



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**G₀ PROTEİNİ BETAGAMA ALT BİRİMİNİN ETKİLEŞTİĞİ
OLASI EFEKTÖRLERİN BİYOİNFORMATİK
ARAÇLARLA BELİRLENMESİ**

GONCA GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. CEVDET NACAR

İSTANBUL
2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**G₀ PROTEİNİ BETAGAMA ALT BİRİMİNİN ETKİLEŞTİĞİ
OLASI EFEKTÖRLERİN BİYOFİZİK
ARAÇLARLA BELİRLENMESİ**

GONCA GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. CEVDET NACAR

İSTANBUL
2015

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyofizik
Tez Sahibi : Gonca Güzel
Tez Başlığı : Go Proteini Betagama Alt Biriminin Etkileştiği Olası Etektörlerin Biyoinformatik Araçlarla Belirlenmesi
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D
Sınav Tarihi : 26.06.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

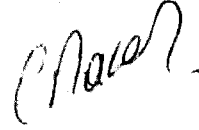
Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd. Doç. Dr. Cevdet NACAR

Kurumu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.B.D

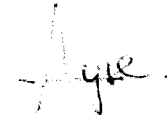
İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Ayşe İNHAN GARIP

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik A.B.D



Yrd. Doç. Dr. Burak AKSU

Marmara Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi
Mikrobiyoloji A.B.D



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06/07/2015 tarih ve 60 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

GONCA GÜZEL

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca ve tezimin her aşamasında engin bilgi birikimini benimle sabırla paylaşan ilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım **Yard. Doç. Dr. Cevdet NACAR**'a;

Yaşadığım erasmus deneyimim sırasında beni ekibine kabul ederek her türlü olanağı sunan **Prof. Dr. Paolo CARLONI**'ye akademik alanda edindiğim tecrübelerime büyük katkı sağlayan **Dr. Xiaojing Cong, Dr. Pablo Campomanes, Dr. Rodrigo Casasnovas Perera** başta olmak üzere tüm Computational Biomedicine section at the Institute of Advanced Simulation (IAS-5) and at the Institute of Neuroscience and Medicine (INM-9) and Computational Biophysics at the German Research School çalışanlarına;

Sadece bir odayı paylaşmakla kalmayıp aynı zamanda hayatı tüm yönleriyle paylaştığımız başta sevgili hocam **Arş. Gör. Dr. Banu AYDIN** ve tüm oda arkadaşlarıma;

Bölüme başladığım ilk günden itibaren güler yüzleriyle yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen, değerli hocalarım **Doç. Dr. Ayşe GARİP İNHAN**'a, **Doç. Dr. Hulya CABADAK**'a, **Doç. Dr. Oya ORUN**'a, **Yard. Doç. Dr. Pınar Mega TİBER**'e ve **Selma BOZKURT**'a;

Benim bu günlere gelmem için harcadıkları çaba ile birlikte; verdiğim her kararda, attığım her adımda bana saygı gösteren ve her konuda beni destekleyen annem **Reyhan GÜZEL**, babam **Ayduan GÜZEL** kız kardeşlerim **Ash GÜZEL** ve **Pınar GÜZEL**'e

Kendisini tanıdığım günden bu yana hayatıma kattığı anlamla birlikte desteğini her zaman yanımda hissettiğim **Dr. Erol YILDIRIM** 'a;

Ev arkadaşı olmaktan hep mutluluk duyduğum **Bilge KENAR**'a

Tez çalışması sırasında bilgisayar olanaklarında yararlandığım Marmara Üniversitesi GEMHAM birimine

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. G Proteinleri.....	4
4.1.1. α Alt Birimi.....	4
4.1.2. $\beta\gamma$ Alt Birimi.....	8
4.2. G Proteiniyle Kenetli Reseptörler (GPCR).....	11
4.3. Efektör Proteinleri.....	13
4.3.1. Fosfolipaz C.....	13
4.3.2. Kir/GIRK (G protein-Gated inwardly rectifying K+) proteini	14
4.3.3. Adenilaz Siklaz.....	14
4.4. Moleküler Dinamik Simülasyon	15
4.4.1. Moleküler Dinamik Simülasyonlarda Kuvvet Alanları.....	16
4.4.1.1. CHARMM Kuvvet Alanı	18
5. YÖNTEM	20
5.1. BLAST	21
5.2. Benzeşim Modellemesi ve MODELLER Programı	22
5.3. NAMD24	
5.4. Docking Simülasyonu	24
6. BULGULAR	26
6.1. Multiple Alignment.....	26
6.2. Benzeşim Modellemesi	31
6.3. Moleküler Dinamik Simülasyonu	35

6.4. Docking Simülasyonu	35
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
8. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1 : Alfa alt birimi heliks ve GTPaz domeinlerinden oluşur.	6
Şekil 2 : G proteinin aktif ve inaktif durumunda RGS proteini ile etkileşimi. (Siderovski ve Willard; 2005).....	7
Şekil 3 : $\beta\gamma$ alt birimi	8
Şekil 4 : Hücre içerisinde $\beta\gamma$ alt biriminin dağılımı.....	10
Şekil 5 : G proteinin aktif olmayan ve aktif durumları.....	12
Şekil 6 : Moleküler Dinamik Simülasyonda kullanılan kuvvetler, kuvvetlerin denklemleri ve grafikleri.....	17
Şekil 7 : Amino asitlerdeki R grup yapısının Charm22 kuvvet alanı altındaki atom değişimleri.....	19
Şekil 8 : Efektör proteinlerini olan Kir proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu.....	27
Şekil 9 : Efektör proteinlerini olan Adenilaz Siklaz proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu	28
Şekil 10 : Efektör proteini olan ATP-sensitive inward rectifier potasyum kanal proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu	29
Şekil 11 : Efektör proteini olan Fosfolipaz C β proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu	30
Şekil 12 : Oluşturulan 50 modelin dope skor grafiği.....	31
Şekil 13 : Fosfolipaz C beta için oluşturulan Kalıp ve modelin karşılaştırılması	32
Şekil 14 : Olası efektör Fosfolipaz C β proteinin benzeşim modellemesi sonucu elde edilen modeli.....	32
Şekil 15 : Kir 3.4(GIRK4) için oluşturulan kalıp ve modelin karşılaştırılması.....	33
Şekil 16 : Olası efektör Kir 3.4(GIRK4) proteinin benzeşim modellemesi sonucu elde edilen modeli	33
Şekil 17 : Fosfolipaz C beta proteininin Ramachadran grafiği.....	34
Şekil 18 : Kir 3.4(GIRK4) proteinin Ramachadran grafiği	34
Şekil 19 : Fosfolipaz C beta proteininin moleküler dinamik simülasyonu sulu ortama 300K de 2 ns olarak gerçekleştirildi.	35
Şekil 20 : Kir 3.4(GIRK4) modelinin Docking Simülasyonu sonucu elde edilen olası bağlanma şekli ve bağlanma enerjisi	36
Şekil 21 : Fosfolipaz C beta modelinin Docking Simülasyonu sonucu elde edilen olası bağlanma şekli ve bağlanma enerjisi.....	37

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 : G proteinlerinin α alt birimine ait protein aileleri, dokularda bulunma yerleri ve etkileştikleri olası efektörler	5
Tablo 2 : Charm22 ve Charm27 karbon, azot, oksijen ve hidrojen için farklı atom çeşitlerine ilişkin örnekler.....	18
Tablo 3 : Tez çalışması sırasında izlenen yöntem.....	20

1. ÖZET

Go Proteini Betagama Alt Biriminin Etkileştiği Olası Efektörlerin Biyoinformatik Araçlarla Belirlenmesi

Öğrencinin Adı: Gonca GÜZEL

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Cevdet NACAR

Anabilim Dalı: Biyofizik

Amaç: Sinyal iletisinde görev alan G proteini $\beta\gamma$ alt biriminin etkileştiği efektör proteinlerin bir kısmı belirlenmiş olmasına karşın, elde edilen deneysel bulgular eksik ve yetersizdir. Bu çalışmada, $\beta\gamma$ alt biriminin etkileştiği efektör proteinler ve bu proteinlerle olası etkileşimleri hesaplamalı yöntemlerle belirlenmeye amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Tez çalışması kapsamında öncelikle olası efektör proteinlerin amino asit dizileri elde edilmiş, bu diziler çoklu olarak hizalanmış ve spesifik motifler araştırılmıştır. Bu veriler kullanılarak veri tabanlarından benzer proteinler belirlenmiştir. Üçüncül yapısı bilinmeyen proteinlerin üçüncül yapısı benzeşim modellemesi ile elde edilmiştir. Elde edilen yapılar sulu ortamda moleküler dinamik simülasyon yöntemi kullanılarak iyileştirilmiştir. Daha sonra bu yapıların $\beta\gamma$ alt birimi ile etkileşimi docking yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Bulgular ve sonuçlar: Docking simülasyonu sonrasında elde edilen veriler, olası bazı efektör proteinlerin $\beta\gamma$ alt birimi ile etkileşime girme potansiyelleri olduğunu düşündürmektedir. Bu potansiyel etkileşimlerin deneysel yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: G proteini, docking simülasyonu, moleküler dinamik simülasyon, benzeşim modellemesi.

2. SUMMARY

Investigating the Interactions between Beta-Gamma Subunit of Go Protein and its Candidate Effector Proteins by Bioinformatics Tools

Student's Name/Surname: Gonca GÜZEL

Supervisor: Asst. Prof. Cevdet NACAR

Department: Biophysics

Aim: Although potential effectors that interact with $\beta\gamma$ subunits of G proteins in signal transduction are partially known, experimental findings are not enough to elucidate the complete interactions. The aim of this study is to determine the other probable effectors of $\beta\gamma$ subunits of G protein and the interactions between $\beta\gamma$ subunits and effector proteins using computational methods.

Materials and methods: During the study, amino acid sequences of potential effector proteins were obtained and aligned by multiple alignment tools to determine the specific motifs in the protein family. Using these data, similar protein sequences were obtained from biological databases. The tertiary structure of effectors was determined using homology modeling and refined by molecular dynamics simulation. Then possible interactions between Go protein and effector proteins were studied using docking simulation method.

Results and conclusions: Results obtained from docking simulations point out some specific interactions between Go protein and effector proteins. All these potential interactions need to be confirmed by experimental studies.

Keywords: G protein, docking, molecular dynamics simulation, homology modeling.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İletişim kurabilmek tüm canlıların temel gereksinimlerinden bir tanesidir. Tek hücreli canlılardan çok hücreli karmaşık organizmalara kadar canlıların tümü yaşamlarını devam ettirebilmek için iletişim kurmaya ihtiyaç duyarlar. Bu iletişim şekli canlıların yapılarına, çeşitlerine ve şekillerine göre farklılık göstermektedir. Hücreler arasındaki iletişim şekline sinyal iletisi denilmektedir.

Sinyal iletisi, hücreye dışarıdan gelen bir uyarının hücre tarafından algılanması, bu uyarının hücre içine iletilmesi ve gelen uyarıya göre hücrede cevap oluşması şeklinde meydana gelen ve giderek karmaşıklaşan bir reaksiyonlar zinciridir. Sinyal iletisinin temel elemanları olan reseptörler, Guanin-nükleotidi bağlayan protein (G proteini) ve efektör proteinleri hücreye dışarıdan gelen sinyaller için bir çeşit açma-kapama anahtarı olarak görev yapmaktadır.

Hücre içine giren sinyalin doğru bir şekilde anlam kazanması ve gerçekleşmesini sağlayan reaksiyon zincirinin temel halkalarından birini G proteinleri oluşturmaktadır (Raymond, 1994). G proteinlerinin tat, koku, görme gibi duyularımız tarafından algılanan çevresel verilerin işlenmesi, bazı hormonal uyarılarla hücrenin uyarılması gibi pekçok işlevde rol aldığı bilinmektedir (Milligan and Kostenis 2006). Sinyal iletisinde oldukça önemli role sahip olan G proteinlerinin yapı ve işlevlerindeki bozukluklar da önemli hastalıklara neden olmaktadır (Saggerson 1992).

G proteini çeşitlerinden biri olan G_o proteini çoğunlukla merkezi sinir sisteminde bulunmasına karşın işlevi tam olarak belirlenmemiştir. G_o proteininin etkileştiği efektör proteinlerinin saptanması, ilgili yolak ve yolağın görev aldığı fizyolojik ve biyokimyasal işlevlerin belirlenmesinin önünü açacaktır. Bu tez çalışması kapsamında G_o proteininin etkileştiği olası efektör proteinler biyoinformatik ve hesaplamalı yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. G Proteinleri

Membranın seçici geçirgen yapısından dolayı hücreye dışarıdan gelen bir sinyalin hücre içine iletilmesi doğrudan gerçekleşmemektedir. İletilmek istenilen sinyal ancak bir aracılı sistem sayesinde aktarılmaktadır. Bu aracılı sistem de sinyal iletili sırasında membrana gömülü olarak bulunan G-proteini kenetli reseptörler (G protein-coupled receptors[GPCR]) ile sağlanmaktadır. G proteinleriyle birlikte çalışan GPCR'lar ile gerçekleşen sinyal iletili, aracılı transmembran sinyal iletimi olarak da ifade edilmektedir. Hücre içinde bulunan G proteinleri, membrana gömülü olarak bulunan GPCR ile kenetli olarak çalışır. Hormon bağlı reseptör aktivasyonu sonucu GTP, GDP ile yer değiştirir. GTP bağlanması ile meydana gelen yapısal değişim sonucunda heterotrimerik G proteini etkinleşir ve alt birimlerine ayrılır. Bu alt birimler daha sonra kendilerine ait efektörlerle etkileşirler (Patel ve ark., 2001).

Heterotrimerik G proteinleri 37-42 kDa moleküler ağırlıkta, bir guanin nükleotid-bağlanma cebi ile GTP bağlayan ve bu GTP'yi hidroliz edebilme yeteneğine sahip içsel GTPaz aktivitesine sahip bir α alt birimi, 35 kDa moleküler ağırlıkta β alt birimi ve 8-11 kDa moleküler ağırlıkta γ alt birimine sahiptir. Beta ve gama altbirimleri birbirlerinden ayrılmayan bir kompleks halinde ve genellikle tek bir yapı birimi gibi yani, bir dimer gibi bulunurlar (Entschladen ve ark., 2011).

G proteinleri ilk olarak 1960 yılında Martin Rodbell tarafından glukagon etkileşimlerinin incelenmesi ile ilgili deneyleri sırasında keşfedilmiştir (Birnbaumer ve Rodbell, 1969). Bu keşifle birlikte G proteinleri üzerinde yapılan araştırmalarda ivme kazanmıştır. G proteinleri 1977 yılında Ross ve Gilman'ın gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucu GTP bağlayan bir protein olarak saflaştırılıp karakterize edilmişlerdir. İlk zamanlarda N_s olarak isimlendirilen G_{α_s} , karakterize edilen ilk G proteini olmuştur. G proteinleriyle ilgili yaptıkları bu çalışmalarından ötürü 1994 yılında Gilman ve Rodbell Tıp ve Fizyoloji alanında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (Ross ve Gilman, 1977).

4.1.1. α Alt Birimi

G proteinlerinde α alt biriminin amino asit dizilerinde benzerlik oranlarına bakıldığında bu oranın % 45-80 civarında olduğu belirlenmiştir. G proteinleri bu dizisel benzerlikler esas alınarak G_s , $G_{i/o}$, G_q , G_{12} olmak üzere 4 aileye ayrılmıştır. G_s ve $G_{i/o}$ aileleri α alt biriminin ilk belirlenen efektörlerinden birisi olan adenilaz siklazı (AC) uyarma (stimulatory) ve inhibe (inhibitory) etmeleri nedeniyle bu isimleri almışlardır. G proteinlerinin α alt biriminin farklı aileler ve dokulardaki dağılımı ile AC ve diğer etkileştiği efektörleri Tablo 1’de gösterilmiştir (Milligan ve Kostenis, 2006).

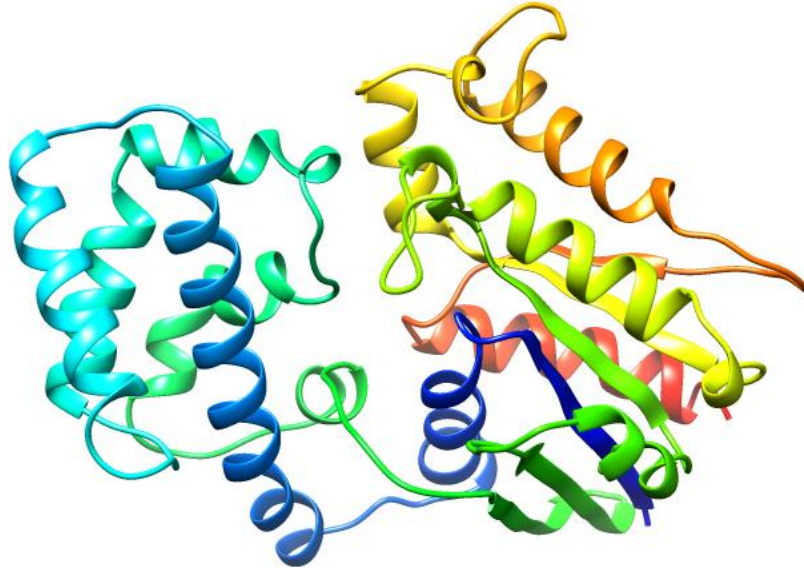
Tablo 1: G proteinlerinin α alt birimine ait protein aileleri, dokularda bulunma yerleri ve etkileştikleri olası efektörler

İsim	Doku	Efektör
<u>α-Altbirimleri</u>		
G_{α_s} ailesi		
G_{α_s}	Her yerde	AC (tüm tipleri) ↑
$G_{\alpha_{sXL}}$	Nöroendokrin	AC ↑
$G_{\alpha_{olf}}$	Koku epilyumu, beyin	AC ↑
$G_{\alpha_{i/o}}$ ailesi		
$G_{\alpha_{i1}}$	Oldukça yaygın	AC (tip I,III,V,VI,VIII,IV) ↓ (Direkt düzenlenme)
$G_{\alpha_{i2}}$	Her yerde	$G\beta\gamma$ aracılığı ile diğer bazı efektörler düzenlenir.
$G_{\alpha_{i3}}$	Oldukça yaygın	Uyarılmış $G_{\alpha_{i3}}$ 'den serbestlenir.
G_{α_o}	Nöronal, nöroendokrin	VDCC ↓, GIRK ↑ ($\beta\gamma$ aracılığı ile)
G_{α_z}	Nöronal, trombositler	AC (e.g., V,VI) ↓ (direkt düzenlenir); Rap1GAP
$G_{\alpha_{gust}}$	Tat hücreleri, saç hücreleri	PDE ↑ ?; ($G\beta\gamma$ aracılığı ile diğer efektörler ?)
$G_{\alpha_{tr}}$	Retinal çubuklar, tat hücreleri	PDE 6 (γ altbirim çubuk) ↑
$G_{\alpha_{tc}}$	Retinal koniler	PDE 6 (γ altbirim çubuk) ↑
$G_{\alpha_{q/11}}$ ailesi		
G_{α_q}	Her yerde	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{11}}$	Hemen hemen her yerde	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{14}}$	Böbrek, karaciğer,	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{15/16}}$	Hematopoitik hücreler	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{12/13}}$ ailesi		
$G_{\alpha_{12}}$	Her yerde	PDZ-RhoGEF/LARG, Btk, Gap1m, cadherin
$G_{\alpha_{13}}$	Her yerde	p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF/LARG, radixin

(Milligan ve Kostenis, 2006).

