



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜÇ FARKLI DURUMDAKİ G PROTEİNİ ALFA ALTBİRİMİNİN
ÜÇÜNCÜL YAPISININ BENZEŞİM MODELLEMESİ VE
MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONU İLE İNCELENMESİ**

AYDIN KARAGÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi CEVDET NACAR

2022 - İSTANBUL

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 çalışması ile elde edilmemiş 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.

Aydın Karagöz

İmza

I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez hazırlık sürecimde alanının uzmanlık bilgileriyle yoluma ışık tutan, bu süreçte bana desteğini esirgemeyen, danışmanlığımı üstlenen çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Cevdet NACAR'a;

Teorik dersleri ve laboratuvar çalışmalarını keyifle birlikte tamamladığım Biyofizik A.B.D'nin saygı değer hocalarına, araştırma görevlilerine ve öğrenci arkadaşlarıma;

Uzun yıllardır Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi'nin Fizik Laboratuvarında çalıştığım ve öncesinde öğrencisi de olduğum köklü ve saygın bir kurum olan, bu süreçte imkânlarından faydalandığım F.M.V Işık Üniversitesine, saygı değer hocalarına, idari personeline ve çalışma arkadaşlarıma;

Bana bu süreçte sonsuz desteği olan çok kıymetli Annem'e ve Babam'a;

Çalışmalarım boyunca meraklı bakışları ve sorularıyla beni takip eden, sonsuz enerji ve sevgi kaynaklarım olan yeğenlerim Ata, Asya, Alya ve Alara'ya;

Desteklerini esirgemeyen ablam ve eşine;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	i
II. İÇİNDEKİLER	ii
III. KISALTMALAR VE SİMGELER.....	iv
1. ÖZET	5
2. SUMMARY	6
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
4. GENEL BİLGİLER	9
4.1. G Proteinleri	9
4.1.1. $G\alpha$ alt biriminin reseptör proteinlerle etkileşimi	15
4.1.2. $G\alpha$ 'nın efektör proteinlerle etkileşimleri.....	18
4.1.3. $G\alpha$ aktivasyon mekanizması	20
4.2. $G\alpha_o$ Alt Birimi	22
4.3. G Proteini Mutasyonları	24
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
5.1. Benzeşim (Homoloji) Modellemesi	28
5.2. Moleküler Dinamik Simülasyonu	29
6. BULGULAR.....	30
6.1. Benzeşim (Homoloji) Modellemesi	30
6.1.1. $G\alpha_o$ yabani-tip (WildType[WT]) üçüncül yapısının GDP ve GTP nükleotidleri ile modellenmesi	30
6.1.2. $G\alpha_o$ mutasyonlu üçüncül yapısının GDP ve GTP nükleotidleri ile modellenmesi	38
6.2. Moleküler Dinamik Simülasyonu	43
6.2.1. GDP bağlı yabani-tip $G\alpha_o$ proteininin (GoWildGDP) moleküler dinamik simülasyonu	43
6.2.2. R178A mutasyonu içeren GDP bağlı $G\alpha_o$ proteininin (GoR178GDP) moleküler dinamik simülasyonu	47
6.2.3. GTP bağlı yaban tip $G\alpha_o$ proteininin (GoWildGTP) moleküler dinamik simülasyonu	51
6.2.4. R178A mutasyonu içeren GTP bağlı $G\alpha_o$ proteininin (GoR178GTP) moleküler dinamik simülasyonu	55
6.2.5. R178A ve R178 amino asitleri ile GDP ve GTP arasında kurulan H^+ bağları.....	59
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	62

