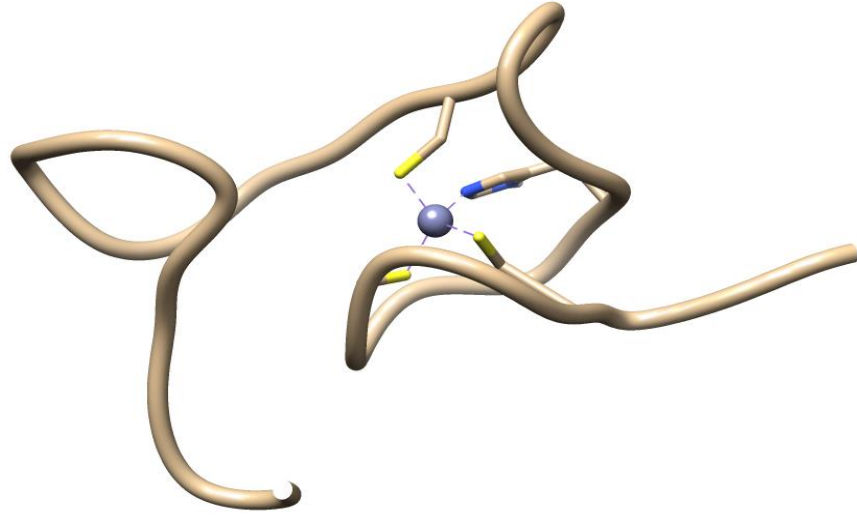
Şekil 4.6 ZNF265 adlı proteinin çinko parmak domaininin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (45 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



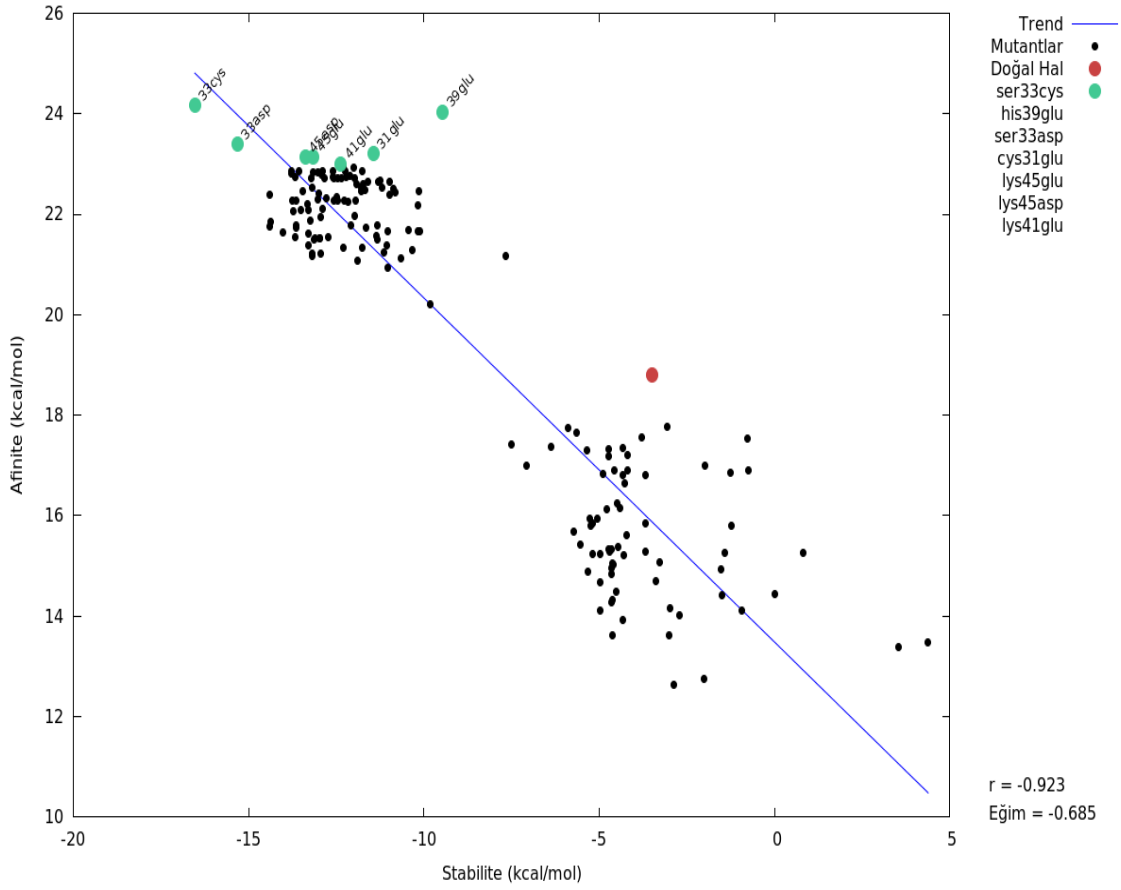
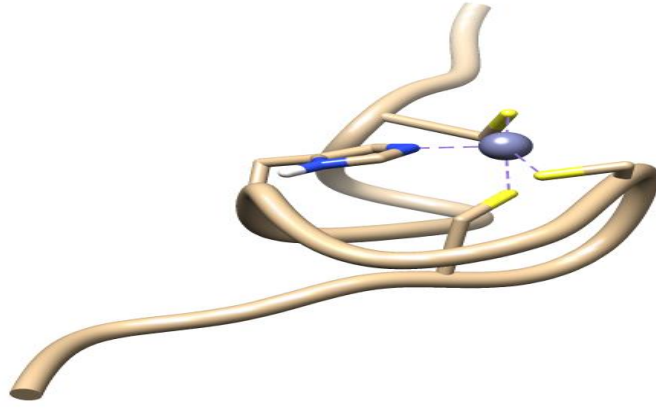
Şekil 4.7 CREB bağlayıcı proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (25 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



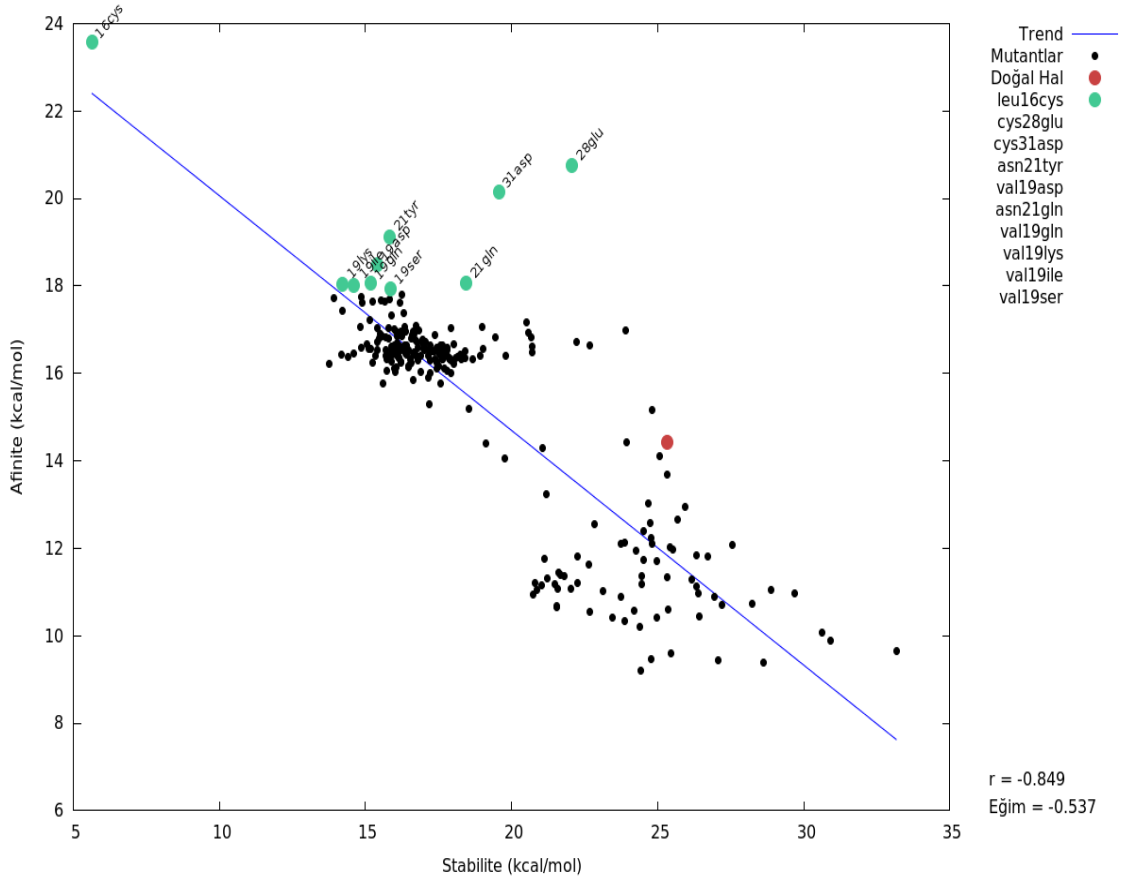
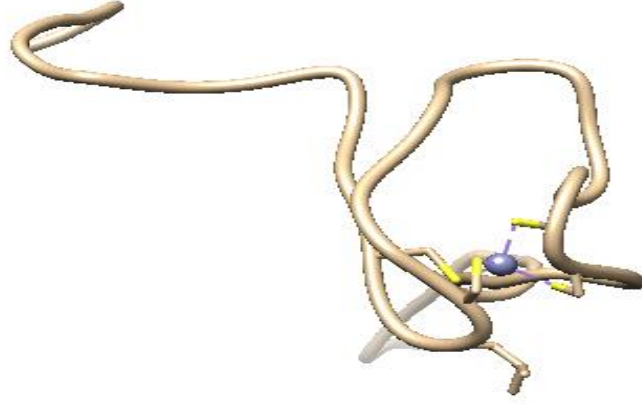
Şekil 4.8 LASP-1 proteininin amino ucundaki LIM domainin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (31 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



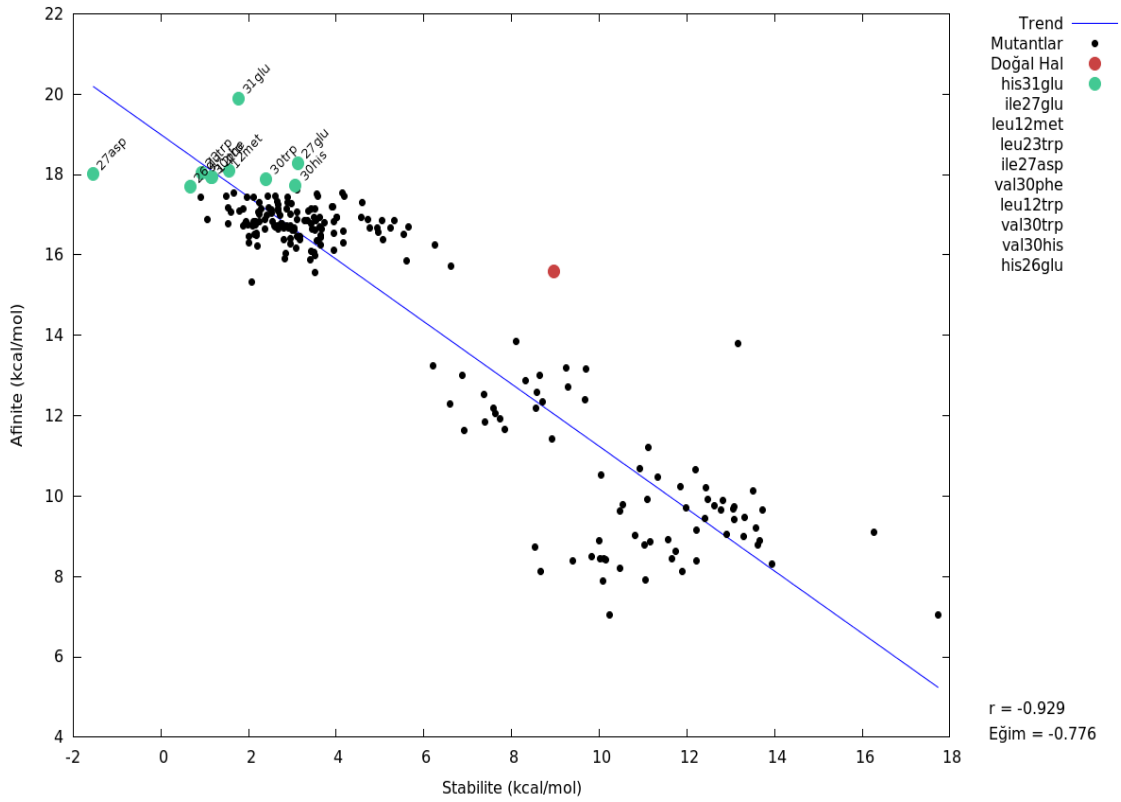
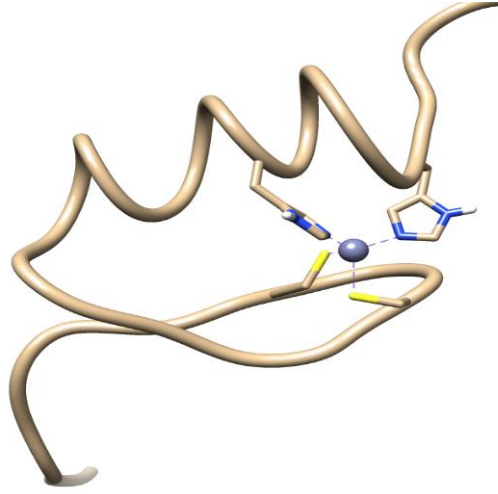
Şekil 4.9 Mason-Pfizer maymun virüsünün (MPMV) Gag proteininden nükleokapsit kesitinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (60 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