G_s , $G_{i/o}$, G_q , G_{12} olmak üzere sınıflandırılan, aralarında yapısal ve işlevsel olarak yüksek oranda benzerlik bulunan α alt birimi ailesinin aynı zamanda her bir ailesinin de kendine özgü motifleri bulunmaktadır (Wettschureck and Offermanns, 2005).

$G\alpha$ alt birimi domen olarak tanımlanabilecek iki temel yapıdan meydana gelmektedir. Bunlardan birincisi GTP'nin bağlandığı ve hidrolizlendiği GTPaz domeni olarak adlandırılır. İkincisi ise GTPaz domenine esnek bir şekilde bağlı olarak bulunan helikal domendir (Cabrera-Vera ve ark, 2003).

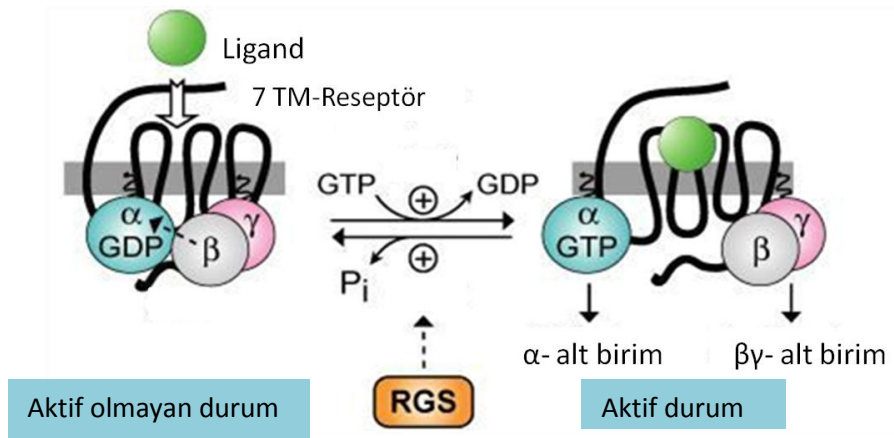


Şekil 1: Alfa alt birimi heliks ve GTPaz domeinlerinden oluşur.

GTPaz ın üçüncül yapısına bakıldığında 5 α -heliks ve 6 β -sheet'ten meydana gelmiş olduğu görülmektedir. GTPaz domeni üzerinde G1, G2, G3, G4 ve G5 olarak adlandırılan 5 anahtar bölge bulunmaktadır ve bu bölgeler evrimsel süreçte çok iyi korunmuştur. Tüm GTPaz çeşitlerine bakıldığında, GTP 'nin bağlandığı bölgede GXGXXGKS, Mg^{2+} 'nin bağlandığı bölgede DXXG, guanin halkasının bağlandığı bölgede NKXD motiflerinin korunduğu gözlenmiştir (Sprang, 1997).

α alt biriminin yapısında bulunan GTPaz domeni, sinyal iletisinde yapısı ilk analiz edilen proteinlerden biri olan ras proteini ile oldukça benzer bir yapıya sahiptir. Bu benzerlik özellikle Mg^{2+} tutunma yeri, guaninin bağlandığı bölgeler ve korunmuş bazı bölgeler üzerindedir (Sprang, 1997).

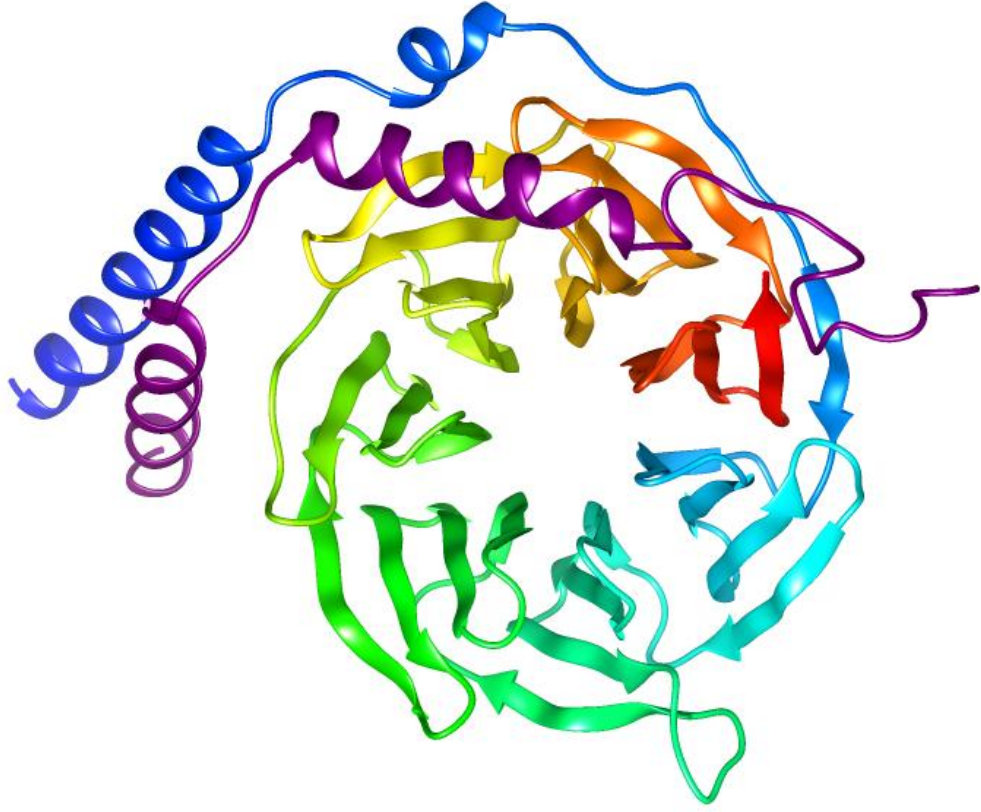
G protein α alt biriminin GTPaz aktivitesi aynı zamanda G-protein-sinyalini düzenleyici proteinler (Regulators of G protein signaling proteins [RGS]) tarafından da düzenler. RGS ailesinin 30'dan fazla üyesi olduğu ve hepsinde ortak olan bir RGS bölgesinin bulunduğu bilinmektedir. Bu bölge α alt birimine bağlanır ve GTPaz'ı uyararak GTP hidroliz hızını düzenler. Normal olarak yavaş olan içsel GTP hidrolizi, bir RGS proteinin bağlanması ile artar ve RGS'ler böylece etkin G protein sinyal süresini kısaltarak pozitif sinyal düzenleyicileri olarak görev yaparlar. RGS protein ekspresyonunda ve işlevinde herhangi bir bozulma, sinyal süresinin uzamasına neden olur (Koelle, 1997).



Şekil 2: G proteinin aktif ve inaktif durumunda RGS proteini ile etkileşimi. (Siderovski ve Willard; 2005)

RGS proteinleri α -alt birimine bağlanarak GTPaz'ın uyarılmasını sağlarlar ve bu sayede de GTP'nin hidroliz hızının kontrol eder. Normal şartlarda düşük hızda gerçekleşen bu olay, RGS proteinleri sayesinde daha hızlı olarak gerçekleşmektedir. RGS proteinlerinde meydana gelen işlevsel bozukluklar GTP hidroliz süresini etkileyeceğinden dolayı sinyal iletiminin süresinde yavaşlamaya neden olur (Dohlman ve Thorner, 1997; Hollinger ve Hepler, 2002).

4.1.2. $\beta\gamma$ Alt Birimi



Şekil 3: $\beta\gamma$ alt birimi

$G_{\beta\gamma}$, β ve γ alt birimlerinden meydana gelmiş dimer yapıda bir moleküldür. $G_{\beta\gamma}$ 'ya ilk bakıldığında β alt biriminin sahip olduğu 7 kanatlı pervane benzeri yapısı dikkat çekmektedir. Her bir kanatta triptofan ve aspartik asit tekrarından oluşan WD motifi bulunmaktadır.

Bu motif yalnızca G_{β} 'ya özgü bir motif değildir. WD tekrarlarından meydana gelmiş proteinlerin ortak bir işlevi bulunmamakla birlikte bu proteinler çoğunlukla birden fazla alt birimden oluşan kompleksler olarak bulunmaktadır (Clapham ve Neer, 1997). β alt birimi 7 defa tekrar eden motifin dışında, N ucunda bulunan ve yaklaşık 20 amino asitten meydana gelmiş bir heliks yapı da içermektedir (Theresa ve ark., 2003). γ alt birimi ise G proteinini meydana getiren alt birimlerden en küçük olanıdır. Bu alt birim sadece α heliks yapıdan meydana gelmektedir.

Memelilerde G_{β} ve G_{γ} alt birimlerinin sentezinde sorumlu gen sayısı *C.elegans* ve diğer basit canlılara göre oldukça fazladır. İnsanda G_{β} altbirimi için β_1 , β_2 , β_3 , β_{3S} ,

β_4 , β_5 , β_{5L} olmak üzere 5 farklı, G_γ için ise G_γ 1-5 ve 7-13 olmak üzere 12 farklı gen bulunur (Hurowitz ve ark., 2000). *C. elegans* ise her bir altbirim için 2 farklı gene sahiptir (Jansen ve ark., 2002). Buna göre evrim süreci boyunca gen duplikasyonu ve bunu izleyen seçilim boyunca yeni ve ayrık fonksiyonlara sahip yeni $G_{\beta\gamma}$ alt birimlerinin oluşmuş olması ve bu yeni gen oluşumunun sadece bazı genlerin açık okuma çerçevesi ile sınırlı kalmamış olması olasıdır. (Bastiani ve Mendel, 2006). Buna rağmen $G_{\beta\gamma}$ çeşitliliği ile ilgili bilgilerimiz henüz tam netleşmemiş olup, daha çok standart sinyal yollarını anlamak üzerine kurulmuştur.

Bu gen çeşitliliğinin farklı $G_{\beta\gamma}$ alt birimlerinin organizasyonu ve transkripsiyon düzenleyici fonksiyonları üzerine etkisi hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. $G_{\beta\gamma}$ alt birimlerinin izole ve karmaşık halde birçok farklı kristal yapısı elde edilmiştir (Lin ve Smrcka, 2011). G_β alt birimlerinde, WD pervane yapısı ve onun G_γ (Sondek ve ark., 1996) ve G_α alt birimleri (Wall ve ark., 1995; Lambright ve ark., 1996) ile birleşmesi çok ses getirmiştir. Tüm bu çalışmalarda $G_{\beta_1\gamma_1}$ veya $G_{\beta_1\gamma_2}$ kullanılmış ve alt birim yapısının ve çeşitliliğinin fonksiyonlarını nasıl etkilediği anlaşılmaya çalışılmıştır. G protein sinyal yolağındaki en küçük proteinler olmasına rağmen en bariz çeşitliliğe sahip G_γ alt birimi bu konuda ayrı bir merak uyandırmıştır

G_γ alt birimlerinin iyi korunmamış 3 bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler N ucu, C ucu ve her iki uçta bulunan heliks parçalarının arasında kalan halkadır. Heliks parçalarının arasında kalan halka dışa doğru, yani göreceli olarak daha iyi korunmuş olan G_β alt biriminden farklı yöne yönelmiştir. Dışa doğru bakan bu halkaların de bu sayede çok sayıda birbirinden farklı ve özgün efektör ile etkileşmesi mümkün hale gelmiştir. Bu şekilde G_γ alt birimleri evrimleşerek, $G_{\beta\gamma}$ alt birimlerinin farklı roller alması için gerekli olan daha fazla sayıda yapısal çeşitliliğe sahip olması mümkün olmuştur (Shahriar ve ark., 2013). G proteinlerinin $G_{\beta\gamma}$ alt birimlerinin farklı aileler ve dokulardaki etkileştiği efektörleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: $\beta\gamma$ alt birimlerinin çeşitleri vücuttaki dağılımları ve etkileştiği olası efektörler

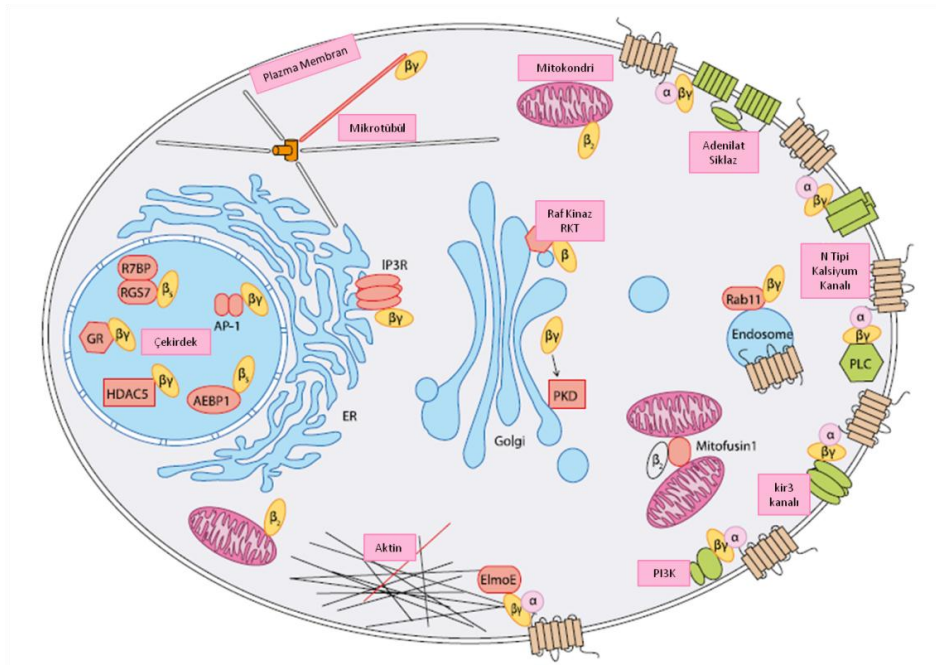
İsim	Doku
β alt birimleri	
β_1	Retinal çubuklar
β_2	Oldukça yaygın
β_3	Retinal koniler
β_4	Oldukça yaygın
β_5	Temel olarak beyin

İsim	Doku
γ Alt birimleri	
γ_1, γ_{rod}	Retinal çubuklar, beyin
γ_{14}	Retinal konikler, beyin
γ_2, γ_6	Yaygın
γ_3	Beyin, kan
γ_4	Beyin ve diğer dokular
γ_5	Yaygın
γ_7	Yaygın
γ_8, γ_9	Koku
γ_{10}	Yaygın
γ_{11}	Yaygın
γ_{12}	Yaygın
γ_{13}	Beyin, tat tomurcukları

$\beta\gamma$ alt birimlerinin Etkileştiği Olası Efektörler

İşlev Azaltıcı ↓	İşlev Arttırıcı ↑
AC tip I	AC tip II, IV, VII
T tip VDCC (Ca 3.2)	PLC- β ($\beta_3, \beta_2, \beta_1$)
R tip VDCC (Ca 2.1-2.3)	GIRK1-4 (kir3.1-3.4)
[G β 2 γ 2]N	Kinazlar (GIRK2ve 3)
P/Q	PI-3-K, β, γ

(Milligan ve Kostenis, 2006).