8. KAYNAKLAR.....	66
-------------------	----



III. KISALTMALAR VE SİMGELER

μ OR	μ -opioid Reseptör
5-HT	Serotonin Reseptörü
A1	Adenozin Reseptör
AC	Adenilat Siklaz
AD	Alzheimer Hastalığı
APP	Amiloid Öncü Proteini
A β	Amiloid Beta
B2AR	B2 Adrenerjik Reseptörü
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
D2R	Dopamin D2
EF-TU	Uzama Faktörü TU
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GDP	Guanozindifosfat
GEF	Guanin Nükleotid Değişim Faktörleri
GPCR	G proteini reseptörleri
GRIN1	Büyüme Faktörü Molekülü
GTP	Guanozintrifosfat
LH	Lüteinleştirici Hormon
M2	Muskarinik Reseptör
PKA	Protein Kinaz A
RMSD	Root Mean Square Deviation
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon

1. ÖZET

GTP nükleotidi bağlayan proteinler (G proteinleri) hücre sinyal ileti sisteminin önemli bileşenleridir. Bu proteinler G Proteini Eşlikli Reseptörlerle (GPCR) etkileşmektedir. Çok büyük çeşitliliğe sahip ligandlardan birinin bağlanmasıyla uyarılan GPCR, G proteinini etkinleştirmektedir. Büyük bir çeşitliliğe sahip G proteinleri ve GPCR'lar hücre bölünmesi, duyu sistemleri, hormonal süreçler, nörolojik işlevler gibi çok sayıda fizyolojik süreçlerde görev almakta ve bu süreçlerle ilgili hastalıklarla doğrudan ilişkisi bulunmaktadır. Bundan dolayı sinyal ileti sistemi bileşenleri, özellikle GPCR'lar çok sayıda ilacın hedefi konumundadır.

G proteini α , β ve γ olarak adlandırılan 3 alt birimden oluşmaktadır. G proteini alfa alt birimi aktif durumdayken GTP, inaktif durumdayken GDP nükleotidi bağlamaktadır. Çeşitli mutasyonlar G_o proteininin etkinliğini değiştirmektedir. G_o proteini G protein ailesinin bir üyesi olup yaygın olarak merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır. Ancak işlevi henüz tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında R178A mutasyonunun G_o proteininin alfa alt biriminin etkinliğini nasıl değiştirdiği incelendi. R178 amino asidine ilişkin mutasyonun çeşitli hastalıklarda görev aldığı bilinmektedir. Dört farklı durumdaki G_o alfa alt birimi benzeşim modellemesi ile modellendi. Elde edilen modeller sulu ortamda 100 μ s'ye karşılık gelecek uzunlukta moleküler dinamik simülasyona tabi tutuldu. Simülasyonlar sonucunda R178A mutasyonunun GDP bağlı inaktif proteini daha kararsız hale getirdiği ancak paradoksal şekilde GTP bağlı aktif formu daha kararlı hale getirdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: G proteinleri, benzeşim modellemesi, moleküler dinamik simülasyon, protein üçüncül yapısı

2. SUMMARY

GTP nucleotide binding proteins (G proteins) are important components of the cell signal transduction system. These proteins interact with G Protein Coupled Receptors (GPCR). GPCR induced by the binding of one of a wide variety of ligands activates the G protein. A wide variety of G proteins and GPCRs are involved in many physiological processes such as cell division, sensory systems, hormonal processes, and neurological functions, and are directly related to diseases related to these processes. Therefore, signal transduction system components, especially GPCRs, are targets of many drugs.

The G protein consists of 3 subunits called α , β and γ . In active form, G protein alpha subunit binds GTP while in inactive form, it binds GDP. Various mutations alter the activity of the G_o protein. The G_o protein is a member of the G protein family and is commonly found in the central nervous system. However, its function is not yet fully known.

In this thesis, how the R178A mutation changes the activity of the alpha subunit of the G_o protein was investigated. It is known that the mutation of the R178 amino acid is involved in various diseases. The G_o alpha subunit in four different states was modeled by homology modelling. The resulting models were subjected to molecular dynamics simulation with a length corresponding to 100 μ s in aqueous. As a result of the simulations, it was determined that the R178A mutation made the GDP-bound inactive protein more unstable, but paradoxically made the GTP-bound active form more stable.