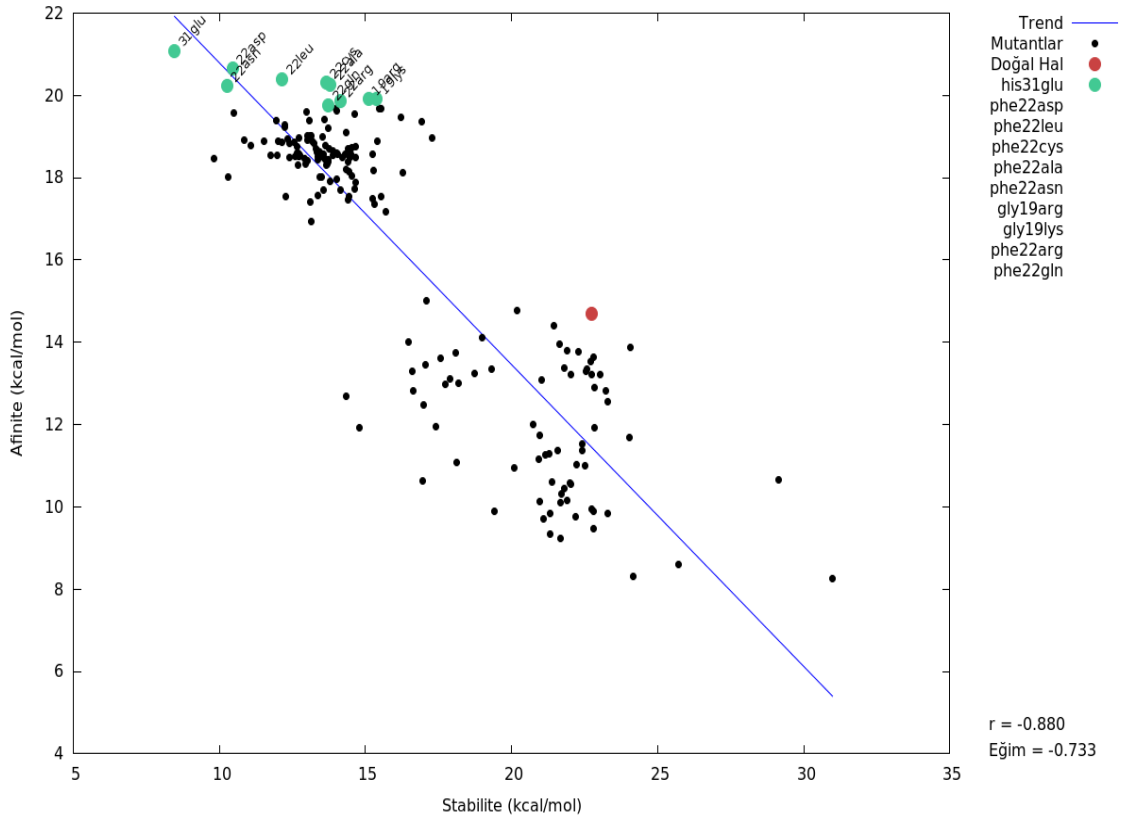
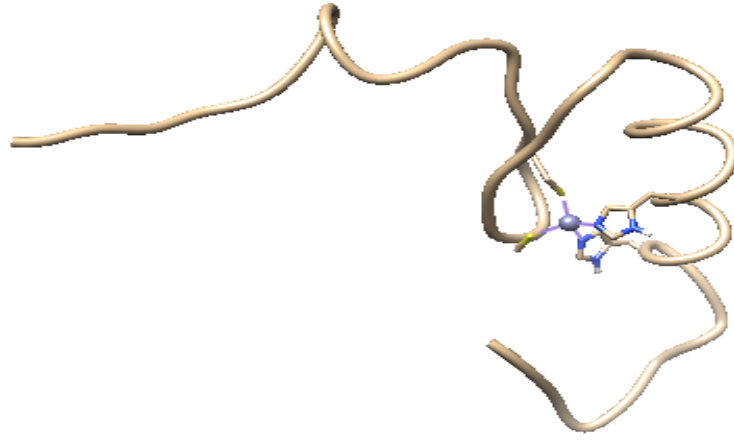
Şekil 4.10 MMTV virüsü nükleokapsit proteininin P14 (birinci çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (21 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



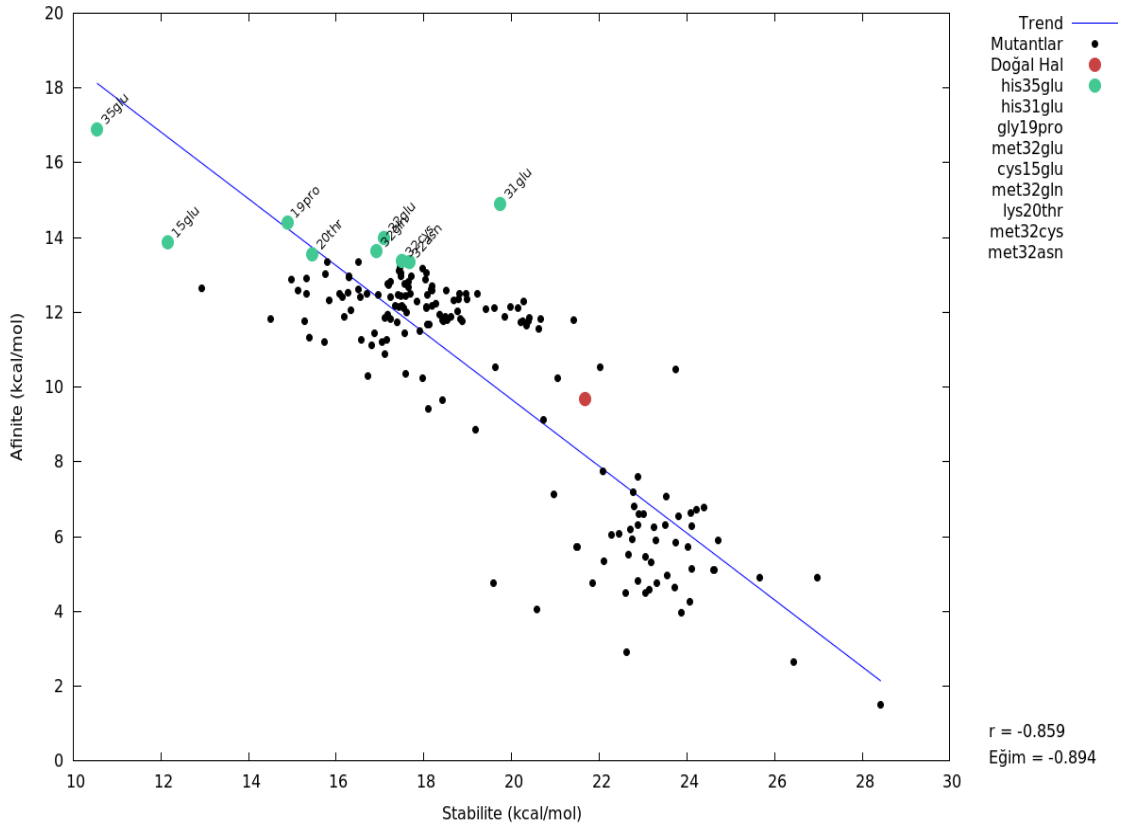
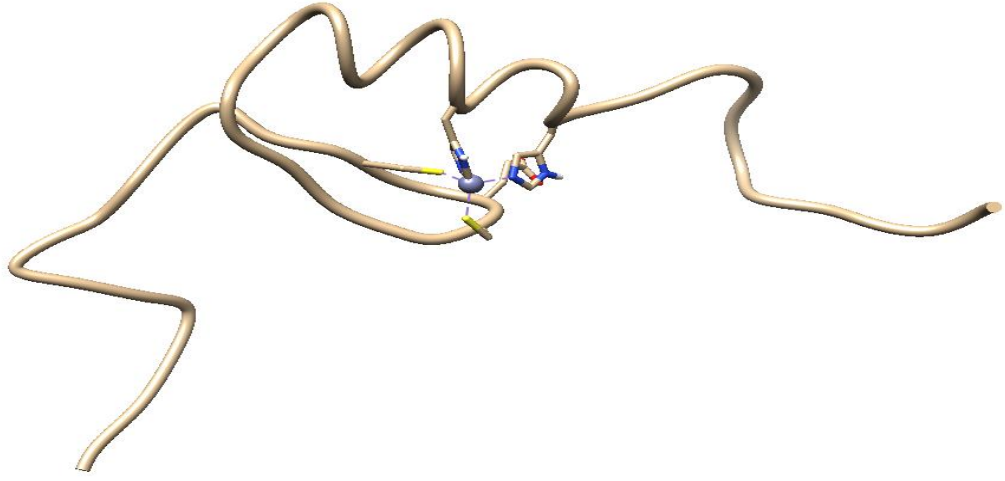
Şekil 4.11 Hücre çekirdeği gözenek proteini NUP153 (dördüncü çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (47 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



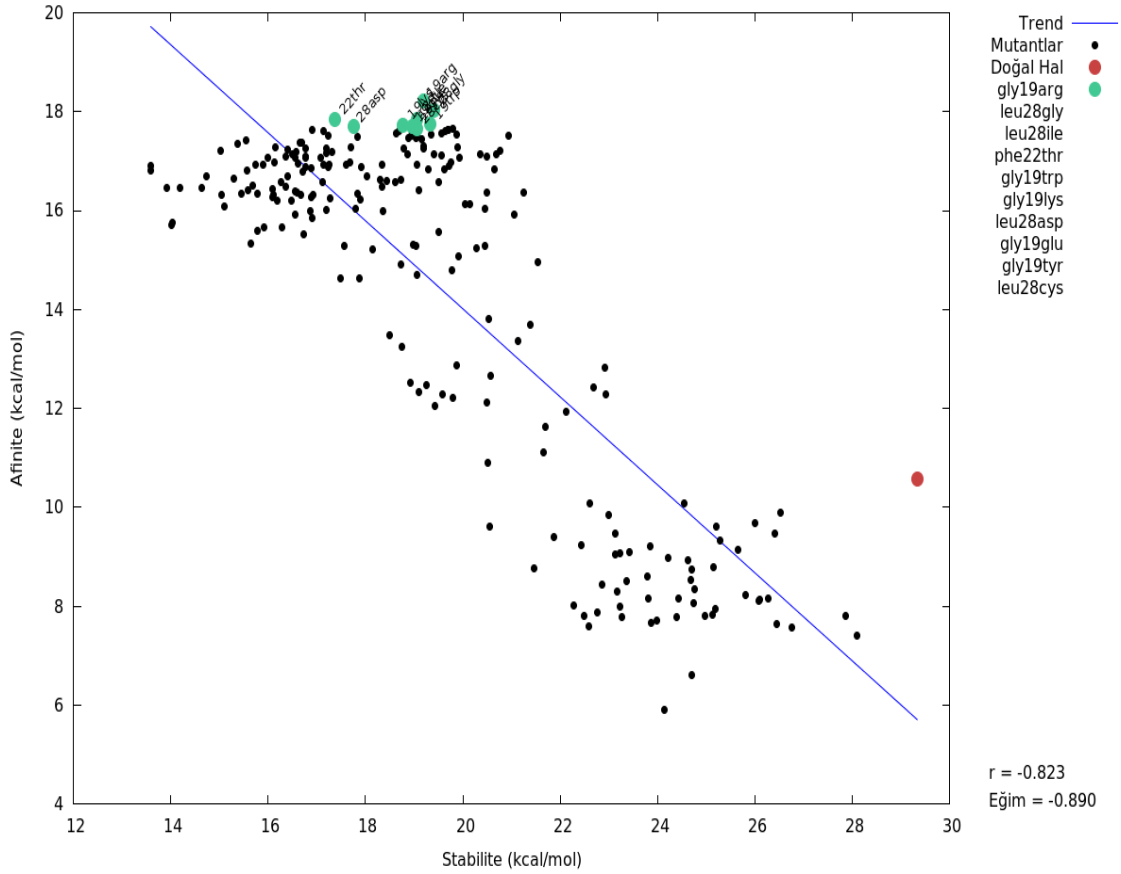
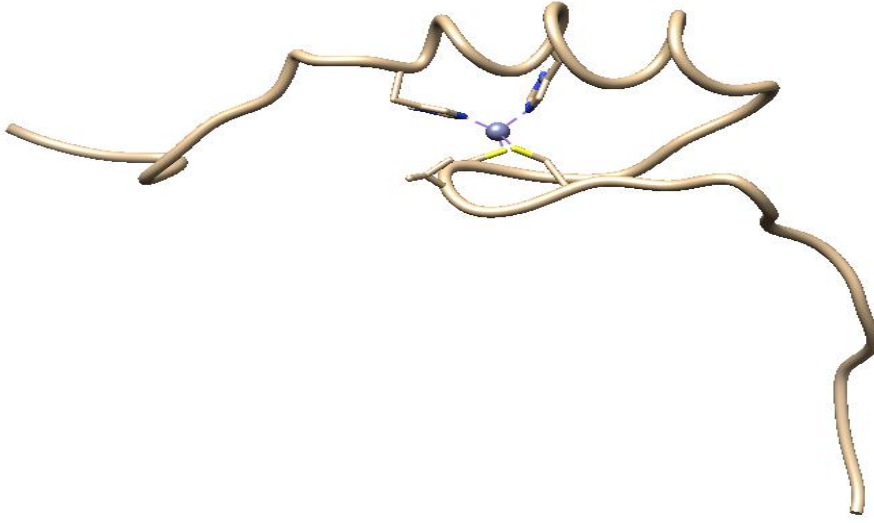
Şekil 4.12 Çinko parmak proteini 406 (Sekizinci C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (35 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



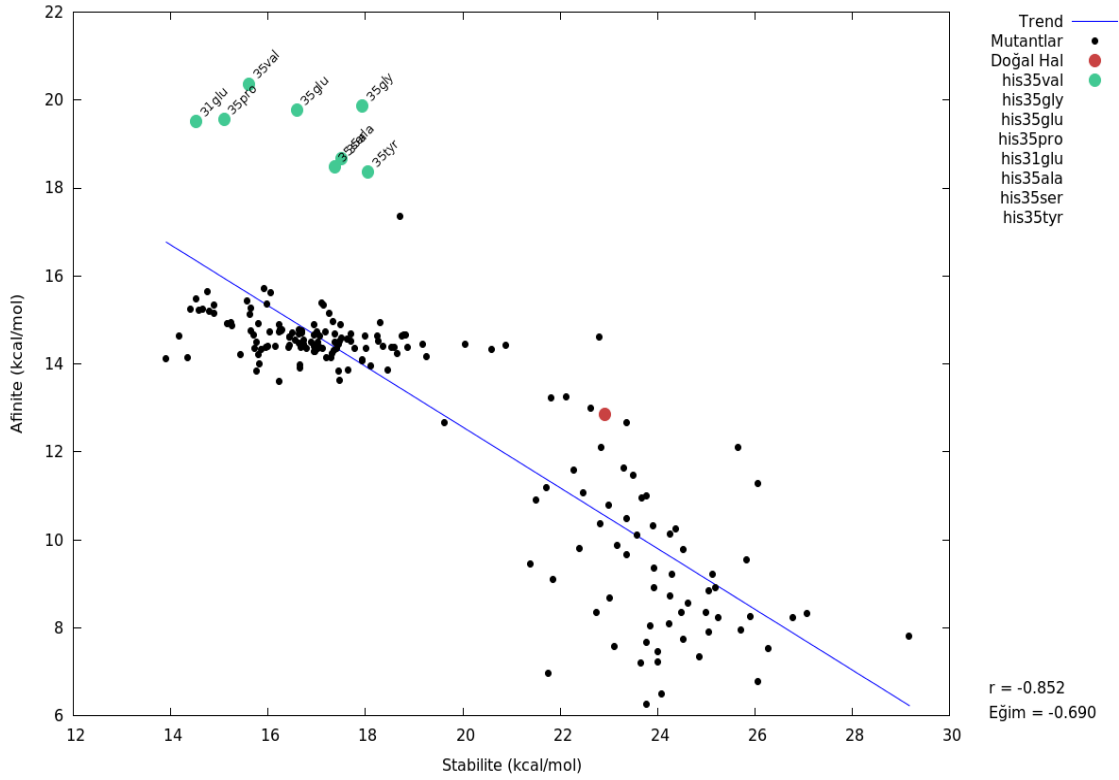
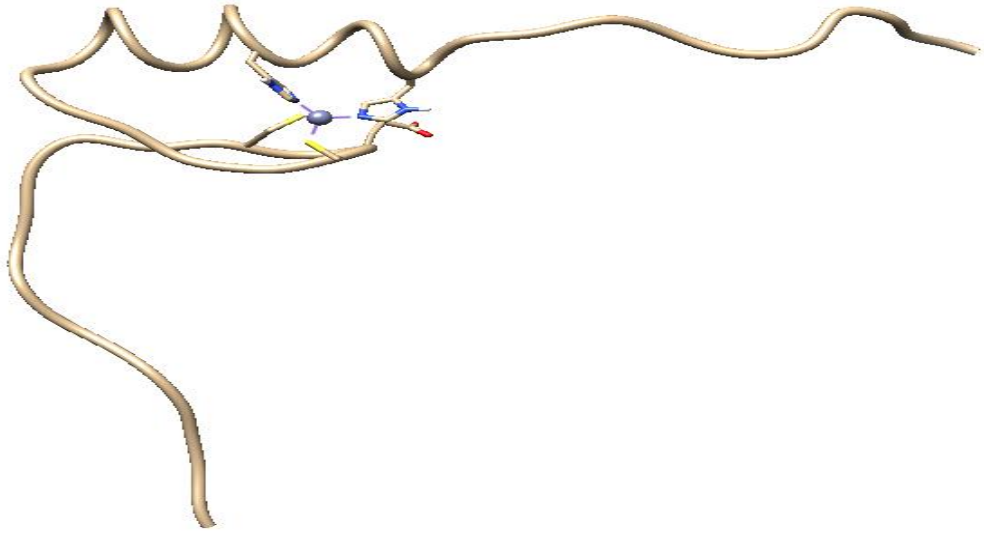
Şekil 4.13 Çinko parmak proteini 347 (C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (46 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