Şekil 4: Hücre içerisinde $\beta\gamma$ alt biriminin dağılımı

(Khan ve ark, 2013)

4.2. G Proteiniyle Kenetli Reseptörler (GPCR)

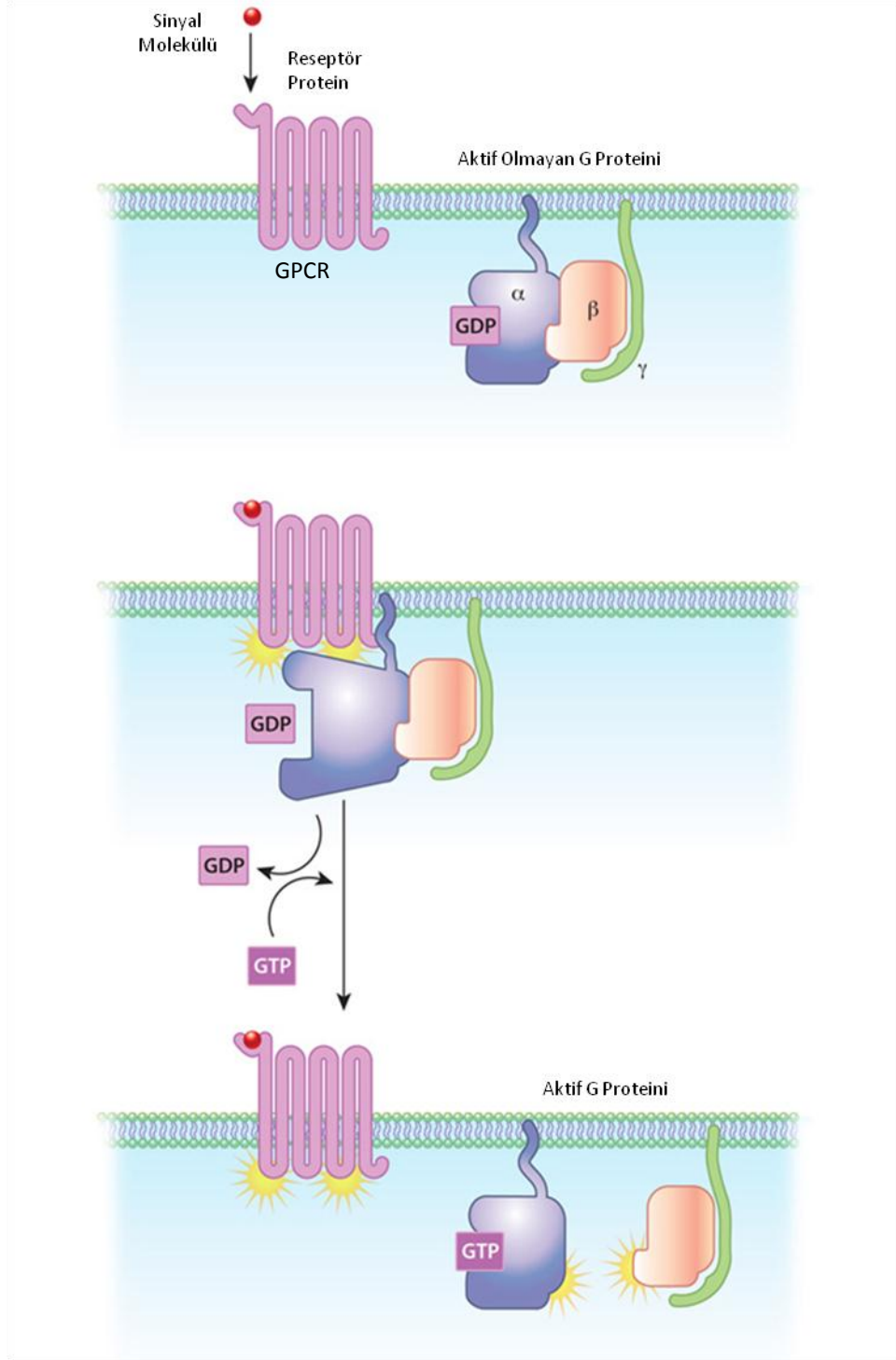
G proteinleri kendisi ile kenetlenerek çalışan bir reseptör aracılığıyla işlev görür. Memeli genomu üzerinde, hücre dışından içeriye doğru sinyalin iletiminin gerçekleşmesinde G proteinleri ile birlikte aracılık görevi yapan ve membranı 7 kez geçerek (7 TM) meydana gelmiş GPCR'ların 1000'den fazla çeşidi bulunmaktadır (Fredriksson ve ark., 2003 ; Lagerström and Schiöth 2008).

Lipidler, biyojenik aminler, peptitler, nükleotidler, koku veya ışık gibi çok farklı yapıda temel uyarın tarafından uyarılabilen GPCR'lar uyarılmanın ardından guanin nükleotitlerini bağlayan heterotrimerik G proteinleri ile kenetlenirler. Reseptörleri ile kenetlenen G proteinler, enzim ve iyon kanalları da dahil olmak üzere bir çok farklı efektörün aktivitesinin düzenlenmesini sağlarlar. Ayrıca GPCR'ler kas kasılması, metabolik işlevler, salgı hızı kontrolü gibi kısa dönemli uyarımlarda rol aldığı gibi, büyüme ve gelişme gibi daha yavaş süreçlerin düzenlenmesinde de görev alırlar.

GPCR reseptörlerin en belirgin özelliği hücreyi çevreleyen membranı 7 kez geçen yapısıdır. Yılana benzeyen bu yapısı sayesinde bu moleküllere serpentin de denilmektedir (Patel, 2004).

GPCR'ların yapısı 4 bölgeye ayrılır. Bunlardan hücre dışında kalan N ucu bölgesi (amino grubu) ligand ile bağlanmanın gerçekleştiği bölgedir. Bu bölgenin amino asit sayısı 7-595 arasında değişmektedir. GPCR'ların hücre zarını geçen her bir parçasına transmembran (TM) denir. Bu TM'ler yaklaşık 20-27 amino asitten oluşmaktadır. C uç bölgesi (karboksil grubu) hücrenin içinde kalarak G proteinleri ile etkileşime giren fosforillenmenin olduğu bölgedir. C uç bölgesi 12-359 amino asit içerebilir. Son bölge ise halka bölgeleridir. Halka bölgeleri hücrenin dışında kalanlar ve içinde kalanlar olmak üzere 2 çeşittir. Halkalar da ortalama 5-230 amino asitten meydana gelmektedir (Ji TH ve ark. 1998).

Hücreye dışarıdan gönderilen bir mesajın GPCR ile etkileşime girmesi sonucu GPCR'ın hücre içine bakan C ucunda yapısal bir değişiklik meydana gelir. Bu değişiklik daha kararlı ya da uyarıcı şekilde bir etki yaratır. İnaktif durumdayken bir arada bulunan G proteininin α , β ve γ alt birimleri ligandın GPCR'da oluşturduğu yapısal değişikliğin tetiklemesiyle $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ olarak iki parçaya ayrılır (Hamm, 1998).



Şekil 5: G proteinin aktif olmayan ve aktif durumları
(Nature Education <http://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471>; 2010)

4.3. Efektör Proteinleri

G proteinlerinin alt birimleri, bir veya birden fazla efektörle etkileşime girmekte, farklı doku ve organlarda eksprese olmakta ve birçok hastalıkta rol almaktadır. Özellikle G $\beta\gamma$ alt biriminin etkileşime girdiği düşünölen efektör ve tez çalışmasına dahil edilen proteinlerinden bazıları şunlardır;

- Fosfolipaz C
- Kir, GIRK (G protein-Gated inwardly rectifying K⁺) proteini
- Adenilaz Siklaz

4.3.1. Fosfolipaz C

Hormon, büyüme faktörü, nörotransmitter, antijen gibi birçok dış uyarının reseptör aracılığıyla etkinleştirdiği fosfolipaz C (PLC) enzimi, fosfotidilinisitol 4,5-bifosfatı (PIP₂) ikincil ulak olarak adlandırılan diacilgliserol (DAG) ve inisitol-1,4,5-trifosfat'a (IP₃) hidrolizler (Harden and Sondek, 2006). DAG bütün normal ve anormal protein kinaz C etkinliklerinden sorumluyken, IP₃ hücre içi kalsiyum salınımını sağlar. Bu iki koldan ilerleyen süreç döllenme, bölünme, farklılaşma ve kemotaksis gibi geniş bir hücre aktivitesine neden olur. Ayrıca fizyolojik olarak tabaka oluşumu ve birikimi, kas kasılması ve hormon salınımı gibi süreçlerde rol alır. PIP₂ seviyeleri PLC tarafından ayarlanarak önemli biyolojik süreçler kontrol edilebilir. Örneğin PLC katalizi ile PIP₂ tüketimi direkt olarak 20'nin üzerinde farklı iyon kanalının aktivesini kontrol eder (Gamper ve ark., 2004; Horowitz ve ark., 2005; Kobrinsky ve ark., 2000; Suh ve Hille, 2005; Yue ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2003).

İnsanda altı farklı sınıftan (PLC- β , - γ , - δ , - ϵ , - η ve - ζ) olmak üzere toplam 13 farklı PLC bulunmaktadır(Harden ve Sondek, 2006).

GPCR'den aldıkları sinyalleri hücre içine ileten G $\alpha_q/11$ ve G $\beta\gamma$ dimerleri, heterotrimerik G-proteinlerden serbest kalarak PLC- β izoformları ile direkt olarak etkileşirler ve aktivasyonlarını sağlarlar. PLC- η_2 ise sadece G $\beta\gamma$ tarafından da tek başına aktive edilebilir (Zhou et al., 2005, 2008). PLC- γ izoformları farklı reseptör ve reseptör olmayan tirozin kinazların fosforilasyonu ile etkinleştirilir. PLC- ϵ gibi birçok PLC ise ras-ilişkili GTPazlardan olan ras, rap ve rho tarafından aktifleştirilir.

PLC- β_2 , β_3 , and γ_2 ise rac tarafından aktive edilir (Harden and Sondek, 2006; Piechulek et al., 2005). PLC- δ ve ζ izoformları için bilinen herhangi bir uyarıcı bulunmamakla birlikte bunlar sadece hücre içi fizyolojik olarak gerekli miktardaki kalsiyuma duyarlıdır.

4.3.2. Kir/GIRK (G protein-Gated inwardly rectifying K+) proteini

GIRK proteinleri, ligandın gelerek GPCR'ı uyarılmasıyla başlayan sinyal ileti zincirinde yer alan, potasyum iyon kanallarından sorumlu efektör ailesi proteinleridir (Dascal N; 1997). Kalpte, merkezi ve çevresel sinir sisteminde yaygın olarak bulunan bu kanal proteinlerin kontrolü GPCR aracılığıyla gerçekleşir. GIRK kanallarının uyarılması G $\beta\gamma$ dimerinin doğrudan bağlanması ile gerçekleşir (Yamada ve ark.; 1998). Literatürde Kir3 proteinlerinin kir3.1(GIRK1), kir3.2(GIRK2), kir3.3(GIRK3) ve kir3.4(GIRK4) olmak üzere 4 alt tipi olmakla birlikte kir3.1 ve kir3.4 için farklı çeşitleri de bulunmaktadır. Kir3.1 ve kir3.3 merkezi sinir sisteminde yer alırken kir3.4 daha çok kalpte bulunmaktadır.

4.3.3. Adenilaz Siklaz

Adenilaz siklaz (AC) adenosin trifosfatın (ATP) adenosin 3-5-monofosfata (cyclic AMP [cAMP]) dönüşümünden sorumlu bir enzimdir. İnsanda çok sayıda izoformu bulunmaktadır (Sunahara ve ark., 1996). Tüm AC izoformları benzer bir yapıya sahiptir. Bir çeşit membran proteini olan AC'ların membrana tutunmalarını sağlayan altı heliks yapıdan meydana gelmiş transmembran parçası bulunmaktadır. Ayrıca hücre zarının sitoplazmik tarafına doğru bakan iki de katalitik domeni (C1 ve C2) bulunmaktadır (Krupinski ve ark., 1989).

Adenilaz siklazın aktivasyonu, cAMP'nin hücre içi üretimine neden olur. Bu üretim hücre yüzeyindeki reseptörlere hormonların bağlanması ile başlatılır (Robison ve ark.,1968). Epinefrin, dopamin, prostaglandin PGE2, adenosin ve glukagon, membran reseptörlerine bağlanarak AC'yi aktive eden birçok proteinden sadece birkaçını oluşturur. Örneğin glukagon karaciğer ve iskelet kasındaki glikojen mekanizmasının düzenlenmesinden sorumlu hormondur ve bu dokularda bulunan membran reseptörlerini tanır. Belirgin bir etki göstererek AC'yi uyarır ve hücre içinde cAMP üretimini sağlar. Glukagon bağlı reseptörler hücre içinde bulunan G

proteinleri ile iletişim halindedir (Gilman, 1987). Buna ek olarak kalsiyum iyonları da bazı AC izoformları için güçlü düzenleyicilerdir (Smit ve Iyengar, 1998). Bu mekanizmada kalsiyum iyonu girişini kontrol eden voltaja-bağlı kalsiyum kanallarını düzenleyen G proteinleri, aynı zamanda AC aktivitesinin de regülasyonunda görev alırlar (Qin ve ark., 1997). AC'lerin yapıları büyük oranda karakterize edilmiş ve nasıl çalıştıklarının anlaşılması ile ilgili önemli aşama kaydedilmiştir. Bu bilgiler sayesinde belirlenen mekanizmaların nasıl işledikleri ve hatta ilaçlara verdikleri tepkiler detaylı modelleme çalışmaları ile teorik yöntemler kullanılarak anlaşılabilir duruma gelmiştir

4.4. Moleküler Dinamik Simülasyon

Moleküler dinamik simülasyon, atomların elektron ve buldukları seviyeler hesaba katılmaksızın, sert küreler olarak kabul edilmesi ve klasik Newton hareket denklemlerinin zamana bağlı sayısal integrasyonu ile yerdeğıştirmelerin belirlenmesidir. Newton denklemleri temel olarak $a = \ddot{r}_i$, yani i parçacığının yerdeğıştirmesinin zamana bağlı ikinci türevi ve U bu parçacığa etki eden toplam potansiyel enerji olmak üzere,

$$m\ddot{r}_i + \nabla_i U = 0$$

denkleminin dayanır. Bu denklemin çok sayıda farklı kuvvet ve parçacık için belli zaman adımları ile belli bir süre boyunca çözümlenmesiyle moleküler dinamik simülasyon gerçekleşir (Rapaport, 1995). Potansiyel enerji eklenebilir olduğundan, çok sayıda parçacık için toplam potansiyel, r_{jk} , j ve k parçacıkları arasındaki uzaklık ve u_{jk} , j ve k parçacıkları arasındaki potansiyel olmak üzere

$$U = \sum_j \sum_{k>j} u_{jk}(r_{jk})$$

formülü ile ifade edilir. Tüm ikili potansiyellerin toplanması ve bir parçacık kümesine etki eden toplam kuvvetlerin sıfır olmasından yola çıkılarak moleküler dinamik simülasyon denklemleri çözümlenir.

$$\mathbf{f}_i = - \sum_{j=1}^N \frac{\partial u_{ij}(r_{ij})}{\partial \mathbf{r}_i} = \sum_{j=1}^N \mathbf{f}_{ij} = 0$$

Moleküler dinamik simülasyonundaki bir diğer temel soru hareket denklemlerinin zaman ilerledikçe nasıl değişeceği. Bu soru 2002 yılında Frenkel ve Smith (Frenkel ve Smit, 2002) tarafından basit Verlet algoritmasının moleküler dinamik simülasyon programlarında kullanılması ile çözülmüştür (Verlet, 1967).

4.4.1. Moleküler Dinamik Simülasyonlarda Kuvvet Alanları

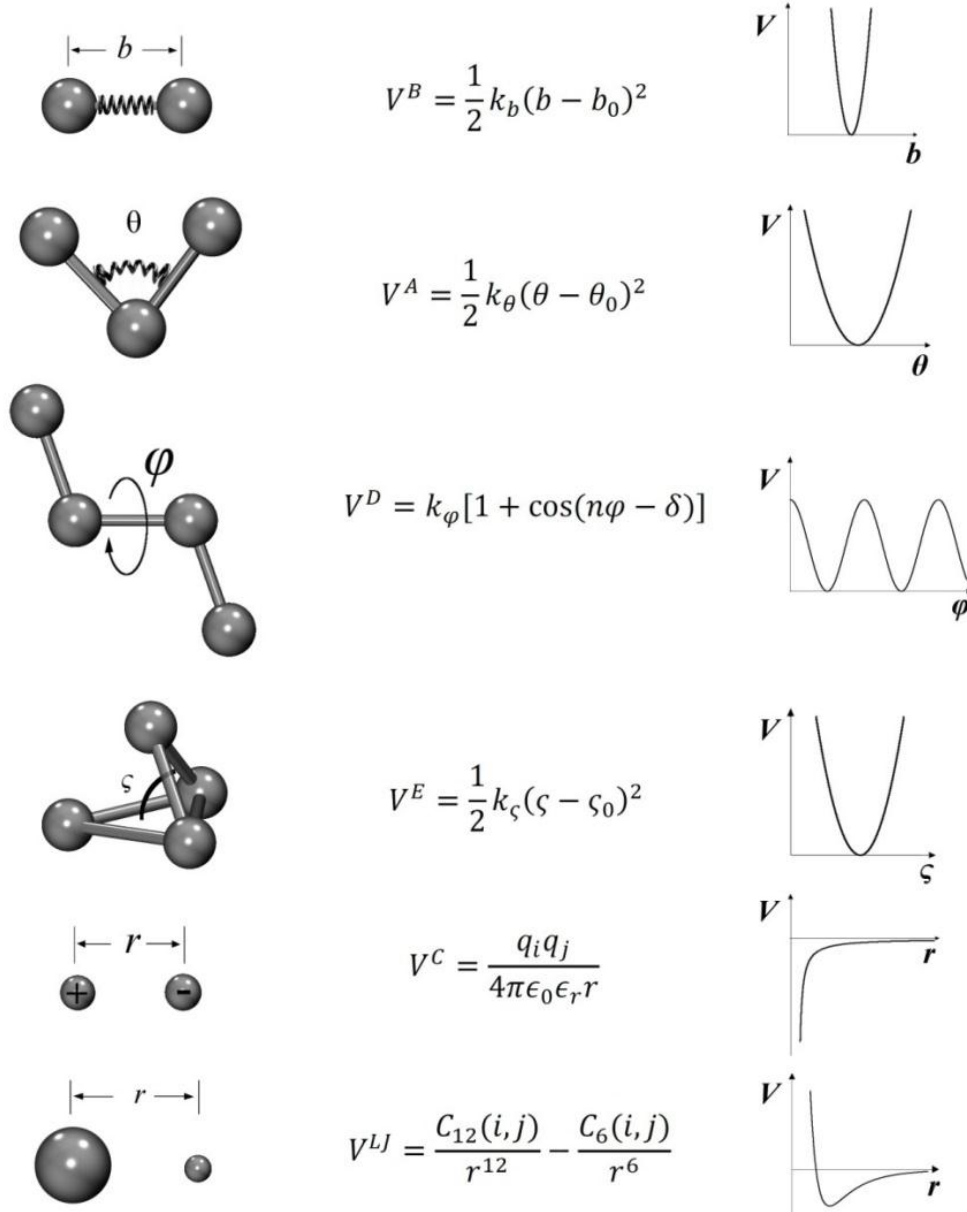
Moleküler dinamik simülasyonlar için, sistemin hareket edeceği potansiyel enerji yüzeyinin tüm unsurlarının tanımlandığı bir kuvvet alanı girdi olarak tanımlanmalıdır. Bu kuvvet alanları, deneysel enerji fonksiyonları ve parametreler olarak programlarda tanımlı dosyalar halinde bulunurlar. Kuvvet alanları Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics (CHARMM) (Brooks ve ark., 1983), ve AMBER (Cornell ve ark., 1995) gibi kendi programları içerisinde kullanılabilecekleri gibi, NAMD (Phillips ve ark., 2005) gibi genel moleküler dinamik programlarına formatlanmış parametreler olarak transfer edilebilirler. Kuvvet alanlarının parametreleri, konformasyonel analizler, oluşum enerjileri, NMR gibi spektroskopik deneyleri veya kuantum mekanik hesaplamalarından elde edilebilirler. Elde edilen potansiyel enerji terimi tüm atomlar ve değişkenler ile yazıldığında bütün potansiyel enerji yüzeyini içeren bir kuvvet alanı elde edilir.

$$V = \sum_{\text{bağ } i} V_i^B + \sum_{\text{bağ açısı } j} V_j^A + \sum_{\text{burulma } k} V_k^D + \sum_{\text{düzlem-dışı } l} V_l^E$$

$$+ \sum_{\text{iki atom } (r,s)} (V_{r,s}^{\text{Coulomb}} + V_{r,s}^{\text{lennard-Jones}})$$

Şekil 6'da tüm kuvvetlerin fiziksel anlamları, denklemleri ve grafikleri verilmiştir. Bağ, bağ açısı ve düzlem-dışı salınımlar harmonik potansiyeller olarak ifade edilmiştir. Burada b_0 iki atom arasındaki denge mesafesi, Θ_0 bağ açısı ve ζ_0

düzlem dışı denge açısını ifade eder. Burulma açıları yani dihedral bükülmeler ise k kuvvet sabitine sahip periyodik bükülmeler olarak verilmişlerdir.