Keywords: G proteins, homology modelling, molecular dynamics simulation, tertiary structure

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Guanin nükleotidi bağlayan heterotrimerik proteinler (G proteinleri) ailesi, reseptör tarafından üretilen sinyallerin plazma zarı boyunca iletilmesinde önemli bir rol oynar. Heterotrimerik G-proteinleri, GPCR aktivasyonuna yanıt olarak hücre içi sinyal ileti basamaklarını düzenleyen moleküler anahtarlardır. α (alfa), β (beta) ve γ (gama) alt birimlerinden oluşurlar ve $G\alpha$ alt biriminde bulunan GTP (aktif konformasyon) veya GDP (inaktif konformasyon) için bir bağlanma bölgesine sahiptirler (Baltoumas, Theodoropoulou, & Hamodrakas, 2013). Aktiflenen G proteini $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ dimeri olarak ikiye ayrılır ve her iki birim de daha sonra çeşitli efektör moleküllerle etkileşime girerek çok çeşitli hücresel ve fizyolojik tepkilere yol açar. $G\alpha$ 'nın içsel GTPaz aktivitesi GTP'yi GDP'ye hidrolizlediğinde $G\alpha$ 'yı inaktif duruma gelir ve sinyal sonlandırılmış olur (Hepler & Gilman, 1992).

Heterotrimerler tipik olarak $G\alpha$ alt biriminin birincil dizi benzerliğine dayalı olarak dört ana sınıfa ayrılır: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ ve $G\alpha_{12}$. $G\alpha$ alt birimi, bir GTPaz domeni ve bir heliks domeninden oluşur. GTPaz domeni, monomerik G proteinleri ve uzama faktörleri olmak üzere G protein süper ailesinin tüm üyelerinde korunur. Bu alan GTP'yi hidrolizler ve $G\beta\gamma$ dimeri, GPCR'ler ve efektör proteinleri için bağlanma yüzeyleri sağlar (Oldham & Hamm, 2008).

$G\alpha_o$, $G\alpha_{i1-3}$ ve $G\alpha_t$ 'i içeren $G\alpha_i$ ailesinin bir üyesidir. $G\alpha_o$, insan beyinde en bol bulunan $G\alpha$ alt birimi olmasına rağmen, görev aldığı yolaklar hakkında çok az şey bilinmektedir. $G\alpha_o$ üzerinde bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu, $G\beta\gamma$ alt birimi üzerinden Ca^{+2} kanallarının aktivasyonunda bir rolü olduğuna ilişkin bulgular sunmuştur. Ek kanıtlar, $G\alpha_o$ 'nun A1-adenosin reseptörlerinden, dopamin D2 reseptörlerinden (D2R) ve μ -opiooid sinyal ileti sürecinde gelen sinyallere dahil olduğunu göstermektedir (Slep et al., 2008). Memeli beyinde büyüme konisi nörit uzantısını destekleyen GRIN1 adlı bir $G\alpha_o$ efektör molekülü rapor edilmiştir (Nakata & Kozasa, 2005). $G\alpha_o$ 'nun temel nörolojik ve bilişsel süreçlerde, GPCR ile birleştirilmiş yolakların bir düzenleyicisi olarak aldığı rol, onu farmasötik etkileşimler için ana hedef öğelerinden birisi haline getirir. Hücre içi sinyal ileti bileşenlerinin moleküler olarak anlaşılması, yan etkileri en aza indirmek için tek başına veya GPCR

hedefli ilaçlarla birleşim halinde kullanılan ilaç tedavisinin potansiyel terapötik hedeflerini belirlemeye yönelik önemli bir adımdır (Slep et al., 2008).