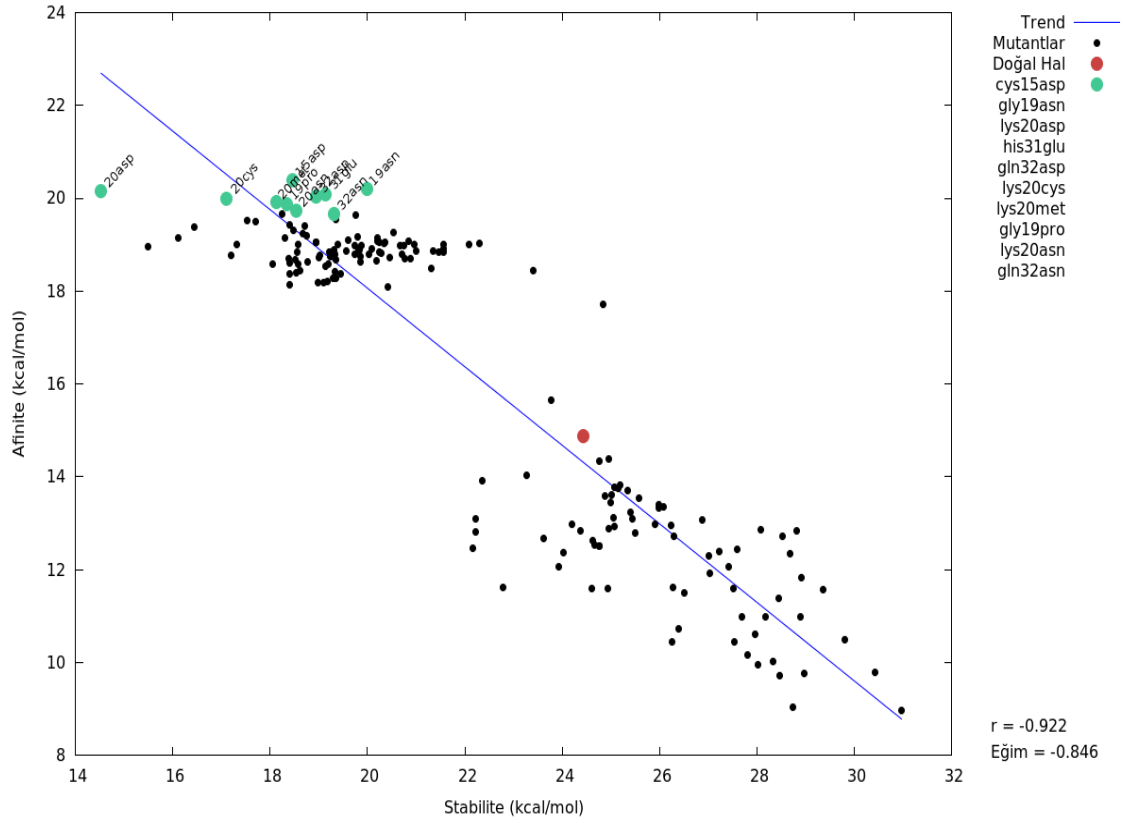
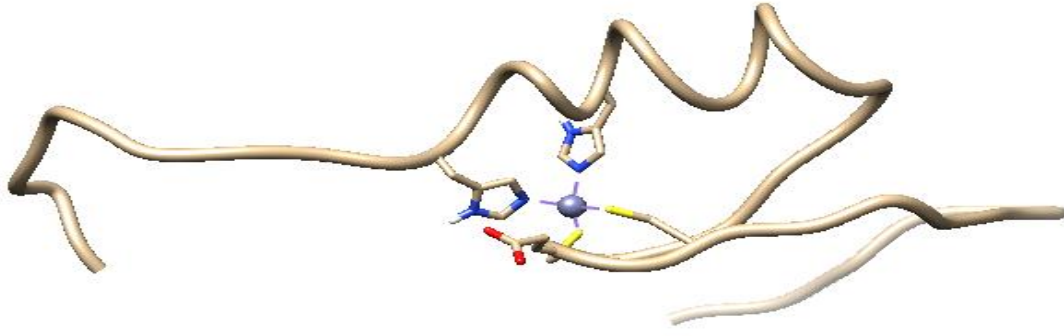
Şekil 4.14 Çinko parmak proteini 268 ( C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (46 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



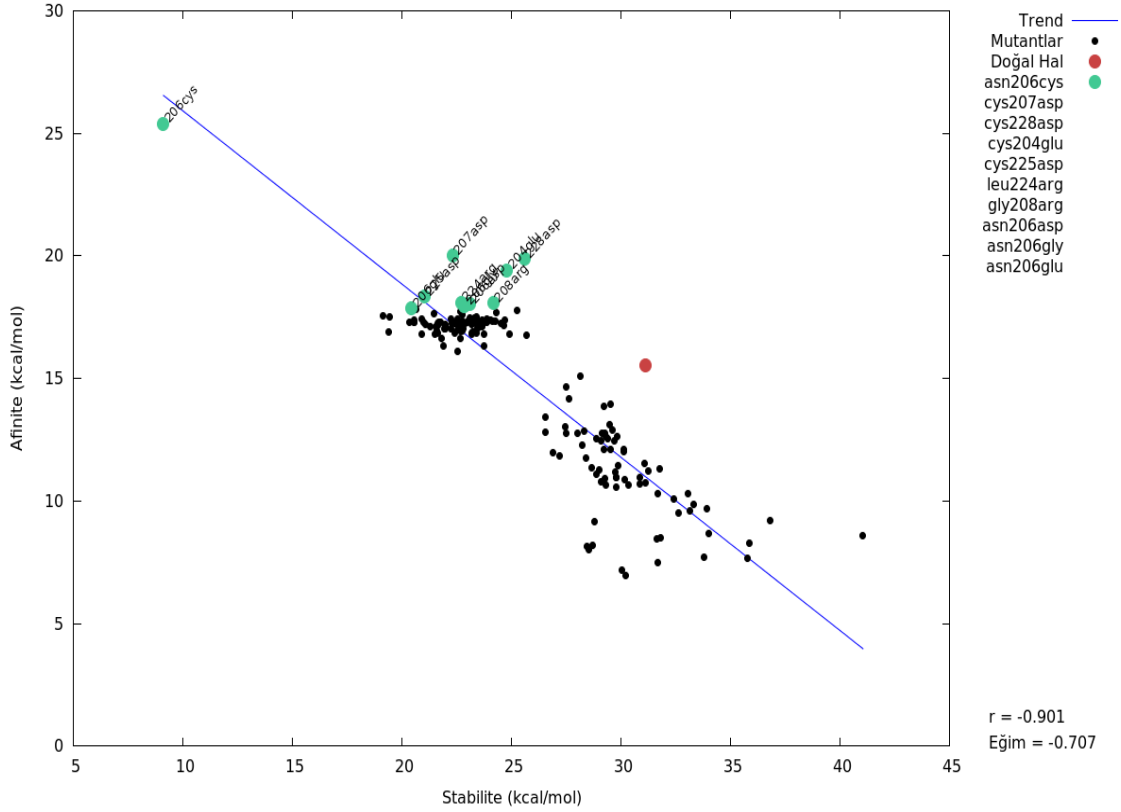
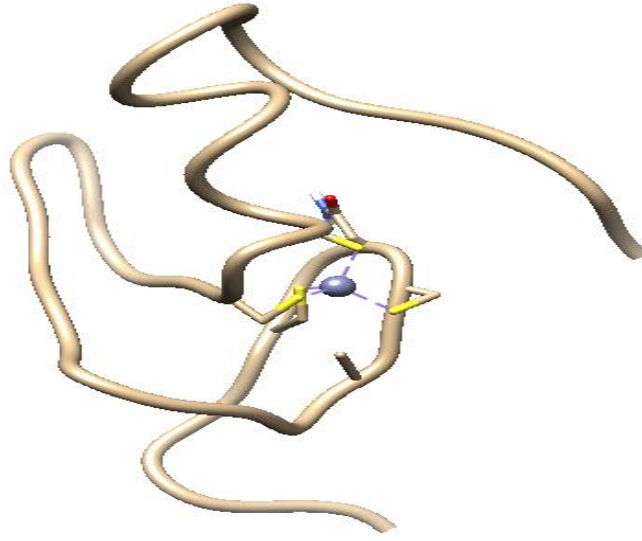
Şekil 4.15 Çinko parmak proteini 28 ( C2H2 çinko parmak bölgesi, insan proteini homoloğu) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (46 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabiltesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



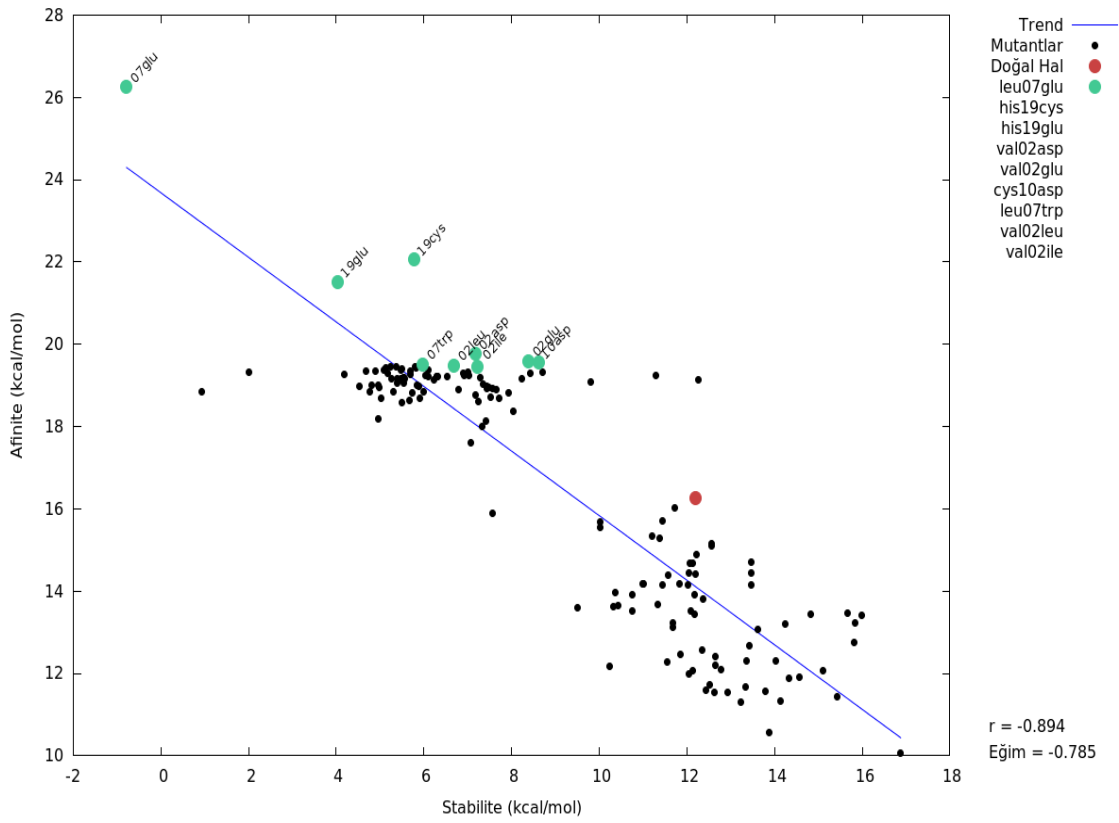
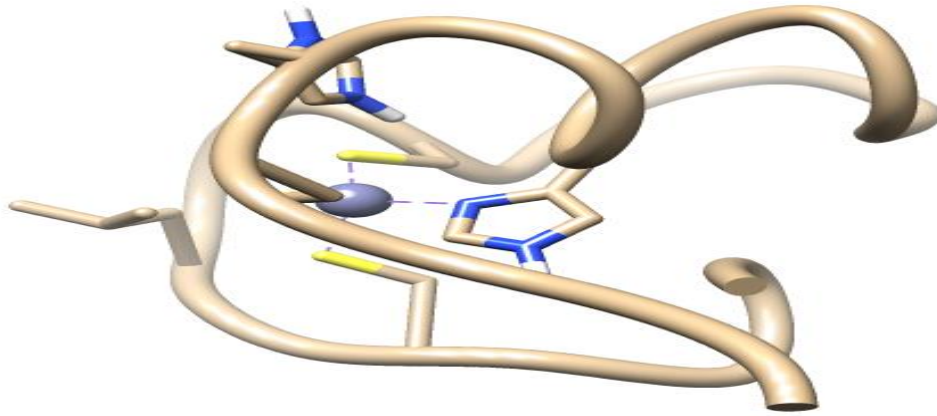
Şekil 4.16 Çinko parmak proteini 484 ( C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (46 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