Şekil 6: Moleküler Dinamik Simülasyonda kullanılan kuvvetler, kuvvetlerin denklemleri ve grafikleri

(H.Grubmueller ve ark., 2004)

4.4.1.1. CHARMM Kuvvet Alanı

Micheal Karplus ve grubu tarafından geliştirilen Charmm kuvvet alanı protein, nükleik asit, lipid, membran ve ilaç gibi ligandlar için geniş bir alanda kullanılan biyomolekül kuvvet alanları setinin adı olduğu gibi moleküler dinamik simülasyon kodu ve analiz paketinin de adıdır.(Brooks ve ark., 1983).

Yazılımlarda kullanılması mümkün olan bu kuvvet alanı bu çalışmada NAMD programı içerisinde kullanılmıştır. Peptid ve proteinler için Charmm22 ve DNA/RNA simülasyonları için Charmm27 kuvvet alanları geliştirilmiştir. Karbonhidrat, çözelti, kristal ve membran çalışmaları da başarılı sonuçlar vermiştir.(MacKerell ve ark., 1998; MacKerell ve ark, 2001).

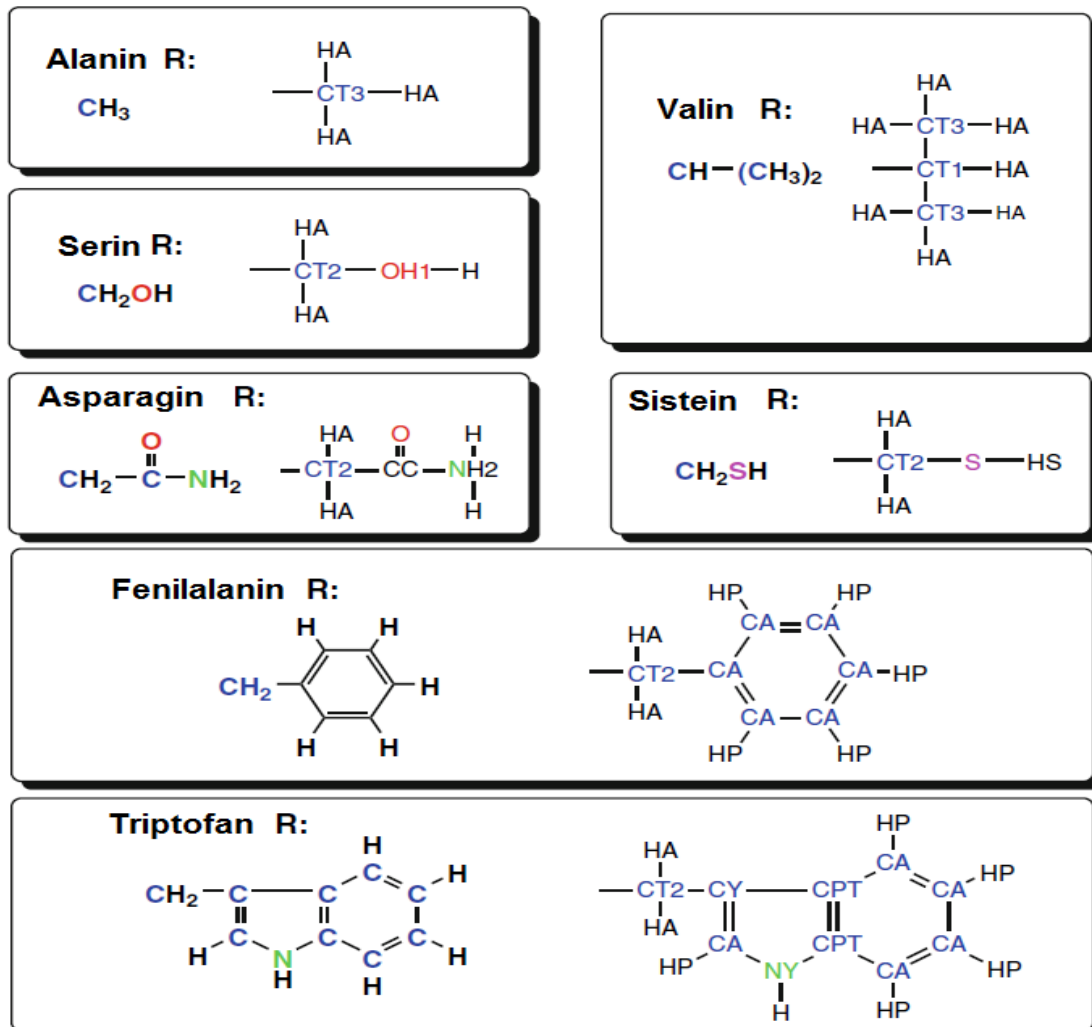
Tablo 2: Charm22 ve Charm27 karbon, azot, oksijen ve hidrojen için farklı atom çeşitlerine ilişkin örnekler.

Karbon	C polar (karbonil, peptid ana zincir) CA aromatik CC karbonil (Asn, Asp, Gln, Glu) CPT halkalararası karbon triptofan CP1, CP2, CP3 özel tetrahedral, prolin CT1 CH'da bulunan alifatik sp ³ CT2 CH ₂ 'de bulunan sp ³ CT3 CH ₃ 'de bulunan sp ³ CN1 nükleik asit karbonik karbonu CN3 nükleik asit aromatik karbonu
Oksijen	O karbonil OC karboksilat OH1 hidroksilat ON6 nükleik asit deoksiriboz halka oksijeni ON6B nükleik asit riboz halka oksijeni
Azot	N prolin NH1 peptid NH2 amid NN1 nükleik asit amid azotu NN2 nükleik asit protonlanmış amid azotu
Hidrojen	H polar HA nonpolar HP aromatik HS tiol hidrojeni HN1 nükleik asit amin protonu HN2 nükleik asit halka amin protonu

(T. Schlick, Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide, Springer- Verlag New York, Inc. Secaucus, NJ, USA, sayfa 256.)

Charmm22 ve Charm27 kuvvet alanında 160 çeşit atom bulunur. 62 çeşit karbon atomu, 31 çeşit hidrojen atomu, 28 çeşit azot, 18 çeşit oksijen, 4 çeşit sülfür, 3 çeşit forfor, 6 çeşit, florin, 1 heme demir ve 7 farklı iyon kuvvet alanı bulunur. Bu da kuvvet alanının ne kadar hassas olduğunun bir başka göstergesidir (MacKerell ve Banavali 2000).

Bu kuvvet alanlarının bazı aminoasitlere uygulanması ile ilgili örnekler (şekil 7) aşağıda verilmiştir. Burada amino asitlerdeki R grup yapısı ve Charm22 kuvvet alanı atandıktan sonraki atom çeşitleri görülmektedir.

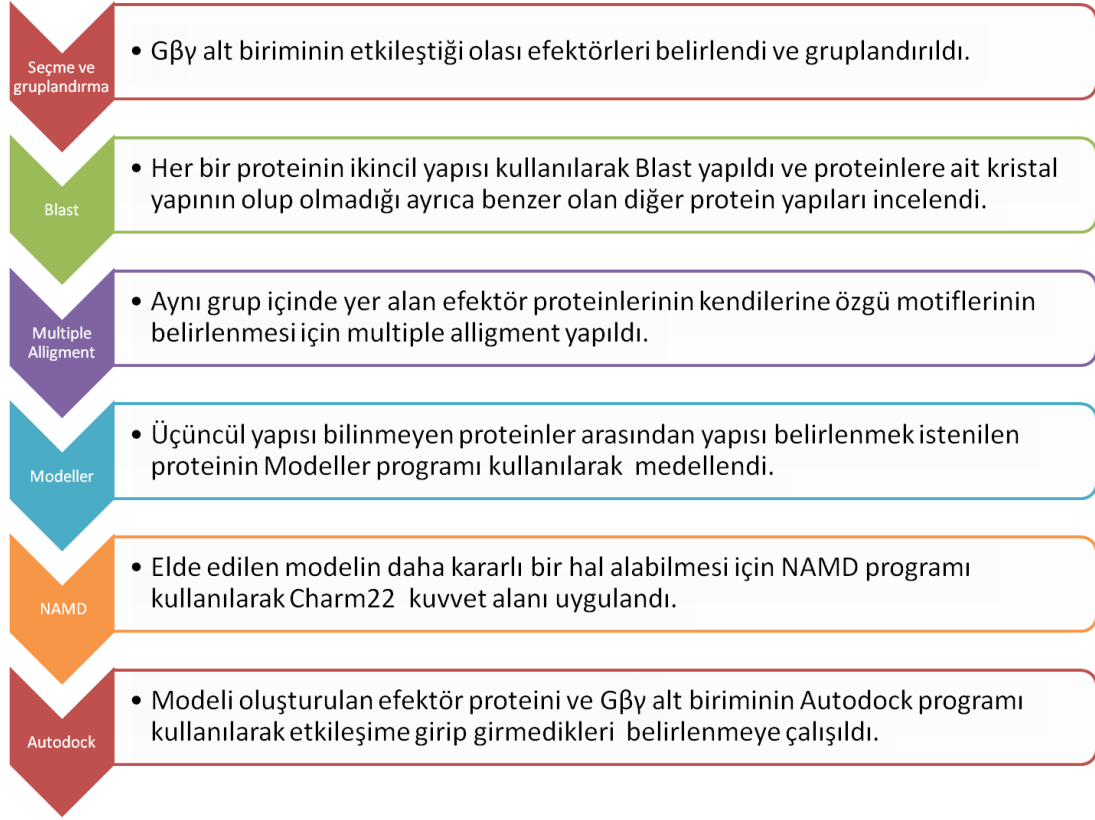


Şekil 7: Amino asitlerdeki R grup yapısının Charm22 kuvvet alanı altındaki atom değişimleri

(MacKerell ve ark., 2004; Schlick, 2002)

5. YÖNTEM

Tablo 3: Tez çalışması sırasında izlenen yöntem



Bu tez çalışması sırasında öncelikle Gβγ alt biriminin etkileştiği olası efektör proteinleri belirlenmiş ve bu proteinler gruplandırılmıştır. Bu işlemler için gerekli veriler <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/gpDB/> (Margarita ve ark., 2008; Elefsinioti ve ark., 2008) internet adresinden elde edilmiştir. Belirlenen proteinlerle dizisel benzerliği olan proteinleri belirlemek amacıyla Blast yapılmıştır. Daha sonra oluşturulan grupların her biri ayrı ayrı çoklu hizalama (multiple alligment) yapılarak aynı grupta yer alan proteinlere özgü motifler belirlenmiştir. Bu motiflerin belirlenmesi üçüncül yapısı bilinmeyen proteinlerin yapılarını belirlenmesi aşamasında ve oluşturulan modellerin doğruluklarının test edilmesi aşamasında kısmen yol gösterici olmuşlardır. Üçüncül yapısı bilinmeyen proteinlerin üçüncül yapıları Modeller yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. Bu elde edilen yapıların daha kararlı bir hale gelebilmeleri için sulu ortamda moleküler dinamik simülasyonları NAMD programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen daha kararlı

yapıdaki proteinlerin Gβγ ile etkileşimi olup olmadığı Autodock programı kullanılarak gerçekleştirilen Doking simülasyon ile incelenmiştir (Tablo 3).

5.1. BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yani temel yerel hizalama araştırma aracı, en çok kullanılan biyoinformatik algoritmalarından olup protein, DNA gibi biyolojik dizilerin karşılaştırılmasını sağlar. Farklı proteinlerin aminoasit dizileri ve farklı DNA nükleotid dizileri bu metot ile karşılaştırılabilir. Bir BLAST araştırması bize sorgulanan bir dizinin, bir kütüphane veya veri tabanında bulunan dizilerle hızlı bir şekilde karşılaştırılmasını ve dizilerin benzerliklerinin belirlenmesini sağlar. Bu benzerlik için kullanıcı tarafından belirlenebilen bir eşik değeri verilir. Bu eşik değerinin üstünde benzerlik gösteren diziler yazılım tarafından belirlenir.

Sorgulanan diziye bağlı olarak farklı BLAST çeşitleri uygulanabilir. Örneğin, bir farenin yeni belirlenen ve daha önce bilinmeyen bir geninin, insanda bir benzerinin bulunup bulunmadığı insan genomu veri tabanı ve bir benzerlik eşik değeri verilerek araştırılabilir. BLAST insanda bulunan yakın dizilimleri, benzerlik değerine göre belirler. Günümüzde kullanılan BLAST, Amerikan Sağlık Enstitüsü tarafından ilk kez 1990'da denenmiştir (Altschul ve ark., 1990). Biyoinformatiğin en temel sorularından biri olan dizi benzerliği sorusuna cevap vermesi sayesinde başarı sağlayan bu metod, günümüzde en fazla kullanılan dizilim araştırma metoduna dönüşmüştür (Casey, 2005).

BLAST algoritmaları dizilimler arasında yerel benzerlik gösteren bölgeleri bulmasının yanı sıra, aynı zamanda nükleotid ve protein veri tabanı ve kütüphanelerini araştırarak bulduğu benzer ve uyuşan eşleşmelerin ve dizilimlerin istatistiksel anlamlılığı ve benzerlik dağılımı gibi sonuçlar da vermektedir. BLAST bu şekilde birden fazla dizilimin fonksiyonel ve evrimsel ilişkileri hakkında sonuç çıkarmamıza ve aynı zamanda gen ailelerinin üyelerini tanımlamamıza yardımcı olur.

BLAST sezgisel (heuristic) algoritması sayesinde diğer yaklaşımlardan daha hızlı bir şekilde sonuç vermektedir. Tahmin ve benzerlik algoritmalarında hız, algoritmanın pratik kullanımı açısından çok önemli bir faktördür. Çünkü ancak bu şekilde ulaşılabilen çok büyük genom veri tabanı havuzları taranarak sonuç alınabilir. BLAST'tan önce Lipman ve Pearson tarafından geliştirilen FASTA yaygın olarak kullanıma girmişti (Lipman ve Pearson 1985). BLAST ve FASTA'nın geliştirilmesinden önce ise Smith-Waterman algoritması gibi tüm dizilimleri yerel olarak sırayla tarama sürecine dayalı algoritmalar kullanılmaktaydı ve bu algoritmaların veritabanlarını taraması çok uzun zaman almaktaydı (Smith ve Waterman 1981).

Smith-Waterman benzeri algoritmalar sorgu ve veri tabanından en iyi hizalama benzeri hesaplarda BLAST'tan daha garantili, doğru ve kesin sonuç verseler de, günümüz bilgisayarlarında bile zaman ve hesaplama gücü çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. BLAST hem bu metotlardan hem de FASTA'dan daha fazla hesaplama zamanı verimi sağlar. BLAST dizilimde sadece önemli şablonları tarayarak ve karşılaştırma hassasiyeti ile üstünlük sağlar. Ayrıca yaklaşık dizilim eşleştirmesi gerektiren diğer yazılımlarla birlikte kullanılabilir.

BLAST algoritması Amerikan National Center for Biotechnology Information (NCBI) tarafından sürekli geliştirilmektedir (Oehmen ve Nieplocha 2006). BLAST yazılımını çalıştırmak için bir FASTA veya Genbank formatında dizilim ve bir ağırlık matrisi girdi olarak verilmelidir.