G proteinin işlevi, G proteini alt birimlerine ait gen mutasyonlarına, ekspresyon düzeyindeki değişimlere, translasyon sonrası modifikasyonlara bağlı olarak değişebilir. G proteinine bağlı yolaklardaki bozukluklar, diyabet, tümör metastazı, psikiyatrik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve Alzheimer hastalığı olmak üzere çok çeşitli bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Weinstein & Shenker, 1993). Özellikle $G\alpha_o$ 'nın, Alzheimer hastalığında etkin role sahip olan APP reseptör proteini ile etkileşimde olduğu bilinmektedir. Bu nedenden dolayı üç boyutlu yüksek çözünürlüğe sahip $G\alpha_o$ proteinin yapısı ve çalışma mekanizmasının belirlenmesi önem kazanmaktadır (Ramaker, Swanson, & Copenhaver, 2013).

Tez çalışması kapsamında R178A mutasyonunun insan $G\alpha_o$ alt biriminin etkinliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. R178 kodonu $G\alpha_o$ ile aynı aileden olan $G\alpha_i$ proteininde bulunan R179 kodonunun $G\alpha_o$ proteinindeki karşılığıdır. $G\alpha_i$ proteinindeki R179 mutasyonu çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş bir mutasyondur (Strittmatter, Fishman, & Zhu, 1994). Tez çalışması kapsamında 4 farklı $G\alpha_o$ protein modeli oluşturuldu:

- a) GTP bağlı aktif $G\alpha_o$ - yabani tip (GoWildGTP)
- b) GDP bağlı inaktif $G\alpha_o$ - yabani tip (GoWildGDP)
- c) GTP bağlı aktif $G\alpha_o$ - R178A mutant tip (GoR178GTP)
- d) GDP bağlı inaktif $G\alpha_o$ - R178A mutant tip (GoR178GDP)

Bu 4 farklı durumdaki proteinler moleküler dinamik simülasyonuna tabi tutularak geçirdikleri yapısal değişimler ve proteinlerin kararlılıkları incelenerek, R178A mutasyonunun protein işlevi üzerindeki etkisi araştırıldı. Böylece hem proteinin yapısının anlaşılmasına katkı sağlanması hem de etkileşimlerde görev alabilecek amino asitlerin belirlenmesi hedeflendi. Buradan elde edilecek bilgi ileride yapılması düşünülen protein etkileşim çalışmalarında kullanılacaktır.

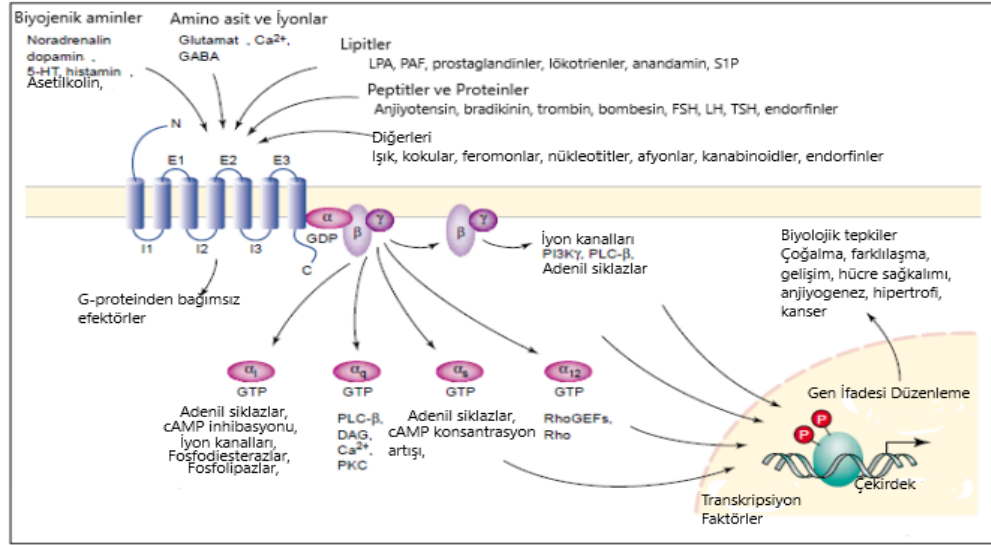
Bu konuyla ilgili bilimsel literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak spesifik olarak $G\alpha_o$ ile yapılan çalışma sayısı çok kısıtlı ve elde edilen bulgular

yetersizdir. Bu tür çalışmalardan elde edilen veriler kalıp olarak kullanılan üçüncül yapıların çözünürlüğü, moleküler dinamik simülasyonun parametreleri ve toplam süresi gibi çok sayıda değişkene bağlıdır. Bu çalışma kapsamında $G\alpha_o$ proteini birçok farklı durumda moleküler dinamik simülasyonuna tabi tutularak geçirdiği konformasyona ve kararlılığa ilişkin değişimlerin nedenleri araştırıldı.