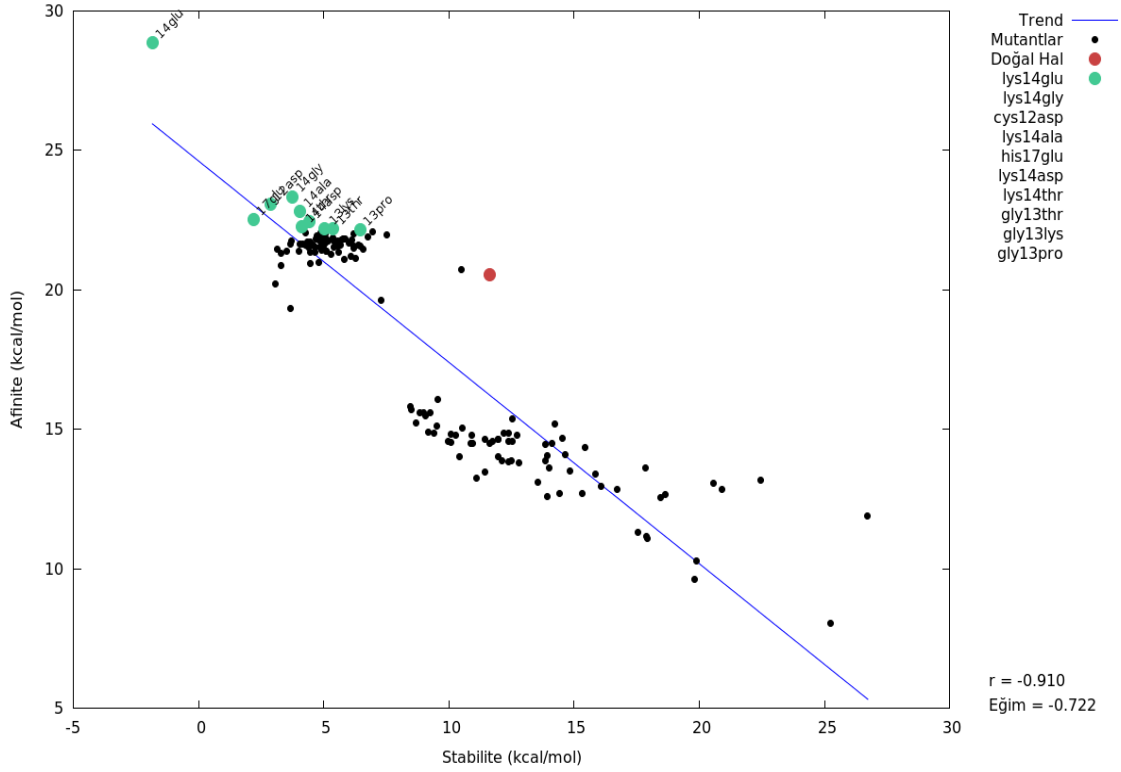
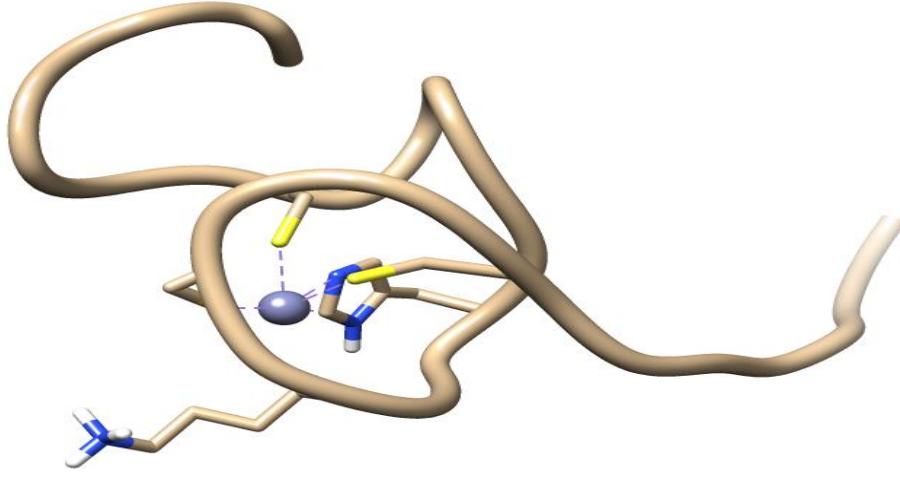
Şekil 4.17 Çinko parmak proteini 347 ( C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (46 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



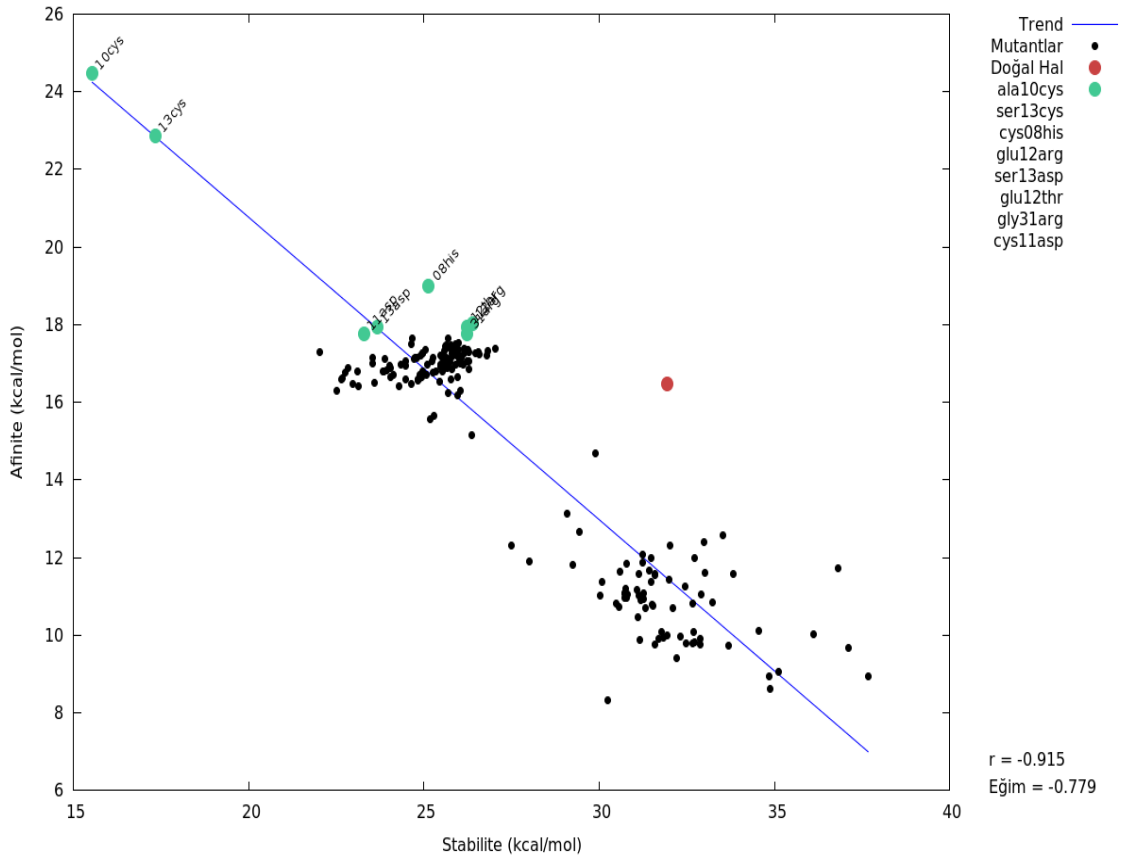
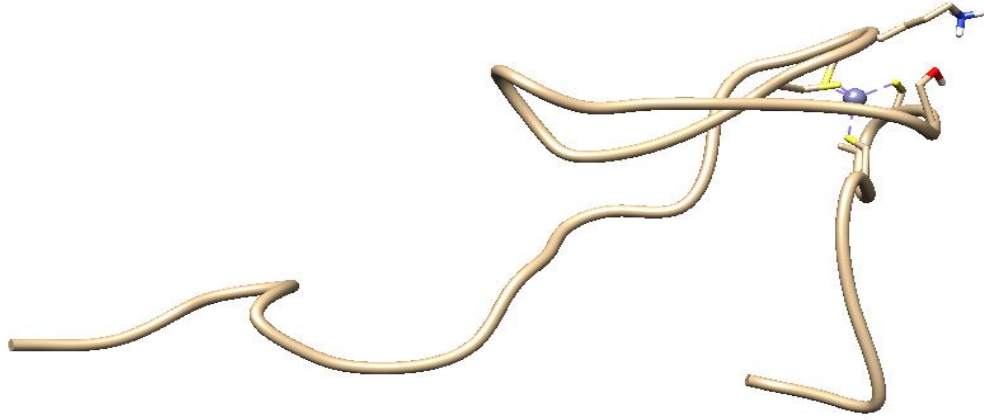
Şekil 4.18 GATA-1 transkripsiyon faktörü proteinin amino ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (46 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



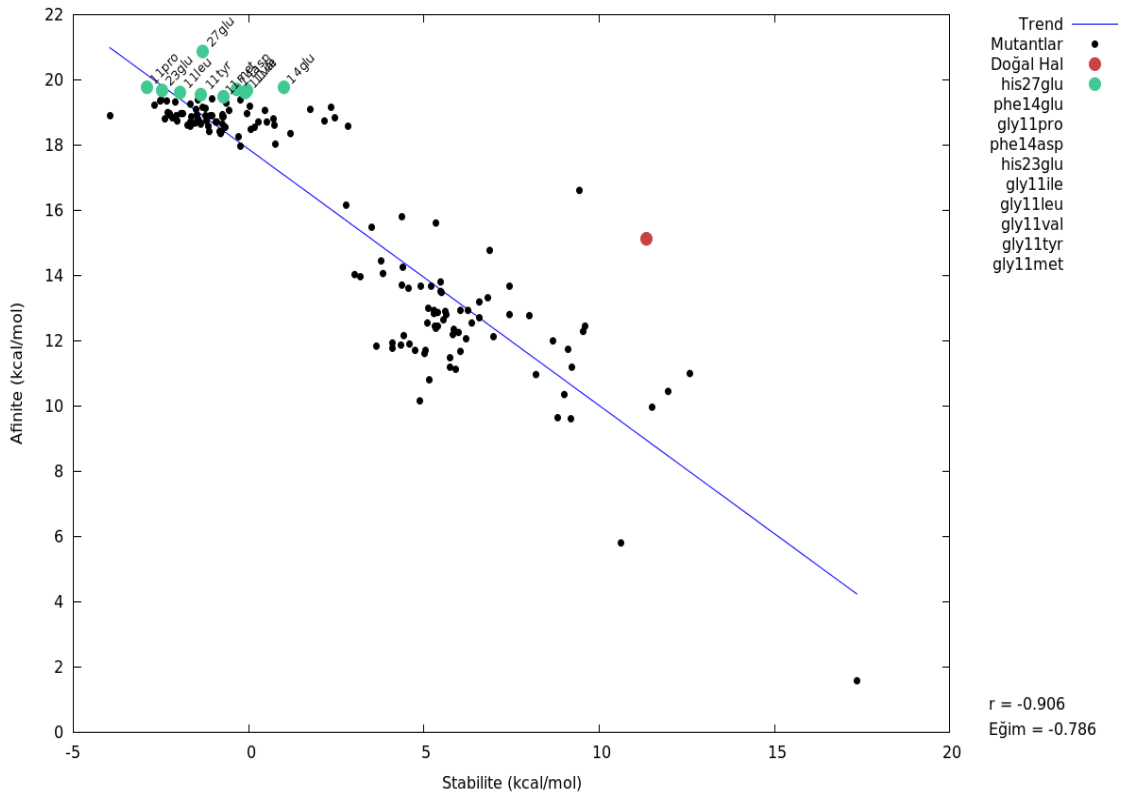
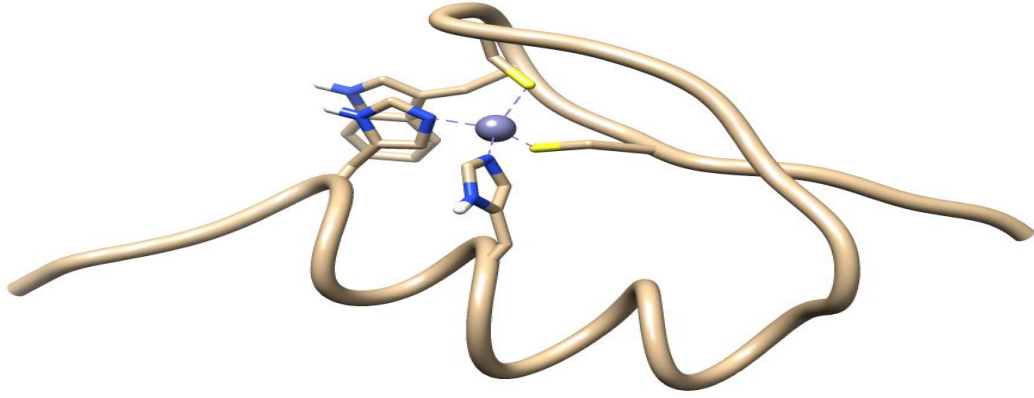
Şekil 4.19 CREB bağlayıcı proteinin CH1 bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (27 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



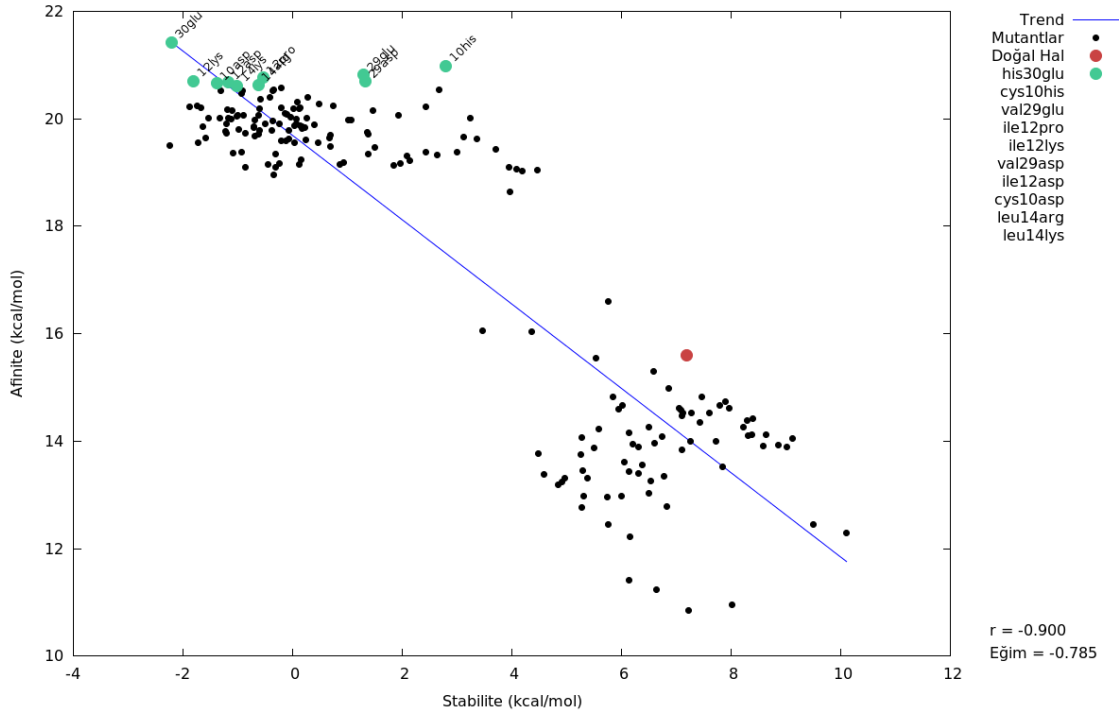
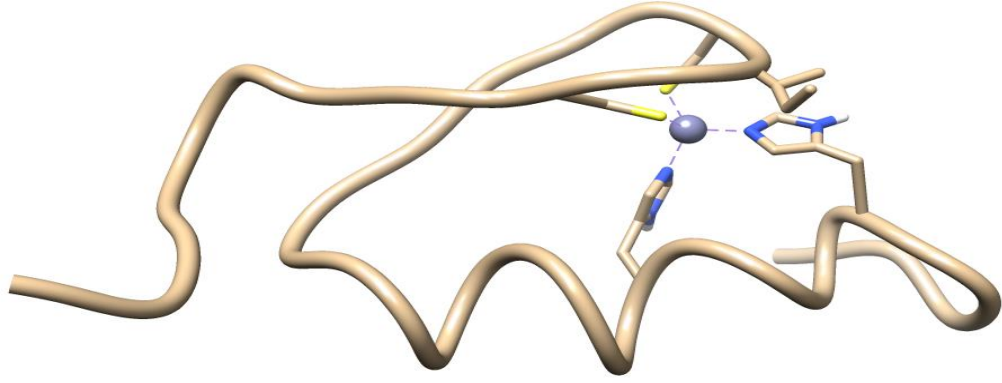
Şekil 4.20 SWI5 transkripsiyon faktörü proteininin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (29 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