HTML, düz yazı veya XML formatlarında çıktı alınabildiği gibi hizalama başarımlarını göstermeleri olarak bir grafik veya tablo olarak da alınabilir. Bu çıktıda dizilim belirleyici kısımların hizalama başarımları ve ilgilenilen dizilimin hizalama başarımları ve BLAST skorları gibi sonuçlar verilir.

5.2. Benzeşim Modellemesi ve MODELLER Programı

MODELLER v.9.14 (Sali and Blundell 1993) yazılımı kullanılarak benzeşim modellemesi yöntemiyle G proteininin $\beta\gamma$ alt birimi ile etkileştiğini düşündüğümüz efektör proteinlerine ait üçüncül yapılar oluşturulmuştur. Bunun için BLAST sonucuna göre benzer olduğunu düşündüğümüz proteinlerin üçüncül yapıları

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Berman ve ark., 2000; Berman ve ark., 2003) internet adresinden temin edilmiş ve bu proteinlerin dizileri kalıp olarak kullanılarak 50 farklı model oluşturulmuştur. Bu modellerin arasında DOPE skorlarına bakılarak bir değerlendirme yapılmış ve en uygun model seçilmiştir.

Modeller yazılımı benzeşim/karşılaştırma modellemesi yöntemi ile proteinlerin 3-boyutlu yapısını oluşturmaktadır (Eswar ve ark. 2006; Marti-Renom ve ark, 2000).

Üçüncül yapısı bilinen ve yapısını belirlemeye çalıştığımız proteine dizisel benzerlik gösteren protein dizileri yazılıma girdi olarak verilir. Sırasıyla kalıp ve hedef dizileri olarak adlandırılan bu diziler yazılıma girdi olarak verilmeden önce hizalanırlar. Bu hizalamanın kalitesi oluşturulan modelin doğruluğunu belirleyen en önemli faktördür. Modeller bu girdi için 3-boyutlu modeli hidrojen atomları dâhil olmadan hesaplar. Modeller bunu yaparken 3-boyutta mekânsal kısıtlamaları dikkate alır, yani atom-atom çakışmalarını engelleyecek şekilde karşılaştırmalı modeller oluşturarak proteinin yapısını hesaplar (Sali ve Blundell, 1993)

Elde edilen bu modeller homolog yapılardır. Modeller programı ayrıca *de novo/ab initio* modelleme metodu ile olası düğüm ve halka kısımlarının belirlenmesi ve modellenmesi, farklı iyileştirme yöntemleri ile tanımlanan esnekliğe göre geometrik iyileştirme, protein dizilerinin çoklu hizalama ile yapı, kümelenme, veri tabanı araması, protein yapısı karşılaştırması gibi görevleri de yerine getirebilir. (Fiser ve ark. 2000)

Daha genel bir ifade ile yazılıma aminoasit dizisi ve bazen bir ligant diziliminin yanı sıra uzaysal sınırlar girdi olarak verilir. Bu sınırları ve dizilimi en iyi sağlayan çıktı 3-boyutlu bir yapı olarak yazılım çıktısı olur. Uzaysal sınırlar ve engeller birçok farklı kaynaktan elde edilebilir. Bu kaynakların en önemlileri protein yapılarının karşılaştırılmalı modellenmesi, NMR deney sonuçları ve buradan elde edilen detaylar, ikincil yapıların oluşumu ile ilgili bilinen kesin kurallar (kombinatoryonel modelleme), çapraz bağ oluşumu deneyleri, floresans spektrokopisi, elektron mikroskobu ile imaj biçimlendirme, bölge-yönlendirmeli mütajenez, sezgisel yöntemler, rezidü-rezidü ve atom-atom potansiyellerinin ortalama kuvvetleridir. Bu sınırlar dahilinde bir dizilim için bağ uzunlukları, açılar, dönme açıları ve birbirlerine göre durumları ve atomlar tarafından oluşturulabilecek diğer uzaysal davranış

şekilleri elde edilir. Günümüz Modeller sürümleri tüm bu sınırlama ve engelleri sadece hedef yapının hizalanması ve bilinen yapılarla karşılaştırılması ile elde eder.

3-boyutlu model ise, moleküler olasılık yoğunluğu fonksiyonu (pdf) adı verilen bir fonksiyonun en iyi duruma getirilmesi ile elde edilir. Olası uzunluk, açı, dönme gibi bilgileri içeren moleküler olasılık yoğunluğu fonksiyonu değişken hedef fonksiyonu ile Kartezyen uzayda konjuge değişken, moleküler dinamik ve simülasyonlu tavlama (ısıtıp-soğutarak en iyi yapıyı elde etme) gibi değişen yöntemlerle en iyi duruma getirilerek 3 boyutlu bir yapıya dönüştürülür.

5.3. NAMD

Bu çalışmada Modeller yazılımı kullanarak oluşturduğumuz proteinlerin daha düşük enerjili ve kararlı yapılarını elde etmek amacıyla, NAMD (NAnoscale Molecular Dynamics) moleküler dinamik simülasyon yazılımı kullanılmıştır. Charm++ paralel programlama modeliyle yazılan NAMD çok sayıda işlemcide aynı anda yüz binlerce atomun simülasyonuna izin vermektedir. (Phillips ve ark., 2005)

Amerika, Urbana-Champaign'de bulunan University of Illinois Biyofizik grubu tarafından geliştirilen NAMD yazılımı, Visual Molecular Dynamics (VMD) moleküler modelleme ve görselleştirme ve kuvvet alanı geliştirme ve düzenleme amaçlı Force Field Toolkit (ffTK) gibi yan programlarla kullanılabilir. VMD gerekli yapıları ve parametreleri hazırlamak üzere NAMD için bir arayüz görevi görür. (Humphrey ve ark., 1996).

NAMD biyoinformatik araçları ile birlikte verimli bir şekilde kullanılabilen, kuvvet alanı, yapı ve sonuçların transferine izin vermesiyle çalışmalara hız ve esneklik kazandırabilmektedir. Ayrıca simülasyon sonunda ve sırasında yapısal etkileşim ve dönüşümler izlenebilmekte ve analiz edilebilmektedir.

5.4. Docking Simülasyonu

Docking yani kenetlenme bir moleküler modelleme yöntemi olup, bir molekülün başka bir molekül ile kararlı bir kompleks oluşturması sırasında tercih edeceği en yüksek olasılıklı bağlanma pozisyonunun belirlenmesidir. (Lengauer ve Rarey, 1996)

Tercih edilen bağlanma pozisyonları bilgisi elde edilerek, bağlanma gücü ve isteği bir skorlama fonksiyonu olarak verilir.

Sinyal iletiminde birleşmeler çok önemli bir yer tutmaktadır. Etkileşen iki molekülün bağlanma oryantasyonları sadece yapısal bilgi değil, aynı zamanda üretilen sinyalin türünün (agonist-antagonist) anlaşılması açısından da önemlidir. Docking metodu en fazla küçük ilaç adayı moleküllerin protein hedeflerle etkileşim istek ve aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılsa da (Kitchen ve ark. 2004) bu tez çalışmasında olduğu gibi farklı büyüklükteki iki proteinin etkileşiminin anlaşılması için de kullanılmaktadır.

Moleküler docking problemi genel olarak ligandın anahtar, proteinin kilit olduğu bir “anahtar-kilit” probleminin çözülmesidir. (Jorgensen, 1991) Fakat günümüzde hem proteinin hem de ligandın esnek ve konformasyonel değişikliklere uğradığı daha hassas docking metotları mevcuttur. Bu da anahtar-kilit benzetmesinden daha çok eldiven-el benzetmesini doğru kılar (Wei ve ark. 2004). Docking sürecinde hem protein yüzeyinin hem de ligandın konformasyonel ayarlamaların yapıldığı bu docking çalışmaları daha doğru sonuçlar vermektedir.

İki temel docking yaklaşımı bulunmaktadır. Bunlardan ilki proteinin yüzeyinin tanımlanarak şekil tamamlayıcılığının ve topolojinin esas alındığı biçimsel uyumdur (Goldman ve Wipke, 2000; Meng ve ark. 2004). İkincisi ise belirlenen konformasyonel uzaylarda ikili bağlanma enerjilerinin belirlenmesinin esas alındığı simülasyon yöntemidir. (Feig ve ark. 2004)

Bu çalışmada Autodock programı kullanılmıştır. (Morris ve ark. 2009) Autodock programı, olası pozisyonların belirlendiği auto-grid ve bu pozisyonlara ligandın dock edildiği auto-dock yazılımlarından oluşur. Bu programın lineer regresyon analizine dayalı serbest enerji skorlama metodu, bir günde 40000 farklı esnek olmayan pozisyonun denenebildiği hızlı algoritması ile daha önce birçok çalışmada doğru sonuçlar verdiği görülmüştür (Sotriffer ve ark. 2000).

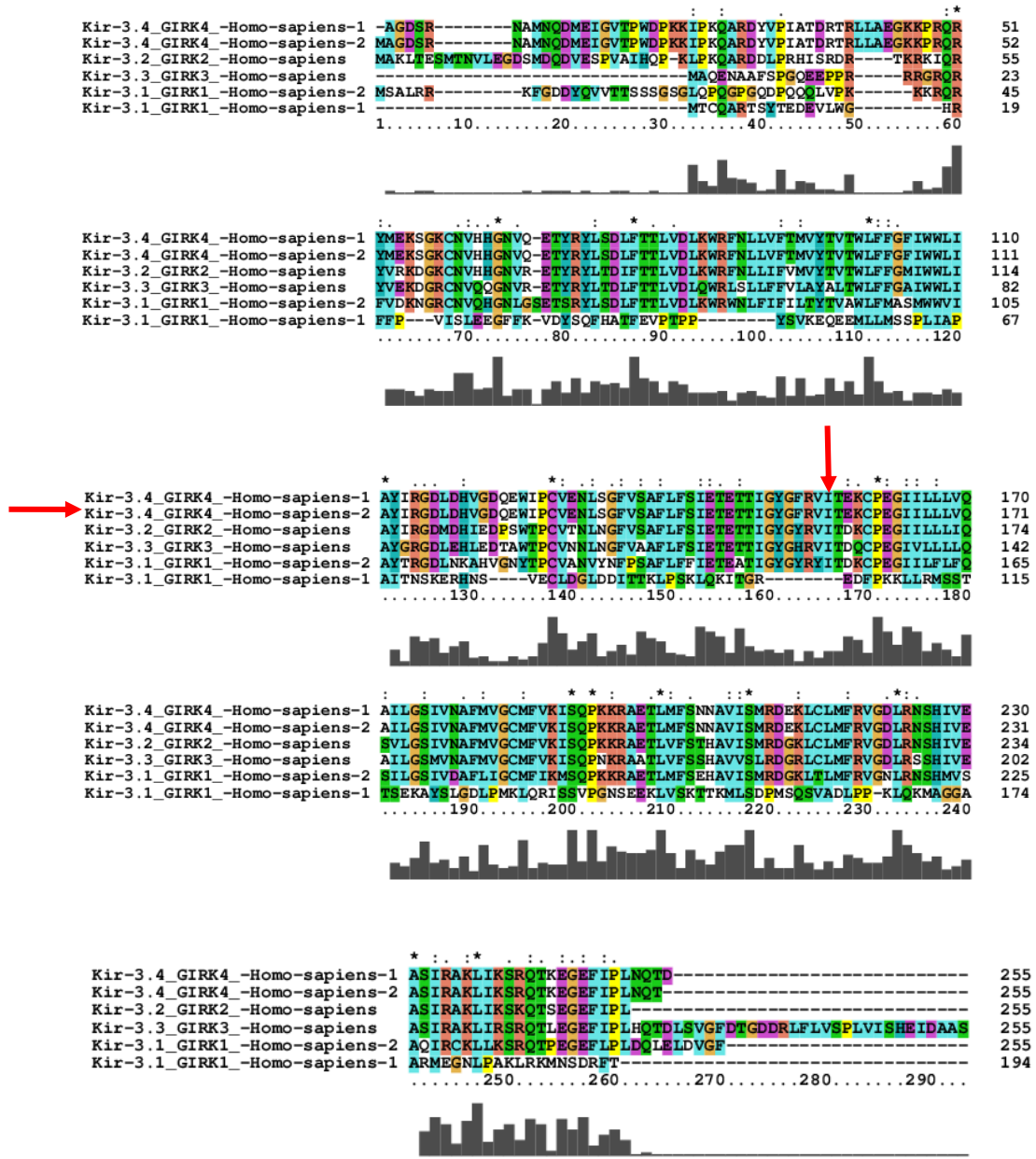
6. BULGULAR

6.1. Multiple Alignment

Gβγ'nın etkileştiğini düşündüğümüz olası efektör proteinlerine ait amino asit dizileri gruplara ayrıldı. Çoklu hizalaması yapılan efektör proteinleri aşağıdaki gibidir.

- ❖ Kir
- ❖ Adenilaz Siklaz
- ❖ ATP-sensitive inward rectifier potasyum kanal
- ❖ Fosfolipaz C β

Kir3 proteinlerinin 6 çeşidi çoklu hizalama yöntemiyle karşılaştırıldı. Buna ait elde edilen bulgular şekil 8'de gösterilmiştir. Adenilaz siklaz proteinlerinin insanda bulunan 9 çeşidi kendi aralarında çoklu hizalama yapıldığında elde edilen bulgular şekil 9' da gösterilmiştir. ATP-sensitive inward rectifier potasyum kanal proteinleri için elde edilen bulgular şekil 10'da, Fosfolipaz C β proteinleri için elde edilen bulgular da şekil 11'de gösterilmektedir. Amino asit dizileri arasında iyi korunmuş rezidüer şekillerin üzerinde görünen “*”, “.” ve “:” simgeleriyle ifade edilmiştir. Diziler arasındaki yüksek benzerlik motiflerin belirlenmesini güçleştirmesine karşın iyi korunan bu rezidüerlerin motif öğeleri olması olasıdır.



Şekil 8: Eftör proteinlerini olan Kir proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu

Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-1 -----MAGAPRGGGGGGGAGEP GGAERAACTSRRRGLRACDEFACPELEALFRGYTL 54
 Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-2 -----MAGAPRGGGGGGGAGEP GGAERAACTSRRRGLRACDEFACPELEALFRGYTL 54
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-1 -----MRRRRYLDRSEEAAGGGDGLP RSRDWLYESVYC 34
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-2 -----MWQEMRRRRYLDRSEEAAGGGDGLP RSRDWLYESVYC 39
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-2 -----MAR--LFSPPRPP-----PPSEDLFYETVYS 22
 Adenylate-cyclase-7-Homosapiens -----MPAKGRYFLNEGEE-----GPDDALYKVKQL 27
 Adenylate-cyclase-6-Homosapiens -----MSWFSGLLVPKVDERKTANGERNQKR SRRRGTRAGGFCFPRYMSCLRDAEPP 53
 Adenylate-cyclase-5-Homosapiens -----MSGSKSVSPFGYAAKTAAPAPRGG-----PEHRSAWCEADSRANGYPH 44
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-1 -----DAER----- 4



Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-1 RLEQAAT--LKALAVLSLLAGALALAE LLGAPGAPGLAKGSHPVHCVLFLALLVNVNVR 112
 Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-2 RLEQAAT--LKALAVLSLLAGALALAE LLGAPGAPGLAKGSHPVHCVLFLALLVNVNVR 112
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-1 -MSCQHP--LIVFLLLVVMGSC LALLAVFFALGLEVEDHVAFLITVPTALAIFFAIFILV 91
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-2 -MSCQHP--LIVFLLLVVMGSC LALLAVFFALGLEVEDHVAFLITVPTALAIFFAIFILV 96
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-2 -LSCQYP--LLLLLLGIVLCAALAVAWASGRELTSDFSLTIVLVCALGGFSLLLGLA 79
 Adenylate-cyclase-7-Homosapiens -TSCHGPF--LLLTLVVAATCVALLIIAIFSQG--DPSRHQAIIIGMAFLVLAFFAALSVLM 83
 Adenylate-cyclase-6-Homosapiens SPTPAGPRPCWQDDAFIRRGPPGKGLGLRAVALGFEDTEVTTAGCTAEVAPDAVPR 113
 Adenylate-cyclase-5-Homosapiens APGGSAR---SSTKKPGGAVTPQQOQLASRWRSDDDDDPPLSGDDPLAGGFGRSFR 98
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-1 SCNHLGT---MVEFAVALGSKLDVINKHSFNNFRLRVGLNHGPEVVAGVIGAKQKQYDIW 60



Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-1 SLEVPQLQVQOLA--LLESLTFALLCCPFALGGPARGSAGAAGGPATAEQGVVQLLLVIT 170
 Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-2 SLEVPQLQVQOLA--LLESLTFALLCCPFALGGPARGSAGAAGGPATAEQGVVQLLLVIT 170
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-1 CIE SVFKLLRLFS--LVIIVCLVAMGYLFMC-----FGGTVSPWDQVSEFFLFI 139
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-2 CIE SVFKLLRLFS--LVIIVCLVAMGYLFMC-----FGGTVSPWDQVSEFFLFI 144
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-2 SREQLRWRRLRPLS--GLVWVALLALGHAFLE-----FGGTVSPWDQVSEFFLFI 127
 Adenylate-cyclase-7-Homosapiens YVECLLRNRLRALA--LLTWAACLVALGYLVVFD-----ANTKAACAWDQVSEFFLFI 133
 Adenylate-cyclase-6-Homosapiens SGRSCWRRLVQVQFKQFRSAKLERLYQRYFQ-----MNOSSLTLLMAVVLVLTAV 165
 Adenylate-cyclase-5-Homosapiens SKSAWQERGGDDCGRGRSRRQRGAAGGSTRAPPAGGGGSAAAAASAGGTEVRSVFR 158
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-1 GNTVNVASRMESIG-----VLGKIQVVEETAWALQSLG 93



Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-1 FVSYALLPVRSLLAICFGLVVAASHLLVTATLVPAK--RPLRWRTLGANALLFVGVNMY 227
 Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-2 FVSYALLPVRSLLAICFGLVVAASHLLVTATLVPAK--RPLRWRTLGANALLFVGVNMY 227
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-1 FVVYTMPLPNMRDAIIASVLTSSSHIIVLSVCLSATPGGKEHLVWQILANVLIIFICGNLA 199
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-2 FVVYTMPLPNMRDAIIASVLTSSSHIIVLSVCLSATPGGKEHLVWQILANVLIIFICGNLA 204
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-2 FTAYAMLPLGMRDAVAVGLASSLHLLVLGLVLPQDPSRFPALLPQLAANAVLFLCGNVA 187
 Adenylate-cyclase-7-Homosapiens FVVYTMPLPNMRDAVAVGAVSTASHLLVLGSLMGGFTTFSVVRVGLQLLANAVLFLCGNVA 193
 Adenylate-cyclase-6-Homosapiens LLAFHAAAPARQFANVALLACAAALFVGLMVVGNRHSFRDSDMVVYVYVVLGILAAVQVG 225
 Adenylate-cyclase-5-Homosapiens GLEERRGKRADELEAGAVEGGGSGDGGSSADSGSAGPFAVLSTGACCLALLQIFRS 218
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-1 YTCYSRGIKVKKGKQCLVFLNLDLRTGPPSATLG----- 130



Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-1 GVEVRILTERSORKAFLOARSCTEDRLR----- 255
 Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-2 GVEVRILTERSORKAFLOARSCTEDRLR----- 255
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-1 ----- 199
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-2 ----- 255
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-2 GAYHKHMLBELAQQTYQDCNCKISRIKLEFEKROERLLLSLLPAHIAME----- 255
 Adenylate-cyclase-7-Homosapiens GVYHKALMERALRAIFREALSLSRRLDTEKKHDEHLLLSILPAYLAREMKAEIMARL 247
 Adenylate-cyclase-6-Homosapiens GAFHKHMDASRDLFTYIVKCIQIRKRLIEKROENLLLSVLPAAHISMGMKLAITERL 253
 Adenylate-cyclase-5-Homosapiens GALAADPRSESAGLWCVFVFIAYTLLPI----- 255
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-1 KKFPSDKLERLYQRYFRINQSLTMLMAVLVLCV----- 255



Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-1 ----- 255
 Adenylate-cyclase-1-Homosapiens-2 ----- 255
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-1 ----- 199
 Adenylate-cyclase-2-Homosapiens-2 ----- 255
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-2 CAGGSRP----- 255
 Adenylate-cyclase-7-Homosapiens KE----- 255
 Adenylate-cyclase-6-Homosapiens ----- 255
 Adenylate-cyclase-5-Homosapiens ----- 255
 Adenylate-cyclase-4-Homosapiens-1 ----- 130

Şekil 9: Eftör proteinlerni olan Adenilaz Siklaz proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu

```

ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-12-HS      MTKASRAKPEYS-----IVSSEEDGLHLVMSGANGPFGNGKWHRR-RCNRFVKKNG 51
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-14-HS      MGIARALRRLGALDSDRAGDDEEAGPGLCRNG---WAPAPVQSPVRRGRGFVKKDG 57
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-11-HS      -MISRKG-----IIPPEYVLRLAED---PAPFRARQRARFVSKKG 40
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-8-HS       -MIAKRS-----IIPPEYVLRARAEEN---LRKPRTRDRLPKARFIAKSG 41
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-1-HS       MNASSRN-----VFDTLIRLVLETSMFKHLRKHVVTRFPGHSRQRARLVKDG 47
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-1    -----MSVAKVYVYQTQTQTE-----SRPLMGFGIRRRVLTKD- 34
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-3    -----MSVAKVYVYQTQTQTE-----SRPLMGFGIRRRVLTKD- 35
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-15-HS      -----MDAIIHGMSTPLVK-----HTAGAGLKANPRVMSKSG 34
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60

```



```

ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-12-HS      QCNIEFANMDKSKQ-RMLADMFTTCVDIRWRYMLLIFSAPLAWLWFLGIFVWVAVAG 110
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-14-HS      HCNVRFVNLGGCGA-RRLSDLFTTCVDVRRWMLLIFSCLASWLLFLGAFWLIASLHG 116
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-11-HS      NCVNAHKNIRECG--RFLQDVFVTLVLDLKWPTLLIFVMSFLCSWLLFAMWLIASFAHG 98
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-8-HS       ACNLAHKNIRECG--RFLQDVFVTLVLDLKWPTLLIFVMSFLCSWLLFAMWLIASFAHG 99
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-1-HS       RCHEFGVVEASRRIETFDVITVLDLKWYKMIETAPFLCGWFFGLLVAVAIYHK 107
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-1    -----SRVNRMEHIADKRF-PMLKDLWTFIDMWRVYKLLLSATFAGWLEFGVWVWLVAVAG 34
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-3    RSNVNRMEHIADKRF-LMLKDLWTFIDMWRVYKLLLSATFAGWLEFGVWVWLVAVAG 94
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-15-HS      HSNVNRDKVDGIYL-LMLKDLWTFIDMWRVYKLLLSATFAGWLEFGVWVWLVAVAG 93
.....70.....80.....90.....100.....110.....120

```



```

ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-12-HS      DLEP-----AEGGRGTPCVMQVHGMAAFLFSEIQTIGYGLRCVIEECPVAVFVM 162
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-14-HS      DLAP-----PPP-----APCFSHVASFLAFLFALEQTIGYGVRSVIEECPAAVAVA 166
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-11-HS      DLAP-----EGCTAEP-----CVTSIHFSAPLFSIEVIVIFGFGGRMVIEECPALAILL 149
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-8-HS       DLIAYMERSGMEKSGLESVVCVTNVRPFSAPLFSIEVIVIFGFGGRMVIEECPALAITVL 159
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-1-HS       DLEPEF-----HPSAHPFCVENINGLSAPLFSIEVIVIFGFGRCVIEECPAIFLL 160
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-1    -----DLELEL-----DPPANHTPCVVQVHTLGAFLFLESQTIGYGFYRISIEECPLAIVLL 34
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-3    -----DLELEL-----DPPANHTPCVVQVHTLGAFLFLESQTIGYGFYRISIEECPLAIVLL 147
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-15-HS      -----DLEPEF-----EPISNHTPCIMKVDLGAFLFLESQTIGYGVRSVIEECPHAIFLL 146
.....130.....140.....150.....160.....170.....180

```



```

ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-12-HS      VAGSIVGCIIDFSFMIGAIMAKMARPKKRAQTLFVSHNAVALRDGKLCMLWRVGNLRKH 222
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-14-HS      VLQCIAGCVLDAFVVGAVMARPKKRNELVFSENAVVALRDRHLCMLWRVGNLRKH 226
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-8-HS       IINIVGLMINAIMLCCIFMKRAQARRAEELIFKRAVIALHSHGLCFMFRVGLRKS 209
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-1-HS       IINIVGLIINAVMLGCFMKRAQARRAEELIFRRAVIAVAKGLCFMFRVGLRKS 219
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-1    IFSILGVIINSEMGAILAKISRPKRAKITFKNAVISKRGKGLCLRIVANLRSL 220
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-3    -----DLELEL-----DPPANHTPCVVQVHTLGAFLFLESQTIGYGFYRISIEECPLAIVLL 34
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-15-HS      LAELVLTILEIFITGTFQAKIARPKKRAEITRFQHAVVASHGKPCMLIRVANMRKSL 207
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-15-HS      LAELVLTILEIFITGTFQAKIARPKKRAEITRFQHAVVASHGKPCMLIRVANMRKSL 207
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-15-HS      VALVLTILEIFITGTFQAKIARPKKRAEITRFQHAVVASHGKGLCLVQVANMRKSL 206
.....190.....200.....210.....220.....230.....240

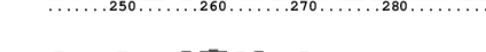
```



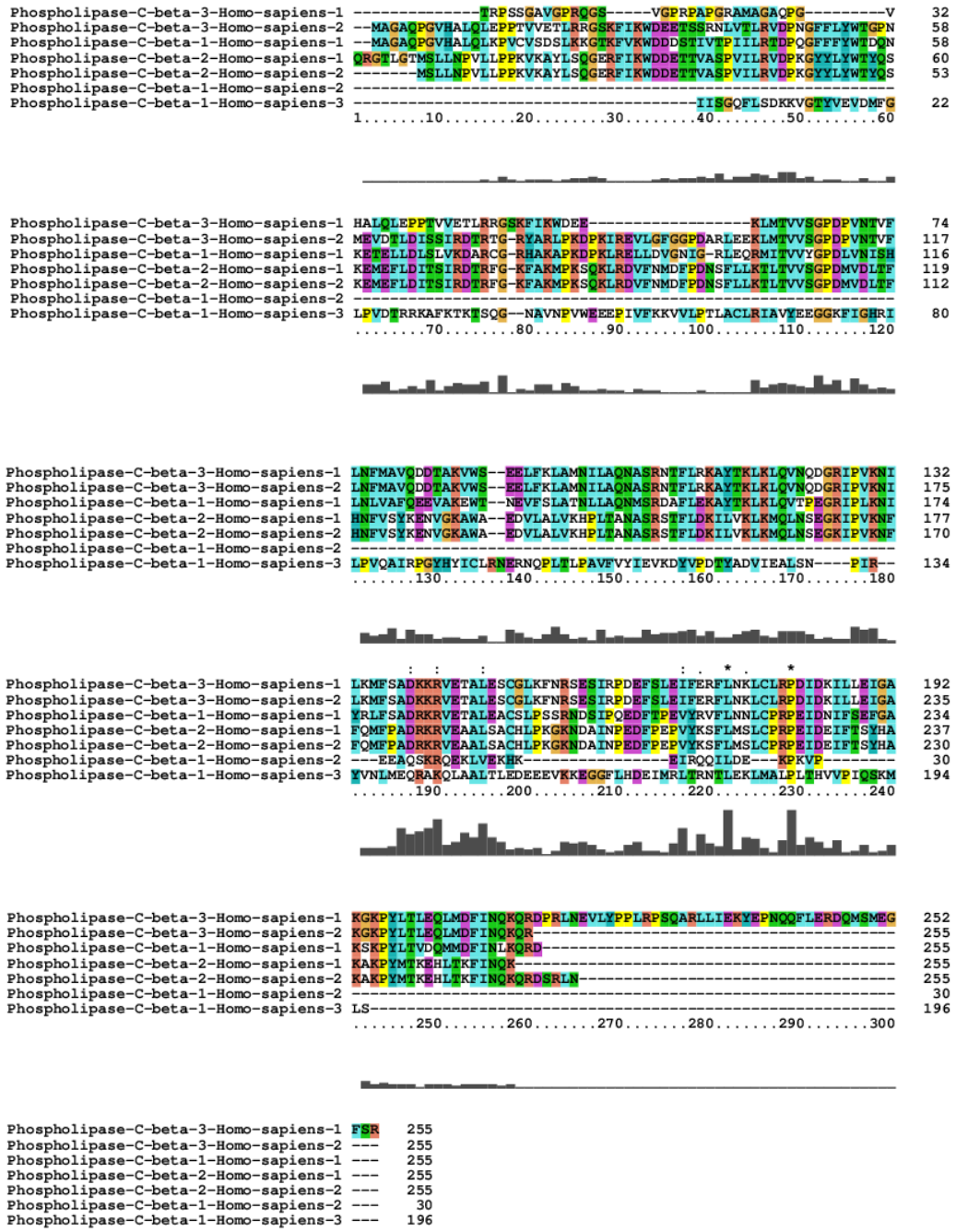
```

ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-12-HS      IVEAHVRAQLIKPRVTEEGEYIPLDQIDIDVGF----- 255
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-14-HS      IVEAHVRAQLIKPRVTEEGEYIPLDQIDV----- 255
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-11-HS      IISATIHMQVVRKTTSPGEGVVPLHVDIPMENGVGNISFLVAPL----- 255
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-8-HS       IISASVRIQVVKTTSPGEGVVPIHGLDIPVDNIE----- 255
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-1-HS       LIGSHYIGKLLKTVTEGETIILLDININVVDA----- 255
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-1    -----LIGCOVTGKLLLHCKKEGENIRLNQVNVTFQVDHSDSFLIILPLLF- 34
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-10-HS-3    -----LIGCOVTGKLLLHCKKEGENIRLNQVNVTFQVDHSDSFLIILPLLF- 255
ATP-sensitive-inward-rectifier-potassium-channel-15-HS      -----LIQCQLSGKLLLHCKKEGERILLNQAIVKHFVDSSESEFLIILPMIF- 255
.....250.....260.....270.....280.....

```



Şekil 10: Efektör proteini olan ATP-sensitive inward rectifier potasyum kanal proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu

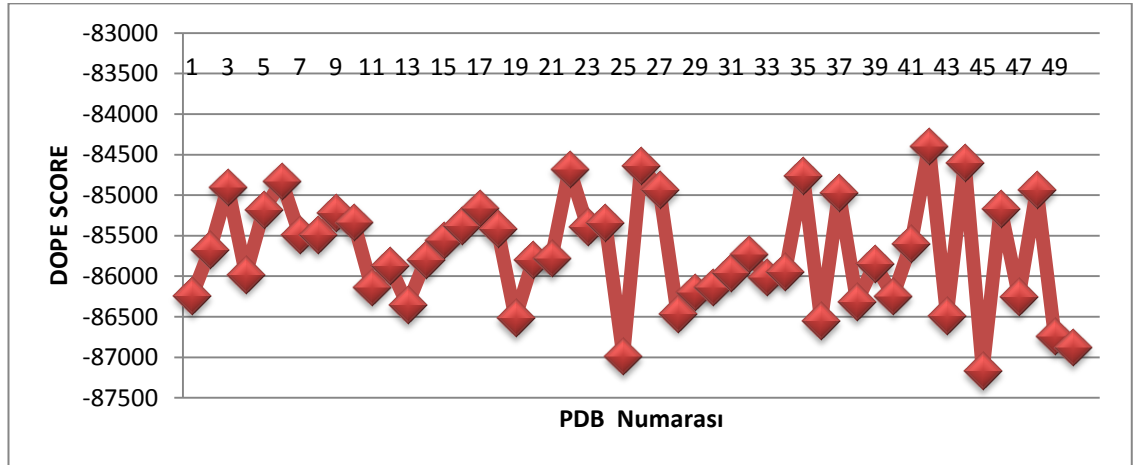


Şekil 11: Efektör proteini olan Fosfolipaz C β proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu

6.2. Benzeşim Modellemesi

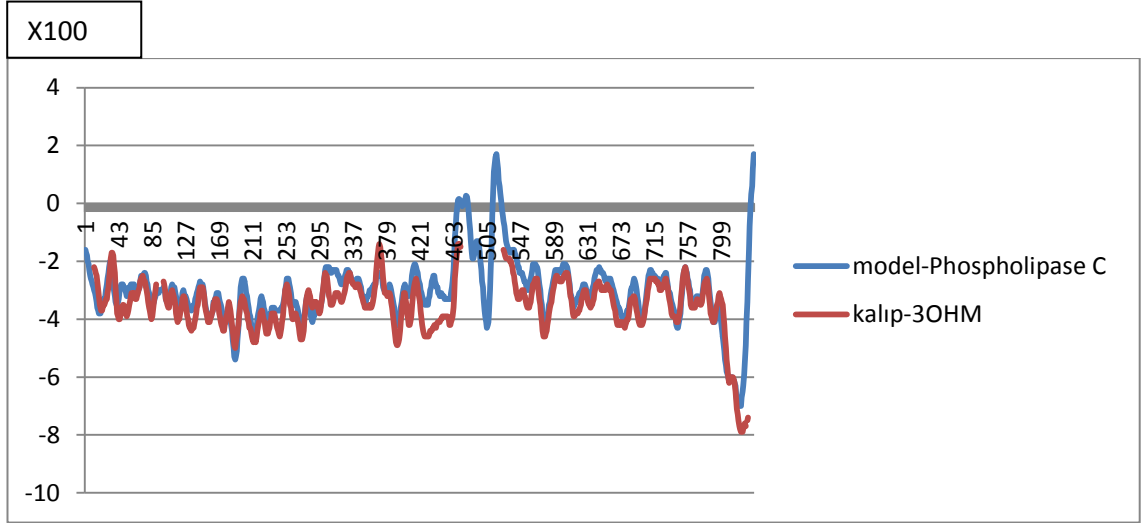
Fosfolipaz C beta ve Kir 3.4 (GIRK4) efektör proteinlerinin ayrı ayrı modellerini oluşturabilmek için kalıp olarak belirlediğimiz kristal yapısı bilinen protein ile kendi proteinimizin hizalanmasına gereksinimimiz vardı. Bunu yapabilmek için Modeller yazılımında modelin oluşturulması için kalıp dizi ile hedef dizinin ikincil yapıları (amino asit dizileri) hizalandı.

Üçüncül yapısı bilinmeyen olası efektör proteini Fosfolipaz C beta için benzeşim modellemesi yapıldı. Blast verileri sonucu kalıp olarak kullanılacak olan protein yapısı protein veri tabanından elde edildi (3ohm.pdb) (Waldo ve ark., 2010). Modelleme öncesi kalıp olarak belirlediğimiz protein ile kendi proteinimiz arasında hizalama gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar PhospholipaseCbeta-3ohmB.pap çıktı dosyası üzerinden değerlendirildi. Bu veriler kullanılarak 50 farklı model oluşturuldu. Oluşturulan pdb modelleri DOPE skorlarına bakılarak karşılaştırıldı ve değerlendirildi. Şekil 12’de görüldüğü gibi 45 numaralı PDB nin DOPE skoru, değerlerine göre en düşük değere sahip olan olduğu için oluşturulan modeller arasından bu model seçildi.