4. GENEL BİLGİLER

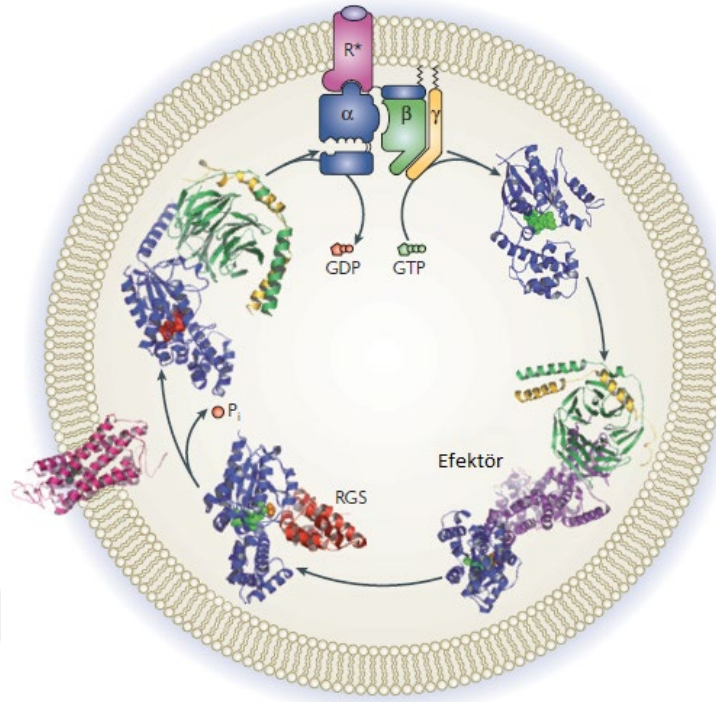
4.1. G Proteinleri

Tüm biyolojik sistemler, büyük miktarda bilgiyi işleme ve yanıt verme yeteneğine sahiptir (Simon, Strathmann, & Gautam, 1991). Işık, koku, kimyasallar gibi dış sinyaller, özelleşmiş duyu organlarındaki hedef hücreleri uyarır, dolaşımdaki veya yerel olarak salınan hormonlar, nörotransmitterler ve büyüme faktörleri ise yakın veya uzak hücreler arasında kimyasal haberciler olarak görev alır. Bu habercilerin hücre membranı yüzeyindeki özel reseptörlerle etkileşimi, transmembran sinyal iletilisinin altında yatan moleküler olaylar dizisinin sadece ilk adımını oluşturur. Çoğu durumda, bu reseptörlerin uyarılması, hücre içinde özgül yanıtı başlatan kimyasal ikincil habercileri harekete geçiren efektör proteinlerin (örneğin enzimler veya iyon kanalları) aktivasyonu ile sonuçlanır (Şekil 4.1.1). Tüm ökaryotik organizmalarda, heterotrimerik GTP bağlayıcı ve hidrolize edici proteinler (G proteinleri) ailesi, birçok hücre yüzeyi reseptörünün hücre zarındaki efektör proteinlere bağlanmasında önemli bir dönüştürücü rol oynar (Hepler & Gilman, 1992). G proteinleri, protein sentezinde yer alan uzama faktörü Tu (EF-Tu) ve p21ras gibi çok sayıda monomerik (20-25 kDa) proteinleri de içeren daha büyük bir GTPaz süper ailesinin parçasıdır (Gilman, 1987).