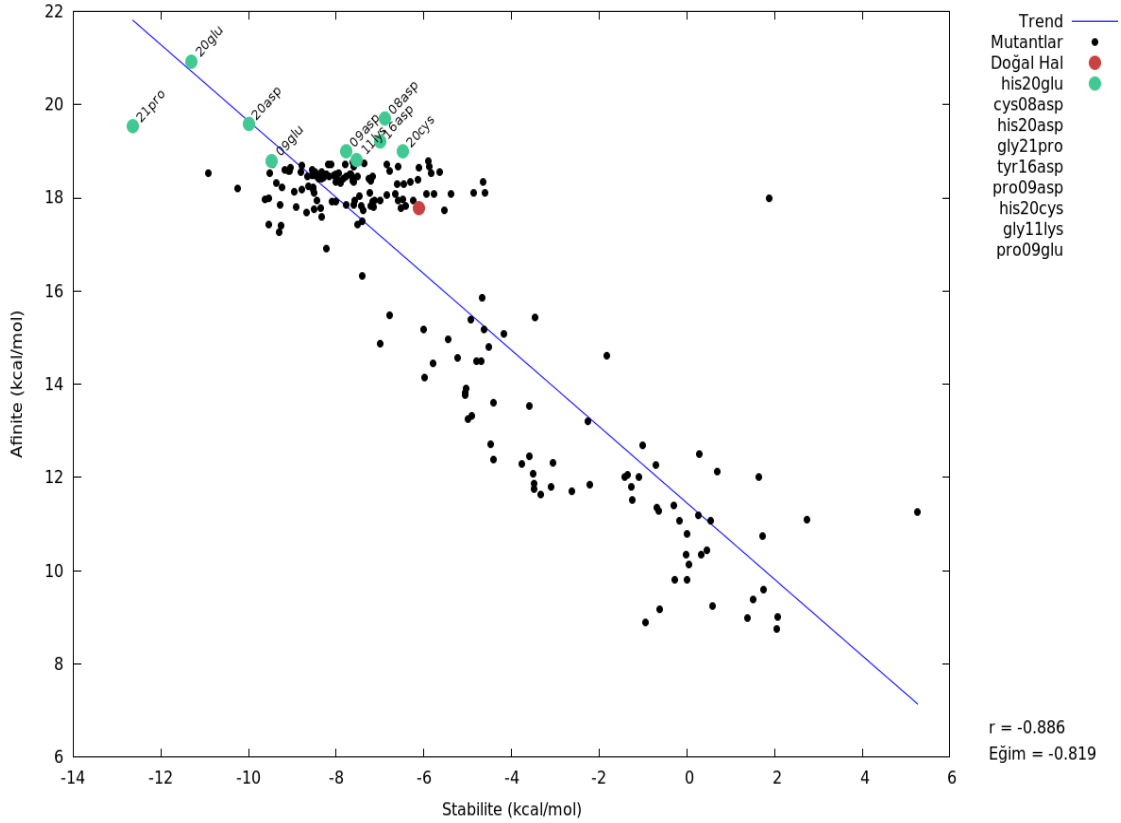
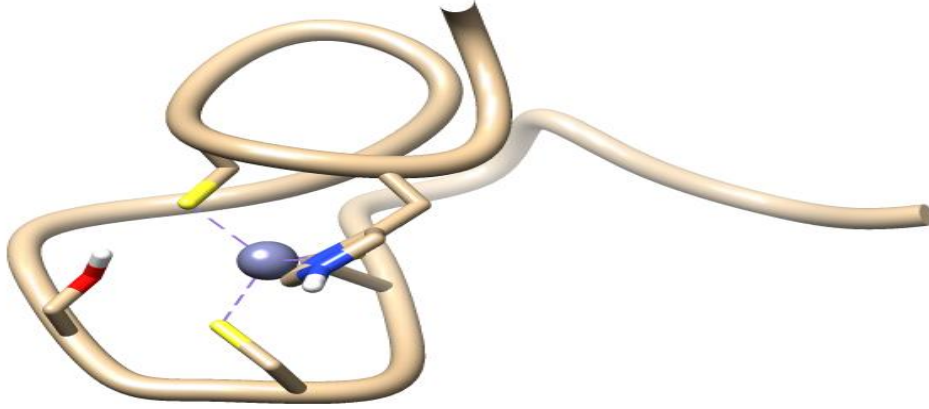
Şekil 4.21 Transkripsiyon Faktör 2 amino ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (50 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



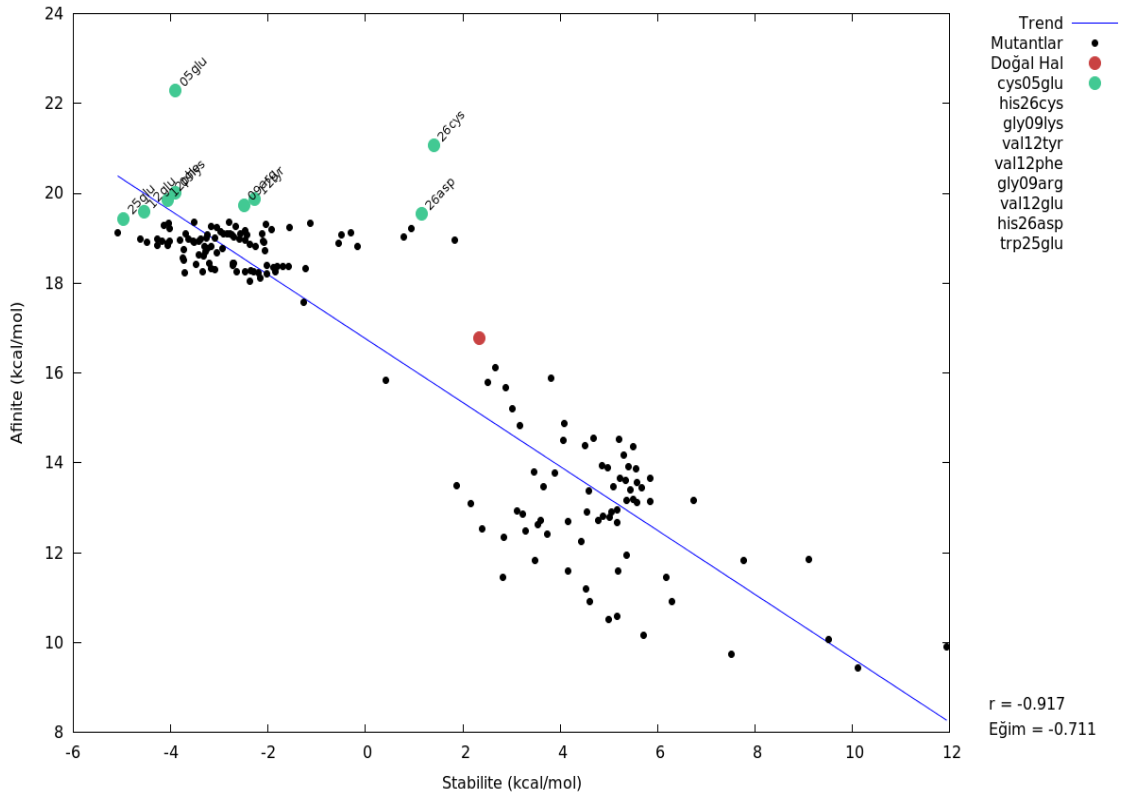
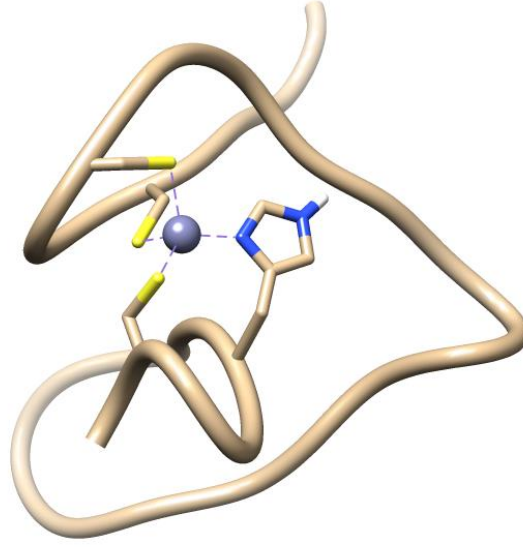
Şekil 4.22 SP1F2 transkripsiyon faktörü proteinin çinko parmak bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (31 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



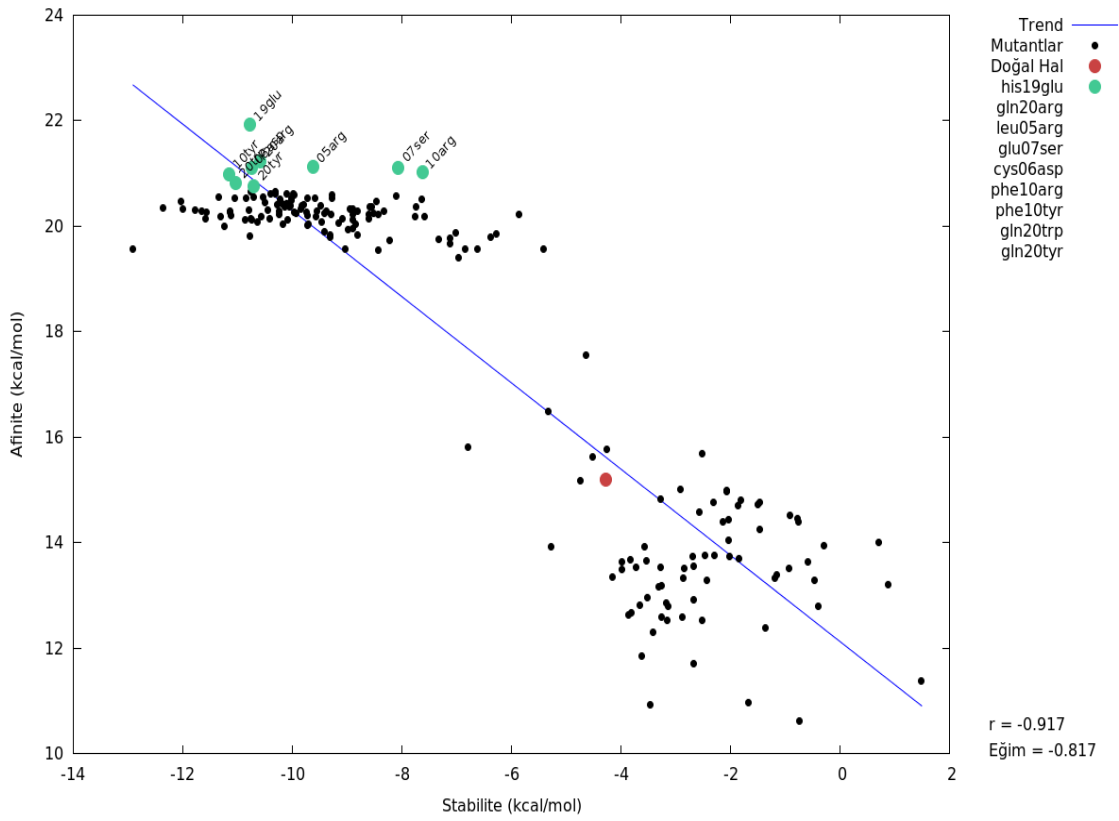
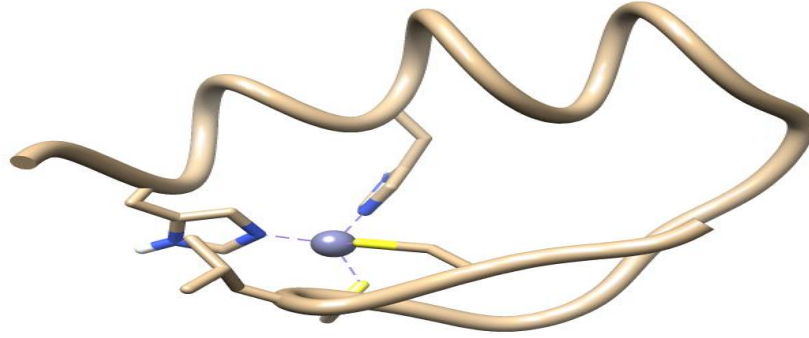
Şekil 4.23 Çinko parmak proteini ZFPM1 üçüncü çinko parmak bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (35 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



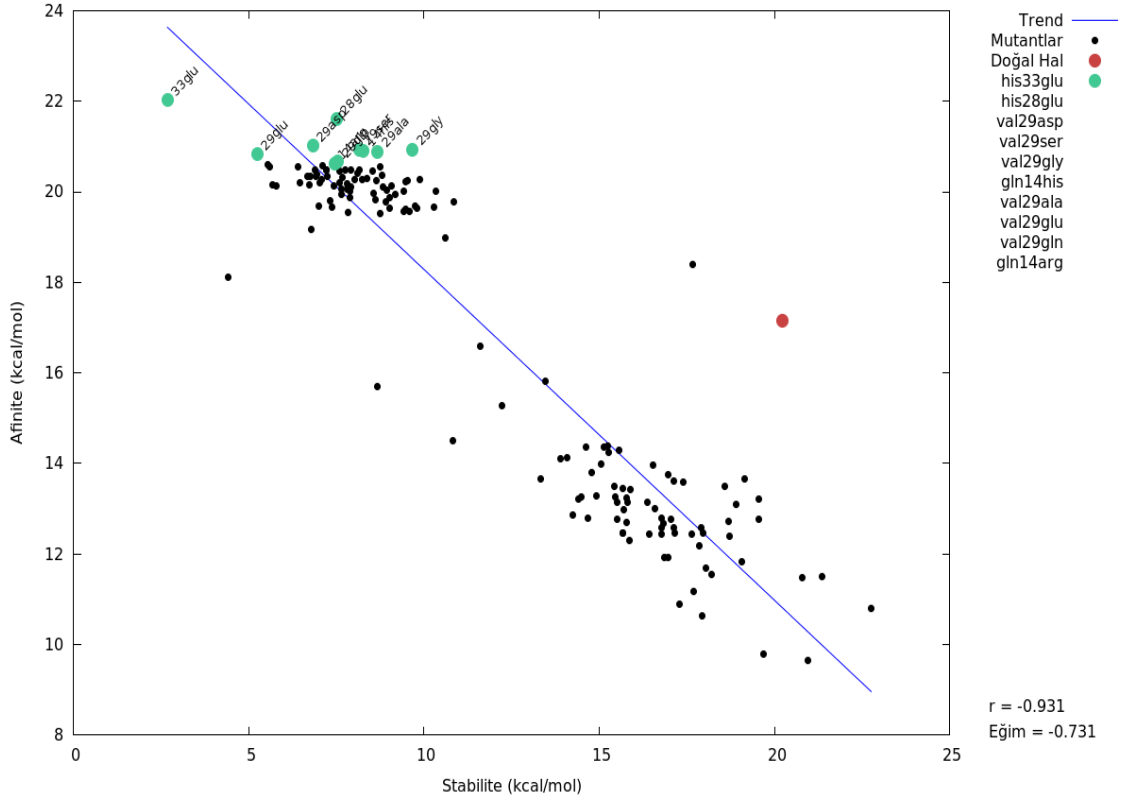
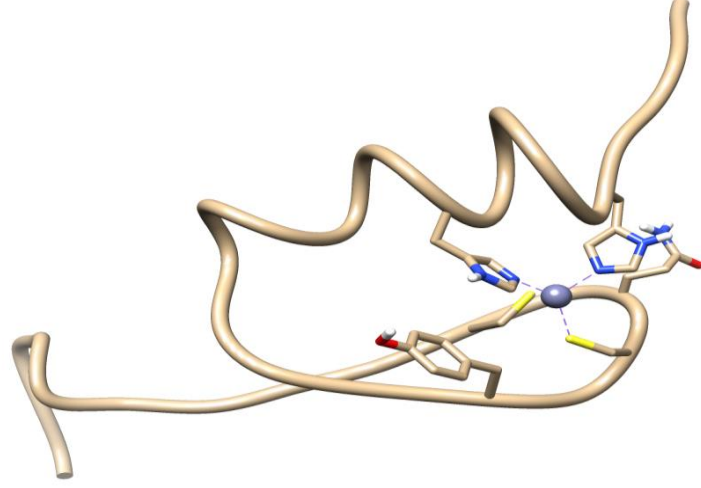
Şekil 4.24 SecA ATPaz karboksil ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (22 amino asitlik bölgesi NMR ve X-ışını analizi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