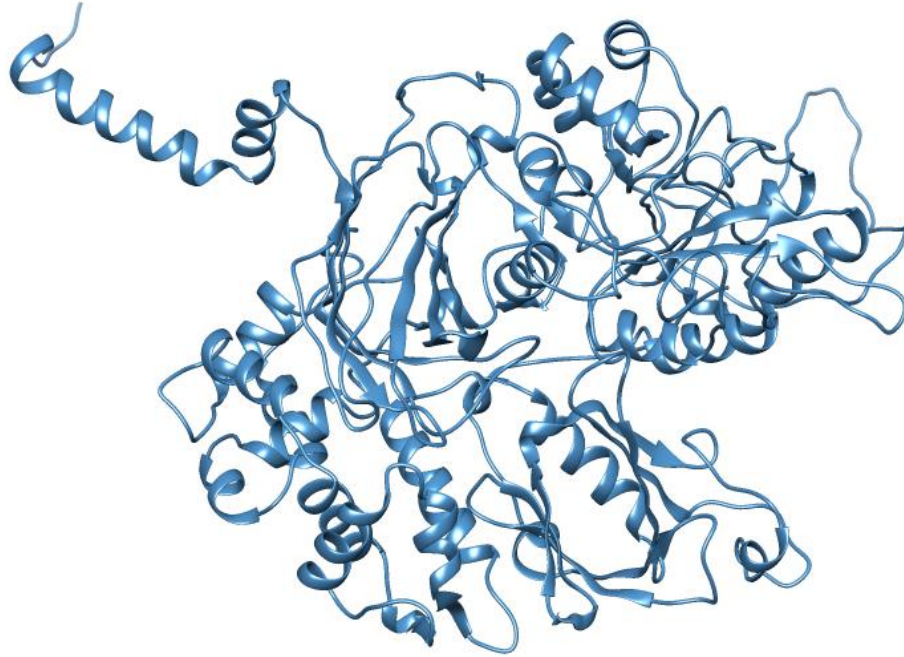


Şekil 12: Oluşturulan 50 modelin dope skor grafiği

Elde edilen modelin ve kalıbın yapıları karşılaştırıldığında önemli ölçüde uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 13). Elde edilen modelin üçüncül yapısı Şekil 14’te gösterilmiştir.

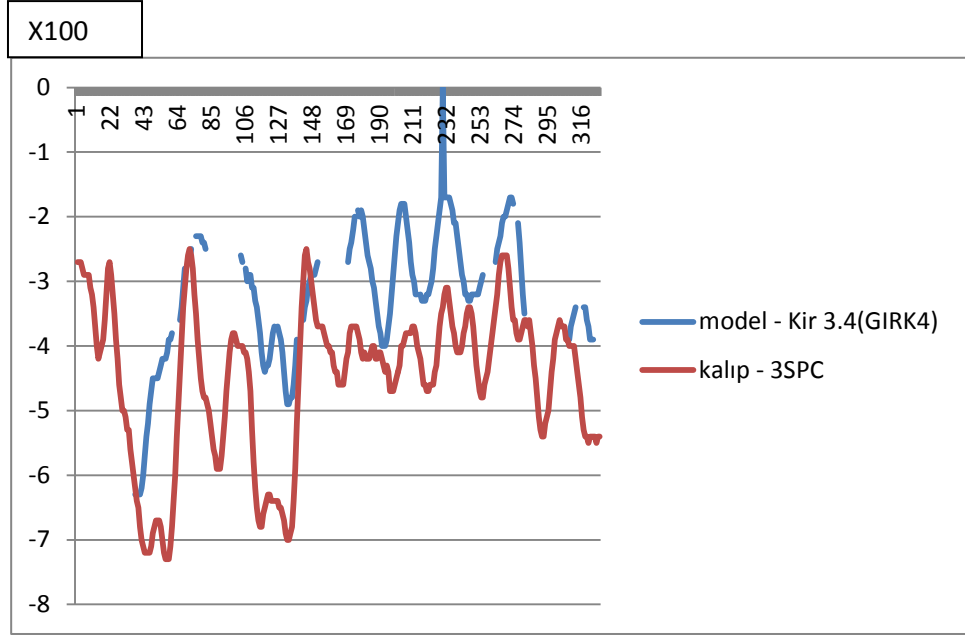


Şekil 13: Fosfolipaz C beta için oluşturulan Kalıp ve modelin karşılaştırılması

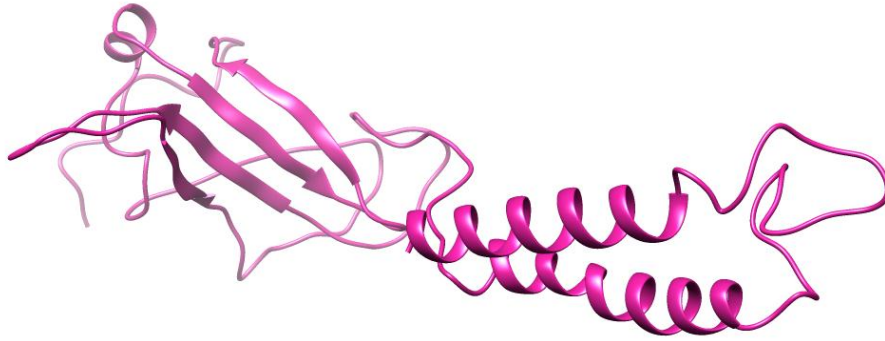


Şekil 14: Olası efektör Fosfolipaz C β proteinin benzeşim modellemesi sonucu elde edilen modeli

Benzer şekilde, elde edilen modelin ve kalıbın yapıları karşılaştırıldığında önemli ölçüde uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 15). Elde edilen modelin üçüncül yapısı Şekil 16’da gösterilmiştir.



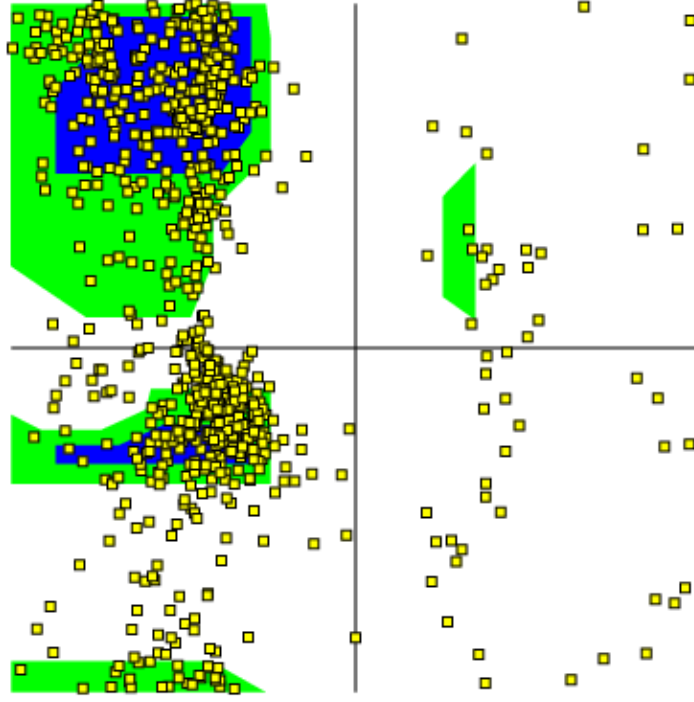
Şekil 15: Kir 3.4(GIRK4) için oluşturulan kalıp ve modelin karşılaştırılması



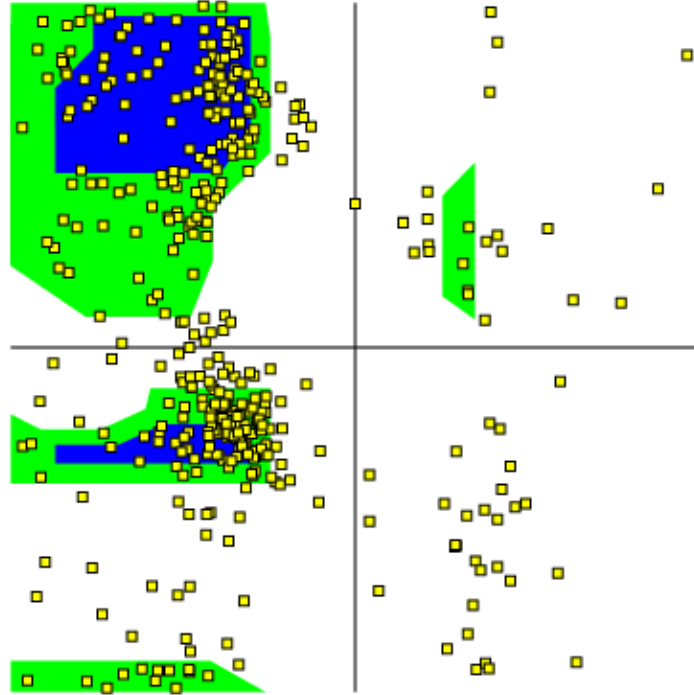
Şekil 16: Olası efektör Kir 3.4(GIRK4) proteininin benzeşim modellemesi sonucu elde edilen modeli

Her iki modelin içerdiği ϕ ve ψ açıları Ramachandran grafiği ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda bu açılar büyük ölçüde protein

üçüncül yapısında olması gereken değer aralıklarında kaldığı görülmüştür (Şekil 17, 18) (Humphrey ve ark., 1996).



Şekil 17: Fosfolipaz C beta proteininin Ramachadran grafiği

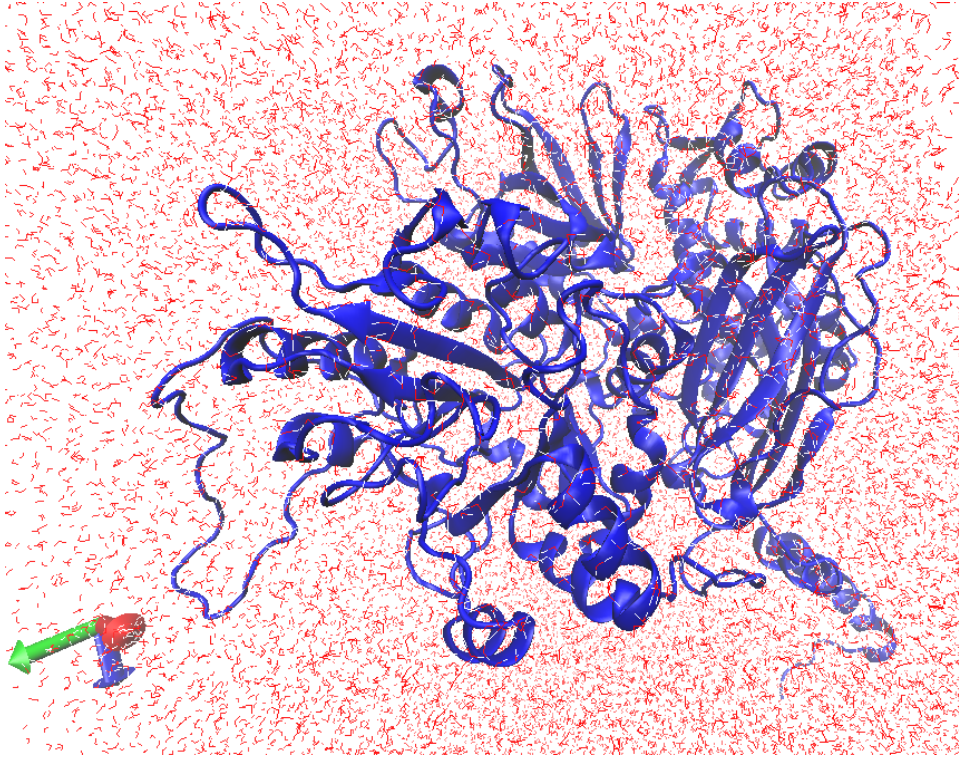


Şekil 18: Kir 3.4(GIRK4) proteininin Ramachadran grafiği

Üçüncül yapıya ilişkin deneysel verilerin yetersizliği nedeniyle adenilat siklaz efektör proteinin üçüncül yapısı modellenememiştir. Bu nedenle de docking simülasyonları gerçekleştirilememiştir.

6.3. Moleküler Dinamik Simülasyonu

Fosfolipaz C beta proteini sulu ortama konularak, 1000 adımda minimize edildi. Minimizasyon sonucu elde edilen en düşük enerjili yapının 2 ns simülasyonu yapıldı. Bu simülasyon 2 femto saniye aralıklarla 1000000 adımda ve 300K de gerçekleştirilmiştir (Şekil 19).



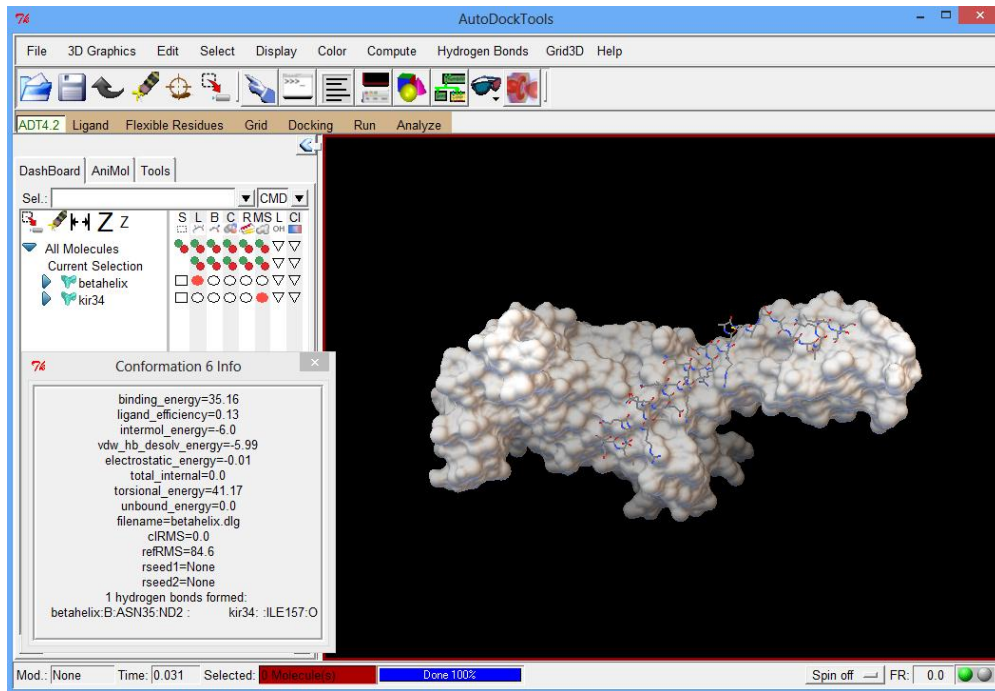
Şekil 19: Fosfolipaz C beta proteininin moleküler dinamik simülasyonu sulu ortama 300K de 2 ns olarak gerçekleştirildi.

6.4. Docking Simülasyonu

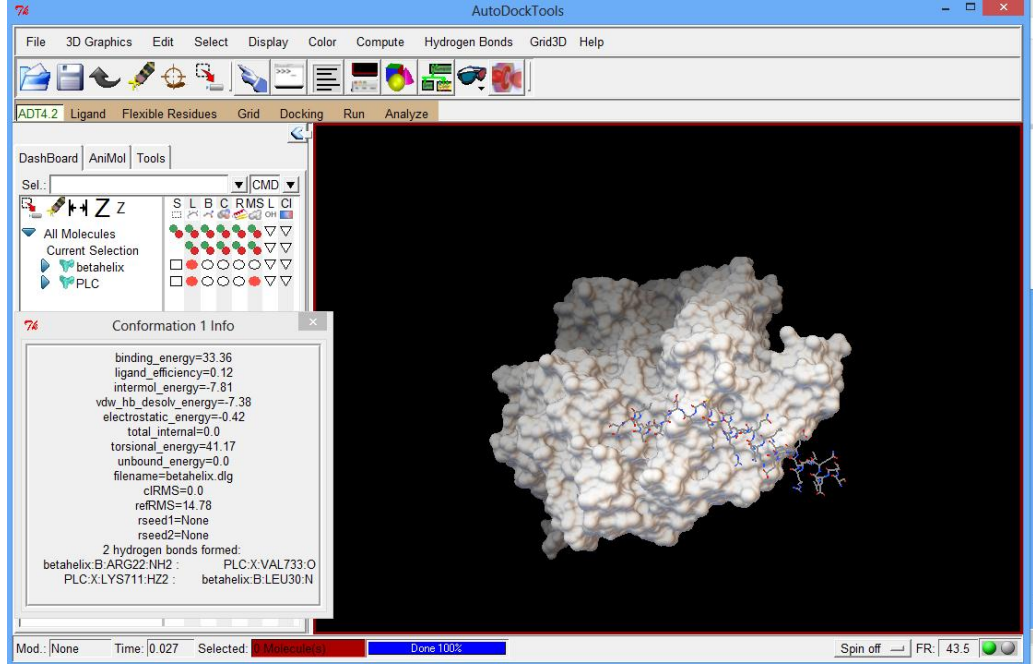
Fosfolipaz C beta ve Kir 3.4(GIRK4) model proteinlerinin G proteinini $\beta\gamma$ alt birim ile olan etkileşimlerini belirlemek için AUTODOCK programı kullanılarak Docking simülasyonu yapıldı. $\beta\gamma$ alt biriminde efektör proteinleri ile etkileşime giren kısım γ

olarak düşünüldüğü için olası efektör Fosfolipaz C beta proteini rigid olarak tutuldu. γ alt birimi kısmen daha küçük olduğundan bu kısım docking edildi ve 250 farklı etkileşim araştırıldı. γ alt birimi ile modelini oluşturduğumuz proteinlerimizin ayrı ayrı dockinglei sonucu her hangi bir etkileşim gözlemlenememiştir.