Şekil 4.1.1: G-protein - GPCR proteinleri ve efektör proteinlerle etkileşimi (Marinissen & Gutkind, 2001)

Heterotrimerik G-proteinleri α , β ve γ alt birimlerinden oluşur ve $G\alpha$ alt biriminde bulunan GTP (etkin konformasyon) veya GDP (etkin olmayan konformasyon) için bir bağlanma bölgesine sahiptir. Moleküler ağırlıkları α alt birimi için yaklaşık 39-46 kDa, β alt birimi için yaklaşık 37 kDa ve γ alt birimi içinse yaklaşık 8 kDa kadardır (Hepler & Gilman, 1992). Memelilerde 16 gen tarafından kodlanan 21 $G\alpha$ alt birimi, 5 gen tarafından kodlanan 6 $G\beta$ alt birimi ve 12 $G\gamma$ alt birimi vardır. G-proteinleri tipik olarak $G\alpha$ benzerliğine bağlı olarak $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ ve $G\alpha_{12/13}$ olmak üzere dört ana sınıfa ayrılır. GPCR'lerin agonistler tarafından uyarılması, $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ dimerine ayrılan G-proteinlerinin aktivasyonuna yol açar. Bu alt birimler daha sonra çeşitli efektör moleküllerle etkileşime girerek çok çeşitli hücresel ve fizyolojik tepkilere yol açan biyokimyasal reaksiyonları tetikler. $G\alpha$ 'nın içsel GTPaz aktivitesi GTP'yi hemen GDP'ye hidrolizler ve böylece $G\alpha$ 'yı inaktif duruma getirdiğinden sinyal sonlanmış olur (Şekil 4.1.2) (Baltoumas et al., 2013).



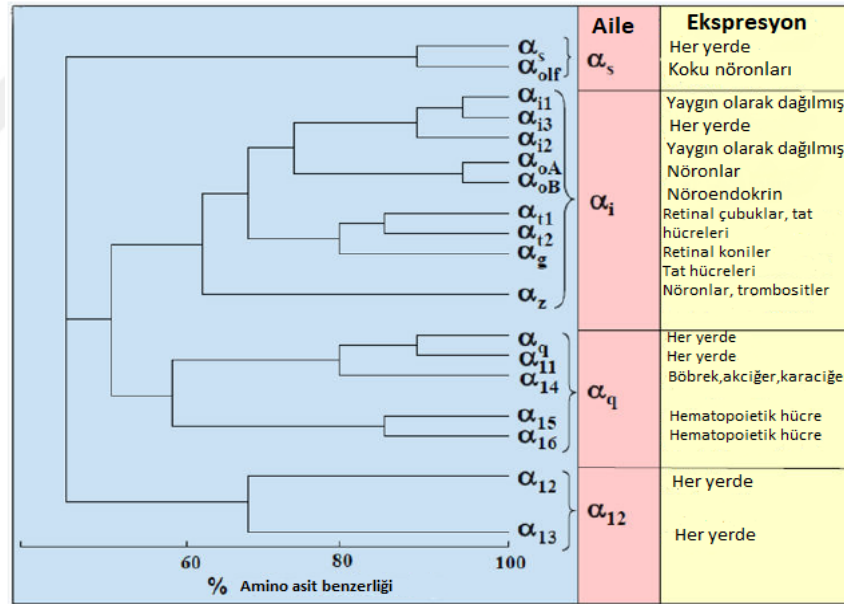
Şekil 4.1.2: G-protein döngüsü (Oldham & Hamm, 2008).