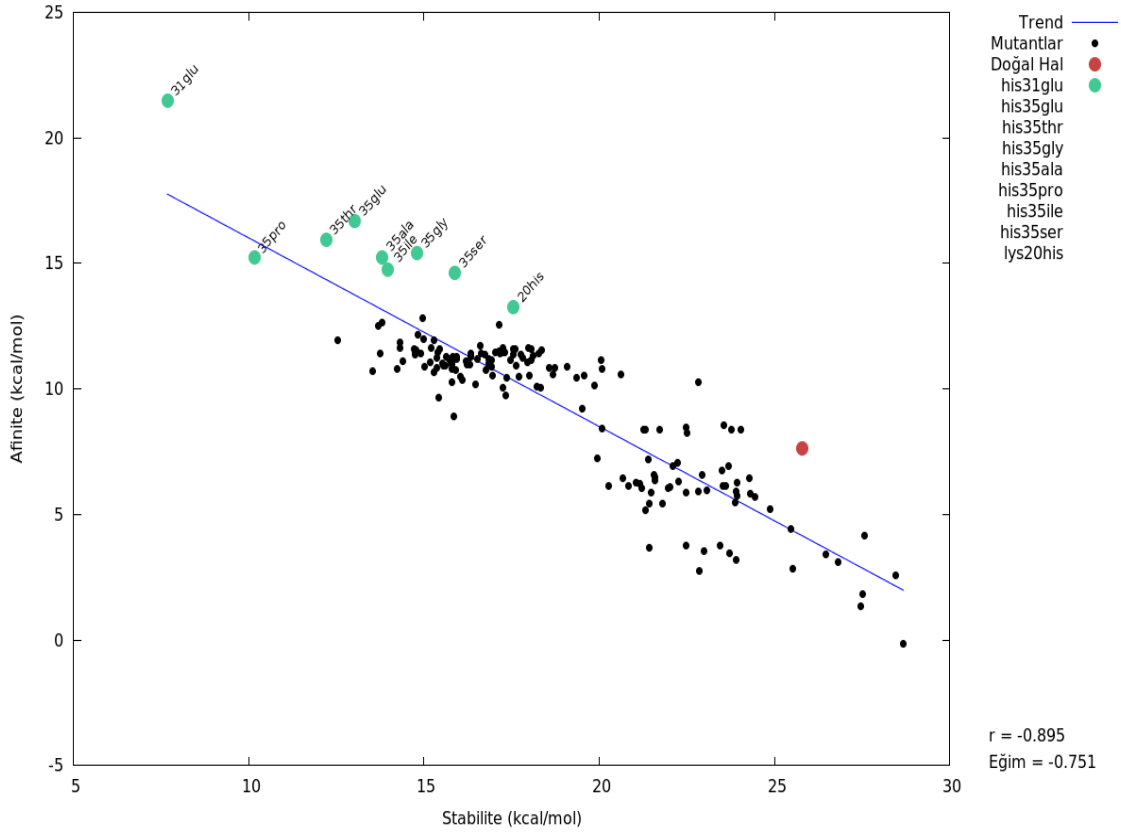
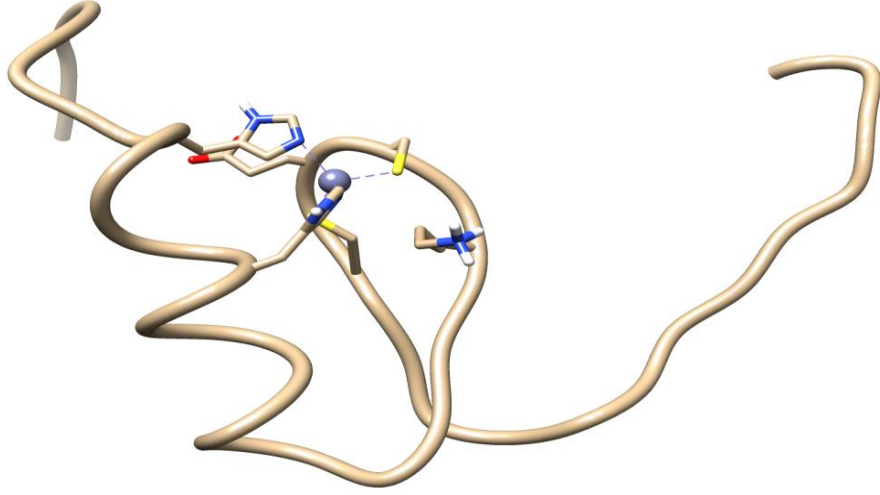
Şekil 4.25 LASP-1 proteini amino ucunun çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (31 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



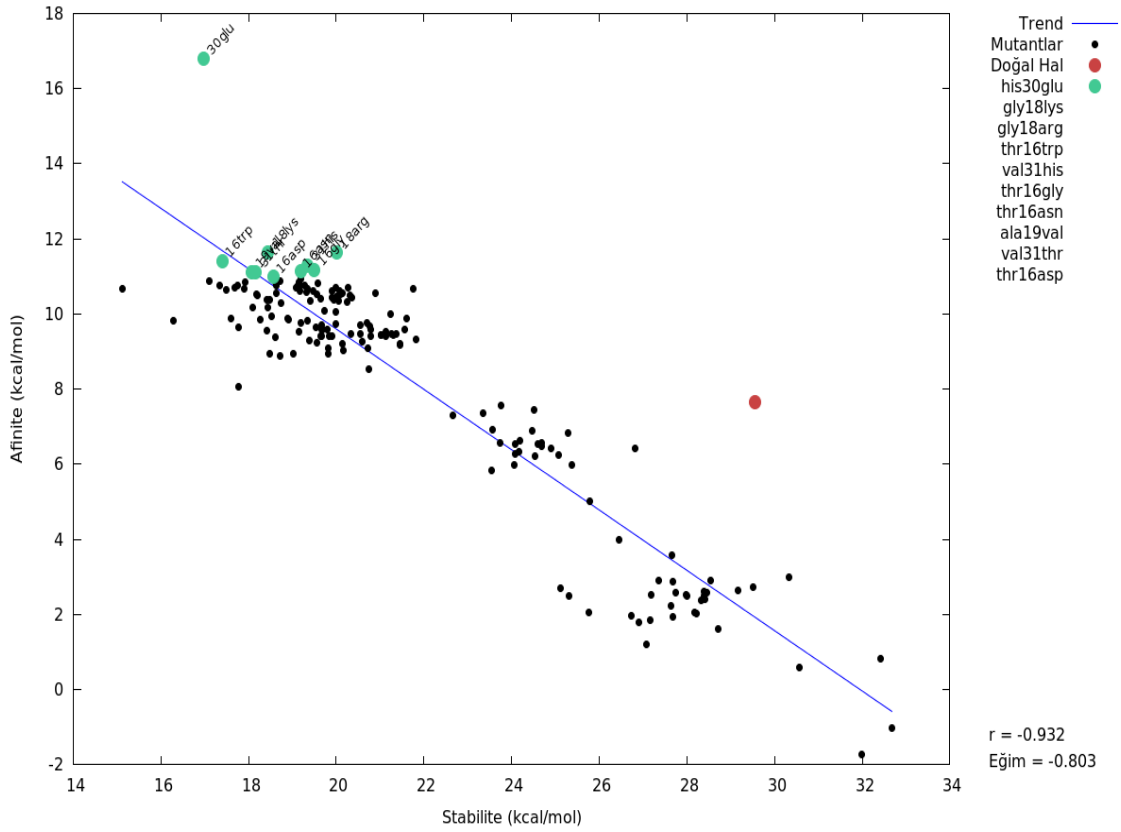
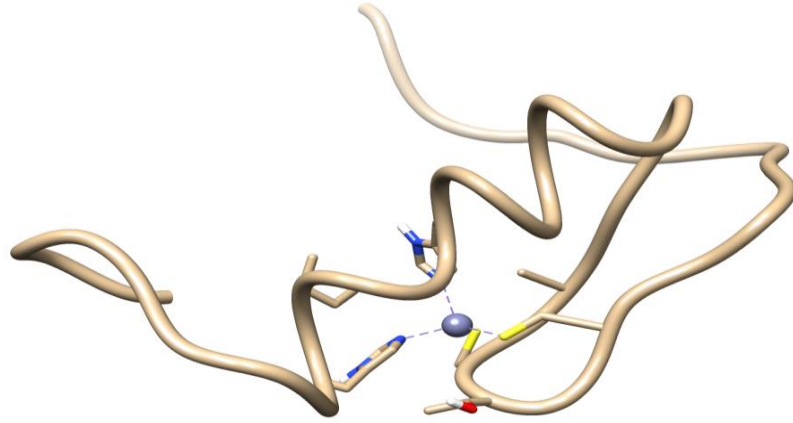
Şekil 4.26 XFIN proteini otuz birinci çinko parmak bölgesinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (27 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabiltesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



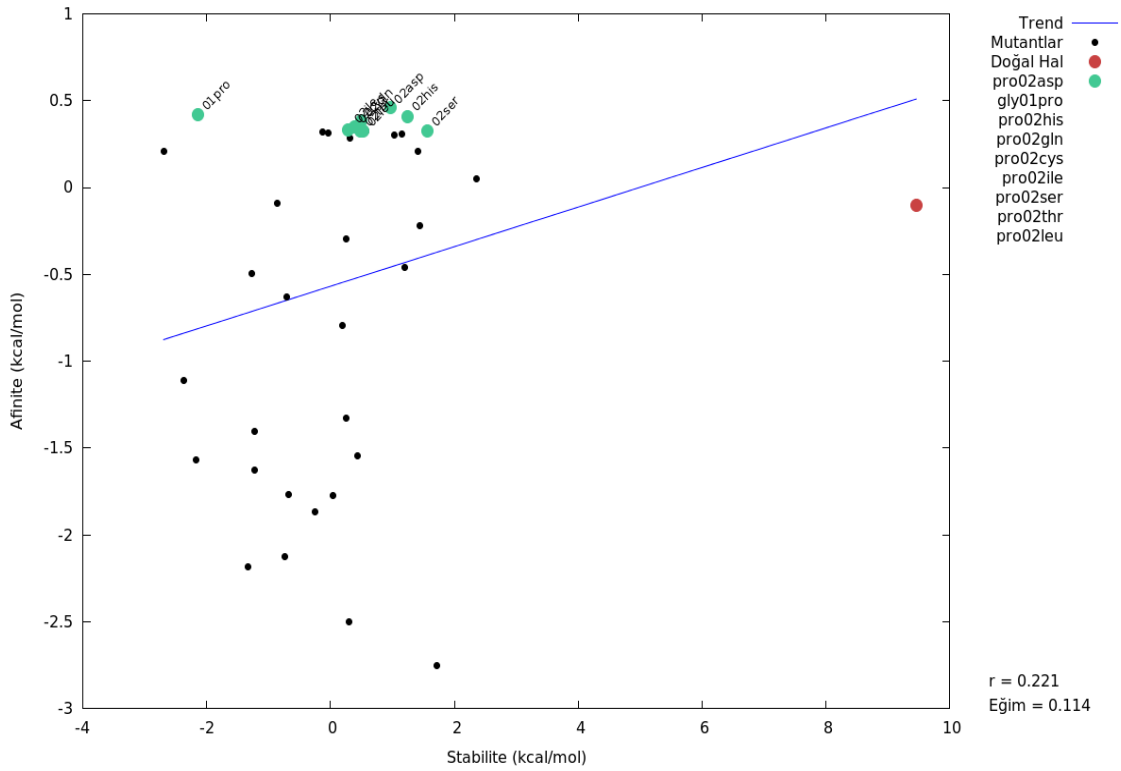
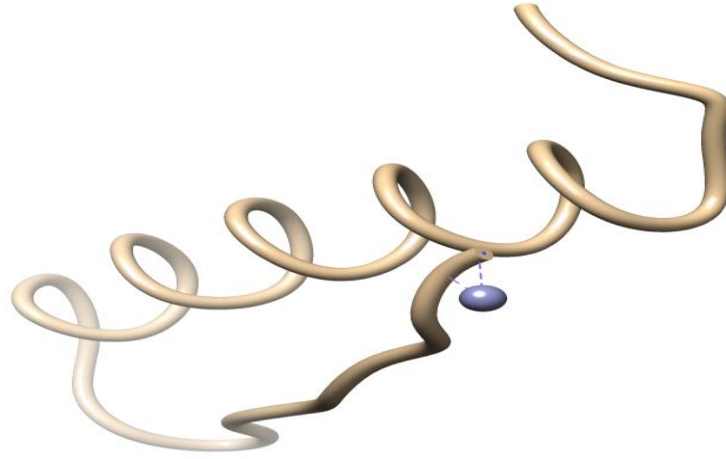
Şekil 4.27 Çinko parmak proteini 406 ( onuncu C2H2 çinko parmak bölgesi) ve çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (37 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