Bunun üzerine Docking için β alt birimine ait heliks parçacığı kullanılmış ve etkileşimler belirlenebilmiştir. Fosfolipaz C β 'nin β altbirimine ait heliks parçacığıyla olan etkileşimi Şekil 21'de gösterilmiştir. Aynı şekilde Kir 3.4(GIRK4) için elde edilen docking sonucuda şekil 20'de gösterilmiştir. Kir 3.4(GIRK4)'ün şekil 20'de β alt birimine ait heliks parçacığı ile bir hidrojen bağı, Fosfolipaz C β 'nin şekil 21'da β alt birimine ait heliks parçacığı iki hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Kir 3.4(GIRK4)'ün β alt birimi ile oluşturduğu hidrojen bağında görev alan amino asit Şekil 8'de gösterilmiştir. Fosfolipaz C β 'nin oluşturduğu hidrojen bağında görev alan amino asitler ise üçüncül yapıda bulunmadığından gösterilememiştir.



Şekil 20: Kir 3.4(GIRK4) modelinin Docking Simülasyonu sonucu elde edilen olası bağlanma şekli ve bağlanma enerjisi



Şekil 21: Fosfolipaz C beta modelinin Docking Simülasyonu sonucu elde edilen olası bağlanma şekli ve bağlanma enerjisi

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sinyal ileti yollarının önemli bileşenlerinden biri olan G proteinlerinin pek çok fizyolojik, biyokimyasal yolda görev aldığı ve bu yollardan kaynaklanan anomali ve hastalıkların en önemli nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir. G proteinlerinin bir türü olan ve $G_{i/o}$ alt ailesinin bir üyesi olan G_o proteinin yaygın olarak merkezi sinir sisteminde bulunduğu bilinmesine karşın işlevi henüz tam olarak belirlenememiştir. Yapılan çok sayıdaki deneysel çalışma G_o proteinin işlevinin belirlenmesine sınırlı katkıda bulunmuş, yeni çalışmaları gerekli kılmıştır. (Slep ve ark., 2008)

Deneysel protein çalışmaları genellikle yapı bilgisi ve büyük miktarda saf protein gerektirdiğinden zaman alıcı ve oldukça masraflı çalışmalardır. Gelişmiş bir altyapı gereksinimi ve özellikle kristalleştirme çalışmaları için gereken uzun süreler de göz önüne alındığında protein çalışmalarının oldukça güç çalışmaları olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle son yıllarda bilgisayar donanımlarındaki gelişmelere bağlı olarak artan inanılmaz işlem gücü ve oldukça yetkinleşen hesaplamalı yöntemler yeni bir seçenek olarak ortaya çıkmaktadır. 2013 yılında hesaplamalı yöntemlere verilen kimya Nobel ödülü bu yetkinliğin en önemli kanıtını oluşturmaktadır. Ekonomik olması, pahalı alt yapıya gereksinim duymaması, daha kısa süreli çalışmalara olanak vermesi gibi avantajlarının yanı sıra teorik çalışmaların en önemli avantajlarında biri de ilgili sistemin en ince ayrıntısını bile kontrol etmeyi olanaklı kılmasıdır. Bu olanak deneysel anlamda oldukça sınırlı kalmakta, kimi zaman ise mümkün olmamaktadır.

Teorik yöntemler modelleme ve simülasyon çalışmaları için deneysel çalışmalardan elde edilen verileri kullanmaktadır. Bu verilerin güvenilirliği ve hassaslığı teorik çalışmaları doğrudan etkilemektedir. Ayrıca teorik çalışmalar deneysel çalışmalarla sınanabilecek öngörülerde bulunabildiği sürece anlamlı olmaktadır. Bu karşılıklı etkileşim elde edildiği takdirde, teorik ve deneysel çalışmalar büyük bir potansiyeli ortaya koyabilmektedir. Tüm bu noktalar göz önüne alınarak bu çalışmada, G_o proteinin işlevi teorik yöntemler kullanılarak belirlenmeye çalışıldı.

Tez çalışmasının en kritik aşaması, Go proteini ile etkileşen mevcut efektör proteinlere benzeyen proteinlerin belirlendiği aşamayıdır. Biyolojik veri tabanlarındaki büyük hacimli veri yığınından gerekli protein dizilerini elde etmek hem oldukça zahmetli hem de çok empirik bir süreçtir. Benzerliği belirleyen parametrelere getirilen cut-off değerleri çok yüksek tutulursa benzer protein dizilerini gözden kaçırmak kaçınılmaz olurken, düşük cut-off değerleri de çalışılmayacak kadar çok sayıda protein dizisini ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle sadece insana özgü, belirli sayıda aday efektör proteinleriyle çalışıldı. Bu anlamda tez çalışması daha kapsamlı çalışmalar için potansiyel barındırmaktadır.

Diğer bir kritik aşama ise benzer işleve sahip benzer proteinlerin özgül dizisel motifler içerebileceği esasına dayanan motif belirleme süreciydi. Motif belirleme de çok empirik bir süreç olup motifleri kesin olarak belirleyen bir algoritma bulunmamaktadır. Çalışma kapsamında kullanılan proteinlerin yüksek dizisel benzerliğe sahip olması nedeniyle çok özgül motifler elde edilememiştir. Yine de çok iyi korunan rezidülerin motif ögesi olabileceği düşünülmektedir. Bu anlamda da tez çalışması ileri çalışmaları öncüllemektedir.

Üçüncül yapısı bilinmeyen efektör protein adaylarının üçüncül yapısı benzeşim modellemesi ile elde edilmiştir. Kalıp ve hedef protein dizilerinin benzerliğinin yüksek olduğu durumlarda elde edilen model oldukça güvenilir olmaktadır. Tez çalışmasında bu benzerlik yüksek olduğundan benzeşim modellemesinden elde edilen modeller güvenilir modellerdir.

Benzeşim modellemesinden elde edilen efektör protein modeli ile Go proteinin γ alt birimi arasındaki etkileşim, docking simülasyonu ile araştırılmıştır. Literatürde γ alt biriminin daha büyük serbestlik ve esnekliğe sahip olması nedeniyle efektör etkileşimlerinde esas rolü üstlendiğine ilişkin öngörüler bulunmaktadır (Khan ve ark., 2013). Bu öngörüler esas alınarak dock simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen olası etkileşimler deneysel olarak sınanabilir etkileşimlerdir. Ancak literatürde öngörüldüğü şekilde γ alt-birimi ile yapısını belirlediğimiz efektör proteinler arasında güçlü bir etkileşim belirlenmemiştir. Bu nedenle β alt birimi ve ilgili efektör proteinleri arasındaki etkileşimler araştırılmıştır. Bunun sonucunda β alt biriminin pervane yapısı dışında kalan heliks yapısı ve ilgili efektörler arasında daha güçlü bir

etkilişim bulunmuştur. Bu da gelecek çalışmaların γ alt-birimi kadar β alt-birimini de kapsamasını gerekli kılmaktadır.

Tez çalışmasında teorik yöntemler başarıyla kullanılarak aday efektör proteinler belirlenmiş olup, bu proteinlerin β alt birimi ile etkileşebileceği gösterilmiştir. Bu bulgu da, efektör proteinlerin görev aldığı biyokimyasal yollardan hareketle Go proteinin işlevinin belirlenmesi için ileri çalışmalara öncülük edebilir.

8. KAYNAKLAR

- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. "Basic local alignment search tool". *Journal of Molecular Biology*. 1990;215 (3): 403–410.
- Bastiani C, Mendel J. Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. *WormBook*. 2006, pp: 1–25.
- Berman HM, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank *Nature Structural Biology*, 2003; 10 (12): 980.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*, 2000; 28: 235-242.
- Birnbaumer L, Rodbell M. Adenylyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J Biol Chem*. 1969;244 (13): 3477-3482.
- Brooks BR, Brooks CL 3rd, Mackerell AD Jr, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoseck M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem*. 2009;30: 1545-1614.
- Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J. Comp. Chem*. 1983;4: 187-217.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*. 2003;24(6): 765-781.

- Casey RM. "BLAST Sequences Aid in Genomics and Proteomics". Business Intelligence Network. (2005).
- Clapham DE., Neer E.J. G protein $\beta\gamma$ subunits. Annual Review of Pharmacology & Toxicology. 1997;37: 167-203.
- Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW, Kollman PA. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. J. Am. Chem. Soc. 1995;117: 5179–5197.
- Dascal N. Signalling via the G protein-activated K^+ channels. Cell. Signal. 1997; 9 (8): 551–73.
- David P. Siderovski, Francis S. Willard. The GAPs, GEFs, and GDIs of Heterotrimeric Gprotein Alpha Subunits. Int J Biol Sci 2005;1: 51-66. <http://www.biolsci.org/v01p0051.htm>
- Dohlman HG, Thorner J. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. J Biol Chem. 1997; 272 (7): 3871-3874.
- Entschladen F, Zanker KS, Powe DG. Heterotrimeric G protein signaling in cancer cells with regard to metastasis formation. Cell Cycle. 2011;10: 1086–1091
- Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics. John Wiley & Sons, Inc., Supplement. 2006;15: 5.6.1-5.6.30,.
- Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 2006;15: 5.6.1-5.6.30.

- Feig M, Onufriev A, Lee MS, Im W, Case DA, Brooks CL. Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures". *Journal of Computational Chemistry*. 2004;25 (2): 265–84.
- Fiser A, Do RK, Sali A. Modeling of loops in protein structures, *Protein Science*. 2000;9: 1753-1773,
- Fiser RK, Sali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*. 20009. 1753-1773.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003; 63(6): 1256-72
- Frenkel D, Smit B. *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*. Academic Press, San Diego, 2 edition, 2002;
- Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro MS. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signals underlie receptor-specific Gq/11-mediated modulation of N-type Ca²⁺ channels. *J. Neurosci*. 2004;24: 10980–10992.
- Goldman BB, Wipke WT. QSD quadratic shape descriptors. 2. Molecular docking using quadratic shape descriptors (QSDock). *Proteins*. 2000;38 (1): 79–94.
- Grubmueller H. “Proteins as Molecular Machines: Force Probe Simulations”, published in *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, Lecture Notes, Nor bert Attig, Kurt Binder, Helmut Grubmueller, Kurt Kremer (Eds.), John von Neumann Institute for Computing, Julich, Germany, NIC Series, 2004, pp: 401-422,
- Hamm HE. The many face of G protein signalling. *The journal of biological chemistry*. 1998;273(2): 669-672.

- Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*. 2011; 477:495-498.
- Harden TK, Sondek J. Regulation of phospholipase C isozymes by Ras superfamily GTPases *Annu Rev. Pharmacol Toxicol*. 2006; 46, 355–379.
- Harden TK, Sondek J. Regulation of phospholipase C isozymes by Ras superfamily GTPases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2006;46: 355–379.
- Hepler JR, Gilman AG. G Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1992;17: 383-387.
- Hollinger S, Hepler JR. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev*. 2002;54 (3): 527-559
- Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, Hille B. Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J. Gen. Physiol*. 2005;126: 243–262.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Molec. Graphics*. 1996;14: 33–38.
- Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, and Shizuya H Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein α , β and γ subunit genes. *DNA Res*. 2000;7: 111–120
- Jansen G, Weinkove D, and Plasterk RH. The G-protein g subunit gpc-1 of the nematode *C.elegans* is involved in taste adaptation. *EMBO J*. 2002;21: 986–994.
- Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors: I. Diversity of receptor-ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(28): 17299-17302
- Jorgensen WL. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science*. 1991;254 (5034): 954–5.

- Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbé JC, Miller GJ, Hébert TE. The Expanding Roles of G $\beta\gamma$ Subunits in G Protein–Coupled Receptor Signaling and Drug Action *Pharmacol Rev.* 2013;65: 545–577.
- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews. Drug discovery.* 2004;3 (11): 935–49.
- Kobrinisky E, Mirshahi T, Zhang H, Jim T, Logothetis DE. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K⁺-current desensitization. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 507–514.
- Koelle MR. A new family of G protein regulators-the RGS proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9 (2): 143-147.
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, and Gilman AG Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science.* 1989; 244:1558–1564.
- Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(4): 339-57
- Lambright DG, Sondek J, Böhm A, Skiba NP, Hamm HE, and Sigler PB (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379:311–319.
- Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996;6 (3): 402–6.
- Lin Y, Smrcka AV. Understanding molecular recognition by G protein $\beta\gamma$ subunits on the path to pharmacological targeting. *Mol Pharmacol.* 2011;80: 551–557.
- Lipman DJ, Pearson WR. "Rapid and sensitive protein similarity searches". *Science.* 1985;227(4693): 1435–41.

- MacKerell AD, Banavali NK. All-atom empirical force field for nucleic acids: II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution. *J. Comput. Chem.* 2000;21: 105–120.
- MacKerell AD, Feig M, and Brooks CL. III. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular Dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 2004;25: 1400–1415,
- MacKerell AD, Jr. Brooks B. Brooks CL, Nilsson L, Roux B, Won Y, Karplus M. "CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program". In Schleyer, P.v.R. et al. *The Encyclopedia of Computational Chemistry 1*. Chichester: John Wiley & Sons. 1998, pp: 271–277.
- MacKerell Jr. AD, Banavali N, Foloppe N. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers.* 2001;56(4): 257–265.
- Marti-Renom MA, Stuart A, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000;29: 291-325.
- Marti-Renom MA, Stuart A, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000;29: 291-325.
- Meng EC, Shoichet BK, Kuntz ID. Automated docking with grid-based energy evaluation". *Journal of Computational Chemistry.* 2004;13 (4): 505–524.
- Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: A short history. *British Journal of Pharmacology.* 2006;147: S46-S55.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry.* 2009;16: 2785-91.

- Oehmen C, Nieplocha J. ScalaBLAST: A Scalable Implementation of BLAST for High-Performance Data-Intensive Bioinformatics Analysis. *IEEE Transactions on Parallel and Distributed Systems*. 2006;17 (8): 740.
- Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene*. 2001; 269, 13–25.
- Patel TB. Single transmembrane spanning heterotrimeric G Protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol Rev*. 2004; 56 (3): 371-385.
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kale L, Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 2005;26:1781-1802.
- Piechulek T, Rehlen T, Walliser C, Vatter P, Moepps B, Gierschik P. Isozyme-specific stimulation of phospholipase C-g2 by Rac GTPases. *J. Biol. Chem*. 2005;280: 38923–38931.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L. Direct interaction of G_β with a C-terminal G_β-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997;94, 8866–8871.
- Rapaport DC. *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. Cambridge University 2nd ed. Press. Cambridge. 1995, p:4-10.
- Raymond JR. Hereditary and acquired defects in signaling through the hormonereceptor- G protein complex. *The Am. Phys. Sac*. 1994; 163-174.
- Ross EM, Gilman AG. Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem*. 1977;252 (20): 6966-6969.
- Saggerson D. Thyroid disorders. In. *G proteins: Signal transduction and Disease*, edited by G. Milligan and M. Wakelam. London: Academic. 1992;157-190.

- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993;234: 779-815.
- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993;234: 779-815.
- Schlick T. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*, Springer-Verlag New York, Inc. Secaucus, NJ, USA. 1999, pp: 256-257.
- Slep KC, Kercher MA, Wieland T, Chen CK, Simon MI, Sigler PB. Molecular architecture of Galphao and the structural basis for RGS16-mediated deactivation. *Proc Natl Acad Sci.* 2008; 105(17):6243-62448.
- Smit MJ, Iyengar R. Mammalian adenylyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1998; 32, 1–21.
- Smith TF, Waterman MS. Identification of Common Molecular Subsequences. *Journal of Molecular Biology.* 1981;147: 195–197.
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, and Sigler PB. Crystal structure of a G-protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1A resolution. *Nature.* 1996;379:369–374.
- Sotriffer CA, Flader W, Winger RH, Rode BM, Liedl KR, Varga JM. "Automated docking of ligands to antibodies: methods and applications" *Methods: A Companion to Methods in Enzymology.* 2000;20: 280-291.
- Sprang SR. G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annual Review of Biochemistry.* 1997;66: 639-678.
- Suh BC, Hille B. Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005;15: 370–378.
- Sunahara RK, Dessauer CW, and Gilman AG: Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36: 461–480.

- Theresa M, Vera C, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* 2003;24 (6): 765-81.
- Verlet L. Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical review.* 1967;159(1); 98.
- Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iñiguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, and Sprang SR. The structure of the G protein heterotrimer Gi $\alpha 1$ $\beta 1$ $\gamma 2$. *Cell.* 1995;83: 1047–1058.
- Wei BQ, Weaver LH, Ferrari AM, Matthews BW, Shoichet BK. Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site. *J. Mol. Biol.* 2004;337 (5): 1161–82.
- Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 2005;85: 1159-1204.
- Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, Wang X, Montell C, Kozasa T, Sondek J, Harden TK. Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex. *Science.* 2010; 330: 974-980.
- Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y "G protein regulation of potassium ion channels". *Pharmacological Reviews.* 1998; 50 (4): 723–60.
- Yue, G., Malik, B., and Eaton, D.C. (2002). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) stimulates epithelial sodium channel activity in A6 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 11965–11969.
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Logothetis DE. PIP2 activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron.* 2003;37: 963–975.
- Zhou Y, Sondek J. Harden TK. Activation of human phospholipase C-h2 by G $\beta\gamma$ *Biochemistry.* 2008;47: 4410–4417.

Zhou Y, Wing MR, Sondek J, Harden TK. Molecular cloning and characterization of PLC-h2. *Biochem. J.* 2005;391: 667–676.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Gonca	Soyadı	GÜZEL
Doğum Yeri	Keşan	Doğum Tarihi	05.10.1989
Uyruğu	T.C.	Tel	(554)2316664
E-mail	goncaguzel189@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi, Atatürk Eğitim Fakültesi, Fizik Öğretmenliği Bölümü	2012
Lise	Tekirdağ Anadolu Öğretmen Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	iyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL İBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74	71	63
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
NAMD, Modeller, AUTODOCK	Çok İyi
Office Programları	Çok İyi