$G\alpha_s$ ailesinde iki üye vardır: $G\alpha_s$ ve $G\alpha_{olf}$. $G\alpha_s$ (s stimülasyon anlamına gelir) çoğu hücre tipinde ifade edilirken, $G\alpha_{olf}$ (olf koku alma anlamına gelir) özel olarak koku alma duyu nöronlarında ifade edilir. $G\alpha_i$ ailesi, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_g$ ve $G\alpha_z$ olmak üzere en büyük çeşitliliğe sahip ailedir. $G\alpha_i$ proteinleri (i inhibisyon anlamına gelir) çoğu hücre tipinde tespit edilmiştir. $G\alpha_o$, nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir ve iki varyantı vardır: $G\alpha_{oA}$ ve $G\alpha_{oB}$. $G\alpha_t$ (t, transducin anlamına gelir) iki izoforma sahiptir. $G\alpha_{t1}$, gözdeki çubuk hücrelerde, $G\alpha_{t2}$ ise gözün koni hücrelerinde eksprese edilir. $G\alpha_g$ (g, gustducin anlamına gelir) tat alıcı hücrelerde bulunur. $G\alpha_z$, nöronal dokularda ve trombositlerde eksprese edilir. İnsanlarda $G\alpha_q$ ailesi $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ ve $G\alpha_{16}$ 'dan oluşur (fare eşdeğeri $G\alpha_{15}$ 'tir). $G\alpha_q$ ve $G\alpha_{11}$ her yerde ifade edilirken $G\alpha_{14}$ ve $G\alpha_{15/16}$ ifadesi daha sınırlıdır. $G\alpha_{14}$ esas olarak böbrek, akciğer ve karaciğerde ve $G\alpha_{15/16}$ spesifik olarak hematopoietik hücrelerde eksprese edilir. $G\alpha_{12}$ ailesinde, çoğu hücre tipinde ifade edilen $G\alpha_{12}$ ve $G\alpha_{13}$ vardır (Tablo 4.1.1) (Syrovatkina, Alegre, Dey, & Huang, 2016). İnsan ve fare $G\alpha$ alt birimlerinin filogenetik ilişkisi ve ifadeleri Şekil 4.1.3'de gösterilmiştir (Syrovatkina et al., 2016).

Tablo 4.1.1: G_α ailesi ve alt birimleri (Syrovatkina et al., 2016).

Tablo 4.1.1

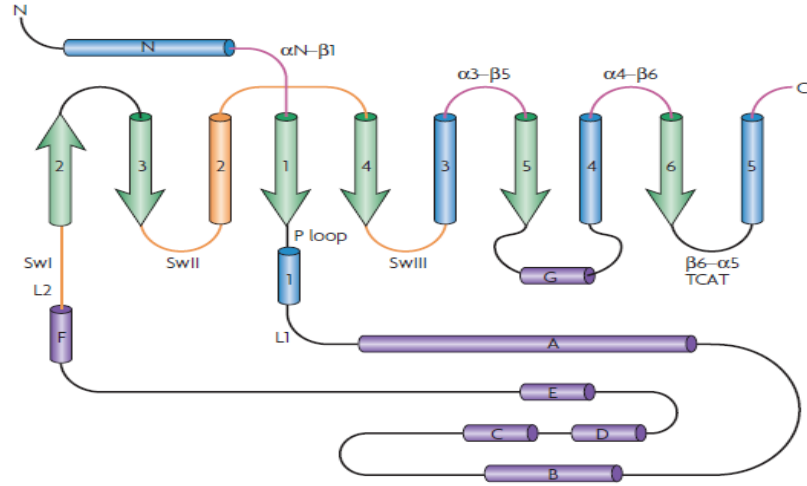
Galfa ailesi	Alt aile birimleri	Belirlenmiş Yapılar
$G\alpha_{i/o}$	$G\alpha_i$	$G\alpha_{i1}$: 1GP2, 1GIA vb. $G\alpha_{i3}$: 2V4Z, 2IHB vb. $G\alpha_t$: 1TAG, 2FQJ vb. $G\alpha_o$: 3C7 K
$G\alpha_s$	$G\alpha_s$ $G\alpha_{olf}$	$G\alpha_s$: 1AZT, 1AZS vb.
$G\alpha_{q/11}$	$G\alpha_q$ $G\alpha_{11}$ $G\alpha_{15/16}$	$G\alpha_q$: 3AH8, 2RGN vb.
$G\alpha_{12/13}$	$G\alpha_{12}$ $G\alpha_{13}$	$G\alpha_{12}$: 1ZCA $G\alpha_{13}$: 1ZCB, 3CX8 vb.