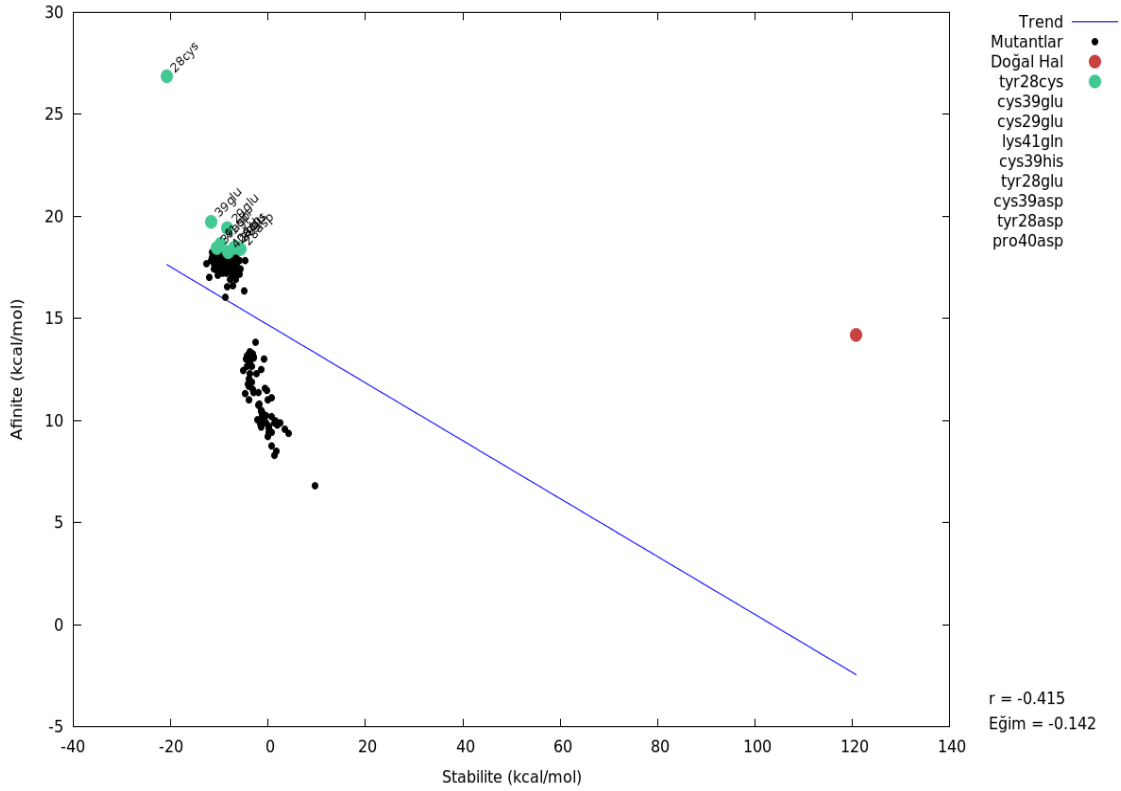
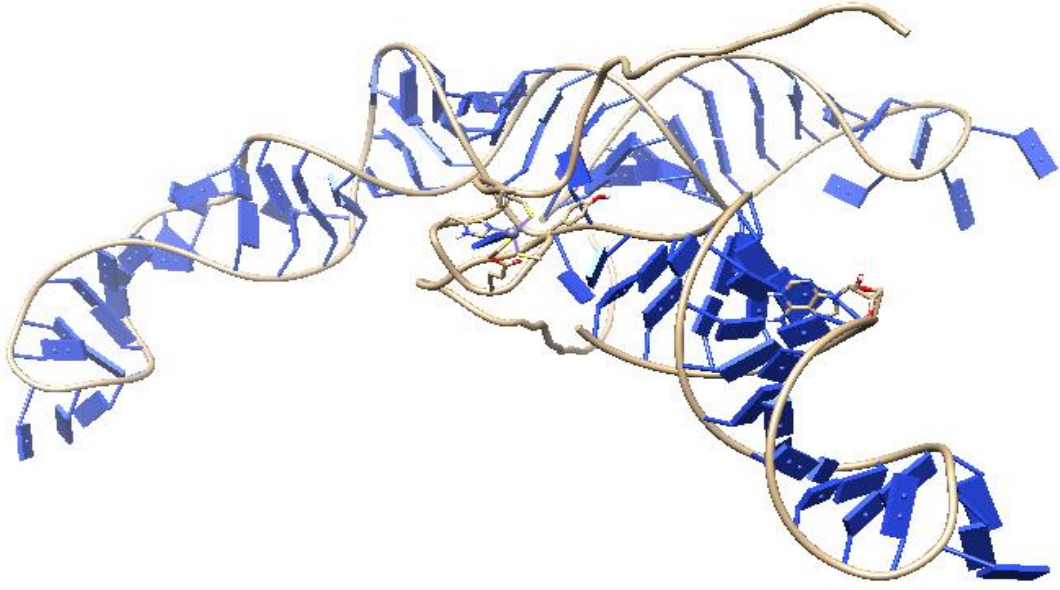
Şekil 4.28 Çinko parmak proteini 268 ( C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (44 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



Şekil 4.29 B hücreli lenfoma 6 proteininin (C2H2 çinko parmak bölgesi) çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (42 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



Şekil 4.30 Kuş türüne ait pankreas proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (36 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabilitesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)



Şekil 4.31 MLV virüsünden izole edilmiş GAG proteinin çinko bağlanma afinitesi ve stabilite analizi. Belirtilen proteinin (56 amino asitlik bölgesi) üç boyutlu yapısının çinkoya bağlanan aminoasitlerinin yan zincirleri belirgin olarak Chimera yazılımıyla (üstte) gösterilmiştir. Belirtilen proteinin doğal hali ve mutantlarının stabiltesi ve çinko bağlanma afinitesi grafiği (altta)

Şekil 4.1-4.29'daki afinite ve stabilite grafikleri verilen belirtilen proteinler biyosensör olarak kullanılabilmek için sentez edilebilecek adaylar olarak ayrıca biyolojik ve kimyasal etkenler göz önünde bulundurularak ayrıntılı incelenebilir.

Alzheimer hastalığında etkili amyloid-beta proteinin 16 amino asitlik bölgesi için Autodock Vina programıyla, FoldX programında mutant pdb dosyalarının aminoasit değişikliğinden sonraki yapıları ele alınarak redocking yöntemiyle Autodock Vina programının hazır komutlarıyla çinkonun bağlanma afinitesi hesaplanmıştır. Şekil 4.1'de görülen yeşil ile belirtilen noktalar FoldX programı tarafından sayısal değer olarak afinitesi en yüksek bulunan 10 mutanti göstermektedir. Şekil 4.2'de Autodock Vina yazılımıyla yapılan hesapta FoldX programında yeşil ile gösterilen mutant pdb dosyalarının çinko bağlanma afinitesini yüksek göstermektedir. Bu durum FoldX afinite değerlerinin doğru bir yaklaşım olduğunu ve Autodock Vina programıyla doğrulandığını göstermektedir.

Kuş türüne ait pankreas proteinin 36 aminoasitlik bölgesini ele aldığımızda afinite ve stabilite arasındaki eğilimin diğer grafiklerden farklı bir karakteristik gösterdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebi Şekil 4.30 görüldüğü gibi çinko iyonunun kuş türüne ait pankreas proteinin 36 aminoasitlik bölgesinin ucuna bağlanmıştır. Çinko iyonu bağlanma cebi içinde değildir ve diğer ele aldığımız proteinlerin çinko bağlanma bölgesinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu durum hesapsal yöntemle elde ettiğimiz verilere yansımıştır. Bu nedenle kuvvetli bir bağlanma da söz konusu değildir. Ayrıca çinko iyonu N-ucuna proteininin ucuna bağlandığından ve 5A<sup>0</sup> civarındaki atomların bağlı olduğu aminoasit sayısı az olduğundan dolayı FoldX yazılımıyla elde edilen çinko bağlanma afinitesinde sayısal olarak ciddi bir azalma görülmüştür. Bütün bu çıkarımlar FoldX programının kendi içinde tutarlı olduğunu göstermektedir. Korelasyon katsayısı bakımından farklılığından da diğer grafiklerden farklı bir karakteristik olduğu gözlemlenmektedir.

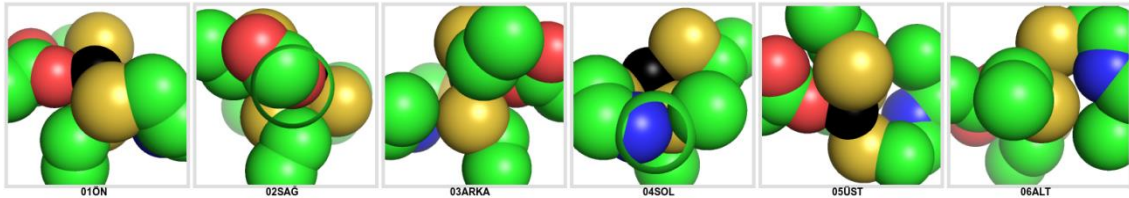
MLV virüsünden izole edilmiş GAG proteinin 56 amino asitlik bölgesinin Şekil 4.31 gösterilen proteinini ele aldığımızda yukarıda bahsedilen karakteristiğin dışında farklı bir karakteristik gözlemlenmiştir. FoldX yazılımı hesapsal olarak protein dışındaki yapıları hesaba katmamaktadır. Bu nedenle MLV virüsünden izole edilmiş GAG proteinin 56 amino asitlik bölgesinin yapısında bulunan nükleotid vb. protein olmayan

yapılardan dolayı çalışmamızdaki diğer proteinlerden farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle mutant pdb dosyalarında da farklı bir karakteristik gözlemlenmiştir. Bu durum da yine FoldX yazılımıyla elde ettiğimiz verilerin tutarlığını göstermektedir. Korelasyon katsayısı bakımından farklılığı diğer grafiklerden farklı bir karakteristik olduğu gözlemlenmektedir.

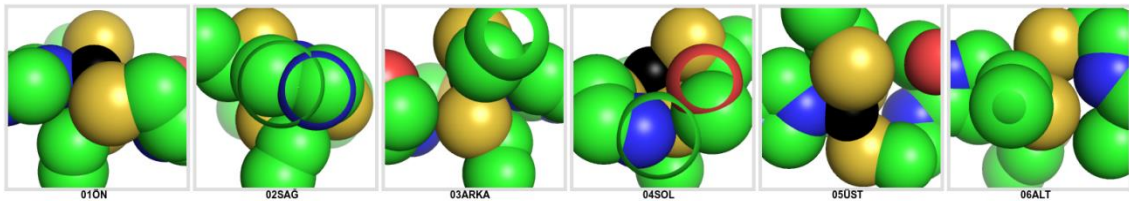
#### 4.2 Belirli Bir Proteinde Çinko İyonuna Erişebilirliğinin İncelenmesi

Yeşil renk karbon atomları, mavi renk azot atomlarını, kırmızı renk oksijen atomlarını, sarı renk sülfür atomlarını, beyaz renk hidrojen atomlarını, Siyah renk ise çinko iyonunu simgelemektedir.

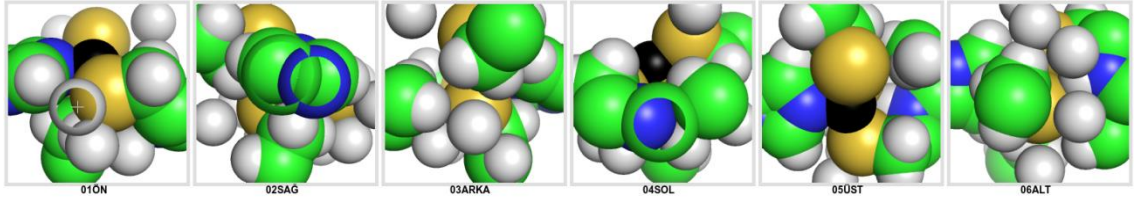
Çinko atomunun erişebilirliğini gözlemek amacıyla PyMOL komutları ile çinko atomuna 5Å<sup>0</sup> uzaklıktan 6 yönden (sağ, sol, ön, arka, alt, üst) görüntüler alındı. Şekil 4.32-34 verilen çinko iyonun çevresindeki atomları gösteren görüntülerde MMTV virüsü nükleokapsit proteini - P14 (birinci çinko parmak bölgesi) 21 amino asitlik bölgesinin mutantlarına ait amino asit değişikliğinden sonraki yapılarında çinko iyonuna erişebilirlik incelenmiştir. Bunun sebebi, optimize ettiğimiz proteinlerin çinko biyosensörü olarak kullanılabilmesi için çinko iyonuna DPS ligand olarak bağlanmalıdır. Söz konusu ligand bağlanmasının gerçekleşmesi için en uygun mutant proteini tespit etmek için çinko iyonunun erişilebilirliği incelenmiştir. Literatürde bahsedildiği üzere çinko iyonu tespitinde kullanılan proteinlerde FRET biyosensör sistemi çinko iyonuna donör bağlanması esasına dayanmaktadır. Bu nedenle, çinko iyonunun çevresindeki atomlar ve erişilebilirlik önemli bir etkidir. Deneysel aşamaya geçildiğinde peptidlerin sentezlendikten sonra FRET biyosensör olarak kullanılması aşamasında çinkoya bir donörün erişilebilirliği önemli bir rol oynayacaktır



Şekil 4.32 MMTV virüsü nükleokapsit proteini - P14 (birinci çinko parmak bölgesi) 21 amino asitlik bölgesinin 39.amino asitinin doğal hali olan histidin yerine glutamat olan mutantının çinkoya erişebilirliğinin PyMOL yazılımıyla elde edilen görüntüsü



Şekil 4.33 MMTV virüsü nükleokapsit proteini - P14 (birinci çinko parmak bölgesi) 21 amino asitlik bölgesinin 41.amino asitinin doğal hali olan lizin yerine glutamat olan mutantının çinkoya erişebilirliğinin PyMOL yazılımıyla elde edilen görüntüsü



Şekil 4.34 MMTV virüsü nükleokapsit proteini - P14 (birinci çinko parmak bölgesi) 21 amino asitlik bölgesinin doğal halinin çinkoya erişebilirliğinin PyMOL yazılımıyla elde edilen görüntüsü

Şekil 4.32-34 'de gösterilen pdb dosyalarının çinkoya yakın altı yönden görüntüsü mevcuttur. Şekillerde de görüldüğü üzere pdb dosyalarında çinkoya erişebilirlik açısından farklılıklar görülmektedir. Biyosensör olarak sentezi aşamasında çinkoya erişebilirlik FRET sisteminin donörünün çinkoya bağlanması durumunda önemli bir etkidir. Ayrıca her bir mutant için ayrı ayrı bu şekilde incelenebilir.

## KAYNAKLAR

---

- [1] Hurst, T.K., (2010). "Development of a Novel Protein Sensor For The Intracellular Imaging of Zinc", Doktora Tezi.
- [2] Hurst, T.K., Wang, D., Thompson, R.B. and Fierke, C.A., (2010). "Carbonic Anhydrase II-Based Metal Ion Sensing:Advances and New Perspectives", *Biochim. Biophys. Acta*, 1804(2):393.
- [3] Kiefer, L.L. and Fierke, C.A (1994). "Functional characterization of human carbonic anhydrase II variants with altered zinc binding sites", *Biochemistry*, 33:15233-15240.
- [4] Wang, D., Hurst, T.K., Thompson, R.B. and Fierke, C.A., (2011). "Genetically encoded ratiometric biosensors to measure intracellular exchangeable zinc in *Escherichia coli*", *Journal of Biomedical Optics*, 16(8).
- [5] Auld, D.S., (2001). "Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites", *Biometals*, 14(3-4):271-313.
- [6] Vallee, B.L. and Falchuk, K.H., (1993). "The biochemical basis of zinc physiology", *Physiol Rev*, 73:79-118.
- [7] Ülger, H. and Coşkun, A., (2003). "Çinko: Temel Fonksiyonları ve Metabolizması", *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 5(2):38-44.
- [8] David, B.M., (1999). "Trace elements. In: Carl AB", *Tietz Textbook of Clinical Chemistry Philadelphia*, W. B. Saunders Company:1029-1055.
- [9] Taneli, B., (2005). "Anadolu Toplumunda Çinko", *Ege Tıp Dergisi*, 44 (1):1 - 10.

- [10] Meerarani, P., Reiterer, G., Toborek, M. and Hennig, B., (2003). "Zinc modulates PPARgamma signaling and activation of porcine endothelial cells", *J. Nutr.* 133(10):3058-64.
- [11] Maret, W., (2013). "Zinc and the zinc proteome. In *Metalloomics and the Cell*", Springer, 479:501.
- [12] Coleman, J.E., (1992). "Zinc proteins: Enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins", *Annual Review of Biochemistry*, 61:897-946.
- [13] Christianson, D.W., (1991). "Structural biology of zinc", *Advances in Protein Chemistry*, 42:281-355.
- [14] Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. and Rosato, A., (2006). "Counting the zinc-proteins encoded in the human genome", *J. Proteome Res.* 5:196-201.
- [15] Sandstead, H.H., (1994). "Understanding zinc: recent observations and interpretations", *J. Lab. Clin. Med.*, 124:322-327.
- [16] McCarthy, T.J., Zeelie, J.J. and Krause, D.J., (1992). "The antimicrobial action of zinc ion/ antioxidant combinations", *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 17:5.
- [17] Matthews, J.M. and Sunde, M., (2002). "Zinc fingers--folds for many occasions", *IUBMBLife*, 54:351-355.
- [18] Berg, J.M. and Shi, Y., (1996). "The galvanization of biology; a growing appreciation for the roles of zinc", *Science*, 271:1081-1085.
- [19] Underwood, J.E., (1977). "Zinc In: Trace elements in human and animal nutrition", *Academic Press*:196-237.
- [20] Takeda, A., (2000). "Movement of zinc and its functional significance in the brain", *Brain Res. Bull*, 34:137-148.
- [21] Belgem, T. and Akar, N., (2004). "Çinkonun yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 57, 3:161-16.
- [22] Onosaka, S., Tetsuchikawahara, N. and Mın, K., (2002). "Paradigm Shift in Zinc: Metal Pathology", *Tohoku J. Exp Med*, 196:1-7.

- [23] Saner, G., Neyzi, O. and Ertuğrul, T., (2002). "Mikroelementler (Çinko)", *Pediatrici*, 3:174-75.
- [24] Osredkar, J. and Sustar, N., (2011). "Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance", *Clinic Toxicol*:3.
- [25] Kaslow, J.E., "Copper/Zinc Imbalance", Medical Board of California.
- [26] Evans, J.R., (2006). "Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration", *Cochrane Database Syst Rev*. 2.
- [27] Age-Related Eye Disease Study Research Group, (2001). "A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss", AREDS report no. 8. *Arch. Ophthalmol*, 119:1417-1436.
- [28] Krebs, N.F., Reidinger, C.J., Hartley, S., Robertson, A.D. and Hambidge, K.M., (1995). "Zinc supplementation during lactation: effects on maternal status and milk zinc concentrations", *Am. J. Clin. Nutr.*, 61:1030-1036.
- [29] Aggett, P.J., (1994). "Zinc", *Annales Nestle*, 52:94-106.
- [30] Russel, R.M., Cox, M.E. and Solomons, N.W., (1983). "Zinc and the special senses", *Ann. Int. Med.*, 99-227.
- [31] Maret, W. and Sandstead, H.H., (2006). "Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation", *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 20:3-18.
- [32] Prasad, A.S. and Kucuk, O., (2002). "Zinc in cancer prevention. Cancer", *Met. ast Rev.*, 21:291-295.
- [33] Chausmer, A.B., (1998). "Zinc, insulin and diabetes", *J. Am. Coll. Nutr.*, 17:109-115.
- [34] Hershinkel, M., Silverman, W.F. and Sekler, I., (2007). "The Zinc Sensing Receptor, a Link Between Zinc and Cell Signaling", *Molecular Medicine*, 13:331.
- [35] Prasad, A.S., (1995). "Zinc: an overview", *Nutrition*, 11:93-99.

- [36] Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, (2004). "Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington", DC:National Academy Press.
- [37] Rink, L. and Gabriel, P., (2000). "Zinc and the immune system", *Proc. Nutr. Soc.*, 59:541-552.
- [38] Berdanier, C.D., Dwyer, J.T. and Feldman, E.B., (2007). "Handbook of Nutrition and Food." Boca Raton, Florida: CRC Press.
- [39] Vallee, B.L. and Falchuk, K.H., (1993). "The biochemical basis of zinc physiology", *Physiological Reviews*, 73:79-118.
- [40] Tarakçı, Z. and Küçüköner, E., (2006). "Esansiyel Bir Mineral olan Çinkonun Fonksiyonel Özellikleri", Türkiye 9. Gıda Kongresi.
- [41] Sandstead, H.H., (2003). "Zinc is essential for brain development and function", *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 16:165-173.
- [42] Szpunar, J., (2000). "Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques", *Analyst* 125:963-988.
- [43] Sanz-Medel, A., Montes-Bayon, M. and Luisa Fernandez Sanchez, M., (2003). "Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics", *Anal Bioanal Chem.*, 377:236-247.
- [44] Paunesku, T., Vogt, S., Maser, J., Lai, B. and Woloschak, G., (2006). "X-ray fluorescence microprobe imaging in biology and medicine", *J. Cell Biochem.*, 99:1489-1502.
- [45] Ralle, M. and Lutsenko S., (2009). "Quantitative imaging of metals in tissues", *Biomaterials*, 22:197-205.
- [46] Rousseau, R.M., (2001). "Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results", *Rigaku*, 18:33-47.
- [47] Fahrni, C.J., (2007). "Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11:121-127.

- [48] Domaille, D.W., Que, E.L. and Chang, C.J., (2008). "Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals", *Nat. Chem. Biol.*, 4:168-175.
- [49] Hirano, T., Kikuchi, K. and Nagano, T., (2004). "Zinc fluorescent probes for biological applications", *Reviews in Fluorescence* .New York:Kluwer Academic / Plenum Publishers:55-73.
- [50] Thompson, R.B., (2005). "Studying zinc biology with fluorescence:Ain't we got fun?", *Current Opinion in Chemical Biology*, 9:526-532.
- [51] Morelle, B., Salmon, J.M., Vigo, J. and Viallet, P., (1994). "Measurement of intracellular magnesium concentration in 3T3 fibroblasts with the fluorescent indicator Mag-indo-1", *Analytical Biochemistry*, 218:170-176.
- [52] Missiaen, L., Robberecht, W., Van Den Bosch, L., Callewaert, G., Parys, J. B., Wuytack, F., Raeymaekers, L., Nilius, B., Eggermont, J. and De Smedt, H., (2000). "Abnormal intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and disease", *Cell Calcium*, 28:1-21.
- [53] Bozym, R. A., Thompson, R.B., Stoddard, A.K. and Fierke, C.A., (2006). "Measuring picomolar intracellular exchangeable zinc in PC-12 cells using a ratiometric fluorescence biosensor", *ACS Chemical Biology*, 1:103 -111.
- [54] White, C.E. and Argauer, R.J., (1970). "Fluorescence Analysis:A Practical Approach", Marcel Dekker Inc.
- [55] Fernandez-Gutierrez, A. and Munoz de la Pena, A., (1985). "Determinations of inorganic substances by luminescence methods", *Molecular Luminescence Spectroscopy, Part I:Methods and Applications*, 77:371-546.
- [56] Lakowicz, J.R., Gryczynski, I., Gryczynski, Z. and Dattelbaum, J.D., (1999). "Anisotropybased sensing with reference fluorophores", *Analytical Biochemistry*, 267:397 - 405.
- [57] Frederickson, C.J., Kasarskis, E.J., Ringo, D. and Frederickson, R.E., (1987). "A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain", *Journal of Neuroscience Methods*, 20:91-103.
- [58] Zalewski, P.D., Forbes, I.J. and Betts, W.H., (1993). "Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using Zinquin [(2-methyl-8 ptoluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II)", *Biochemical Journal*, 296:403-408.

- [59] Miyawaki, A., Lopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. and Tsien R.Y., (1997). "Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin", *Nature*, 388:882-887.
- [60] Pearce, L.L., Gandley, R.E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A.J., McLaughlin, M.K., Pitt, B.R. and Levitan, E.S., (2000). "Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:477-482.
- [61] Jensen, K.K., Martini, L. and Schwartz, T.W., (2001). "Enhanced fluorescence resonance energy transfer between spectral variants of green fluorescent protein through zinc-site engineering", *Biochemistry*, 40:938-945.
- [62] Qiao, W., Mooney, M., Bird, A.J., Winge, D.R. and Eide D.J., (2006). "Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored in vivo by using FRET", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103:8674-8679.
- [63] Dongen, E.M., Evers, T.H., Dekkers, L.M., Meijer, E.W., Klomp, L.W.J. and Merckx, M., (2007). "Variation of linker length in ratiometric fluorescent sensor proteins allows rational tuning of Zn(II) affinity in the picomolar to femtomolar range", *Journal of the American Chemical Society*, 129:3494-3495.
- [64] Meldrum, N.U. and Roughton, F.J., (1933). "Carbonic anhydrase. Its preparation and properties", *J. Physiol.*, 80:113-142.
- [65] Stadie, H.W.C. and O'Brien, (1933). "The catalysis of the hydration of carbon dioxide and the dehydration of carbonic acid by an enzyme isolated from red blood cells", *The Journal of Biological Chemistry*, 103:521-529.
- [66] Hunt, J.A. and Fierke, C.A., (1997). "Selection of carbonic anhydrase variants displayed on phage. Aromatic residues in zinc binding site enhance metal affinity and equilibration kinetics", *J. Biol. Chem.*, 272 20364-20372.
- [67] Hunt, J.A., Ahmed, M. and Fierke, C.A., (1999). "Metal binding specificity in carbonic anhydrase is influenced by conserved hydrophobic core residues", *Biochemistry*, 38:9054-9062.
- [68] Nicholls, D.G., (2005). "Mitochondria and calcium signaling", *Cell Calcium*, 38:311-317.

- [69] Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A.S., Sikka, S.S. and Li, M., (2008). "Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling", *World Journal of Gastroenterology*, 14:4984-4991.
- [70] McCall, K.A. and Fierke, C.A., (2004). "Probing determinants of the metal ion selectivity in carbonic anhydrase using mutagenesis", *Biochemistry*, 43:3979-3986.
- [71] Lindskog, S. and Nyman, P.O., "Metal-Binding Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases", *Biochim. Biophys. Acta.*, 85:462-474.
- [72] McCall, K.A. and Fierke, C.A., (2000). "Colorimetric and fluorimetric assays to quantitate micromolar concentrations of transition metals", *Anal. Biochem.*, 284:307-315.
- [73] Thompson, R.B., Cramer, M.L. and Bozym, R., (2002). "Excitation ratiometric fluorescent biosensor for zinc ion at picomolar levels", *J. Biomed. Opt.*, 7 555-560.
- [74] Laity, J.H., Lee, B.M. and Wright, P.E., (2001). "Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11(1):39-46.
- [75] Fierke, C.A. and Thompson, R.B., (2001). "Fluorescence-based biosensing of zinc using carbonic anhydrase" *Biomaterials*, 14(3-4):205-222.
- [76] Thompson, R.B., Maliwal, B.P. and Zeng, H.H., (2000). "Zinc biosensing with multiphoton excitation using carbonic anhydrase and improved fluorophores", *J. Biomed. Opt.*, 5(1):17-22.
- [77] Forster, T., (1948). "Intermolecular energy migration and fluorescence (Ger.)", *Annalen der Physik*, 2:55 - 75.
- [78] Outten, C.E. and O'Halloran, T.V., (2001). "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis, ", *Science*, 292(5526):2488-2492.
- [79] Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y., (2002). "A monomeric red fluorescent protein", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(12). 7877-7882.

- [80] Vinkenburg, J.L., Nicolson, T.J., Bellomo, E.A., Koay, M.S., Rutter, G.A. and Merx, M., (2009). "Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn(2+) homeostasis", *Nat. Methods*.
- [81] McCall, K.A. and Fierke, C.A., (2004). "Probing determinants of the metal ion selectivity in carbonic anhydrase using mutagenesis", *Biochemistry*, 43:3979-3986.
- [82] Eide, D.J., (2006). "Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1763:711-722.
- [83] Protein Data Bank,  
[http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general\\_information/about\\_pdb/index.html](http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/about_pdb/index.html), 2 Tem. 14.
- [84] Berman, H.M., (2008). "The Protein Data Bank:a historical perspective", *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* A64 (1):88-95.
- [85] Schymkowitz, J., Rousseau, F., Martins, I.C., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F. and Serrano, L., (2005). "Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102.
- [86] Guerois, R., Nielsen, J.E. and Serrano, L., (2002). "Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations", *J. Mol.Biol.* 320:369-87.
- [87] Tokuriki, N., Stricher, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. and Tawfik, D.S., (2007). "The stability effects of protein mutations appear to be universally distributed", *J. Mol. Biol.* 369:1318-1332.
- [88] The Gene Ontology Consortium, (2008). "The Gene Ontology project in 2008", *Nucleic Acids Res.* 36.
- [89] Smith, B., Ashburner, M., Rosse, C., Bard, J., Bug, W., Ceusters, W., ... and Lewis, S., (2007). "The OBO Foundry: coordinated evolution of ontologies to support biomedical data integration", *Nature biotechnology*, 25(11):1251-1255.
- [90] Diehl, A.D., Lee, J.A., Scheuermann, R.H. and Blake, J.A., (2007). "Ontology development for biological systems: immunology", *Bioinformatics*, 23(7):913-915.

- [91] Autodock, <http://autodock.scripps.edu/>, 2 Tem. 14.
- [92] Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., & Ferrin, T.E., (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*", 25(13):1605-1612.
- [93] UCSF Chimera, <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>, 2 Temmuz 2014.
- [94] PyMOL, <http://www.pymol.org/>, 2 Temmuz 2014.
- [95] Franke, S., Herfurth, J. and Hoffmann, D., (2010). "Estimating affinities of calcium ions to proteins", *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 2:1-6.

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** :Recep ADIYAMAN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** :1990 Güngören  
**Yabancı Dili** :İngilizce  
**E-posta** :recepadiyaman2244@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Fizik	Trakya Üniversitesi	2013
Lisans	Fizik	Trakya Üniversitesi	2011
Lise	Sayısal	Orhan Cemal Fersoy Lisesi	2007

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013	Namık Kemal Üniversitesi	Uzman

## YAYINLARI

### Bildiri

1. Adıyaman, R., Yılmaz, A., Yücesan, G., (2014). "Geçiş Metal İyonlarının Konsantrasyonunun Saptanması İçin Kısa Peptidlerin Dizaynı ve Sentezi", 1.Ulusal Biyosensör Kongresi, Tekirdağ