Şekil 4.1.3: İnsan ve fare $G\alpha$ alt birimlerinin filogenetik ilişkisi ve ifadeleri (Syrovatkina et al., 2016).

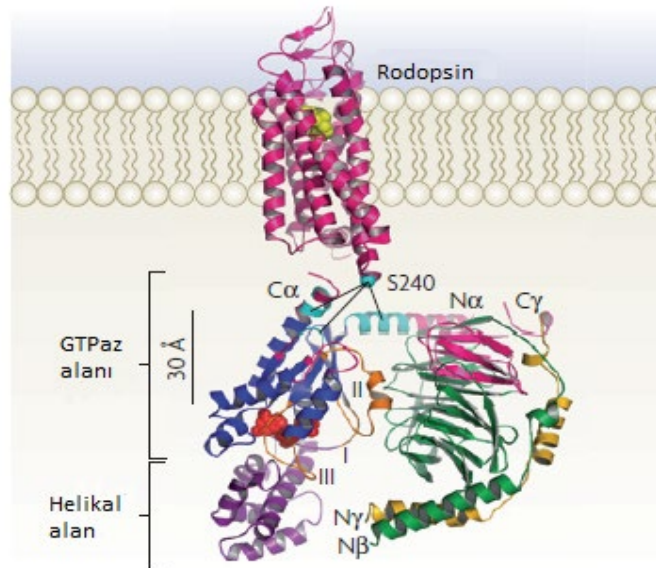
$G\alpha$ alt biriminin yapıları, bir GTPaz domeni ve bir heliks domeninden oluşan korunmuş bir protein yapısına sahiptir. GTPaz domeni, $G\alpha$ 'nın GDP'ye bağlı ve $GTP\gamma S$ 'ye bağlı konformasyonları arasındaki önemli yapısal farklılıkların tanımlandığı, I, II ve III anahtarları olarak adlandırılan üç esnek döngü içerir. Heliks domen, $G\alpha$ proteinlerine özgüdür ve nükleotid bağlama cebi üzerinde bir kapak

oluşturan ve bağlı nükleotidleri proteinin çekirdeğine gömen altı α -helis demetinden oluşur (Şekil 4.1.4) (Oldham & Hamm, 2008).



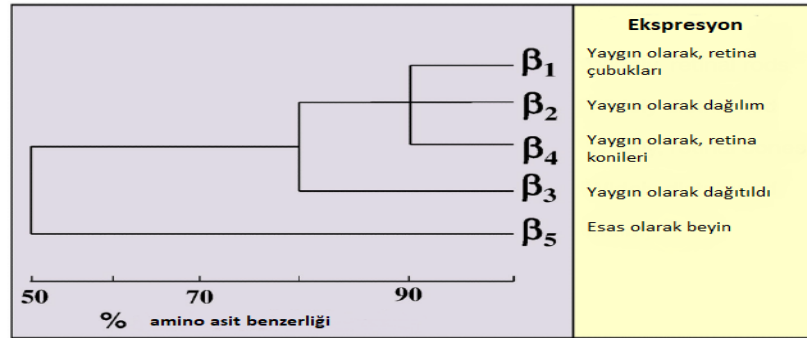
Şekil 4.1.4: G α 'nın ikincil yapısı (Oldham & Hamm, 2008).

G α_i hariç tüm G α alt birimleri, N ucundaki yağ asidi palmitat ile post-translasyonel olarak modifiye edilir. G α_i ailesinin üyeleri de N ucunda miristoillenir. Bu modifikasyonlar, membran lokalizasyonunu ve protein-protein etkileşimlerini düzenler (Şekil 4.1.5) (Oldham & Hamm, 2008).



Şekil 4.1.5: Reseptör-G-protein ara yüzü (Oldham & Hamm, 2008)

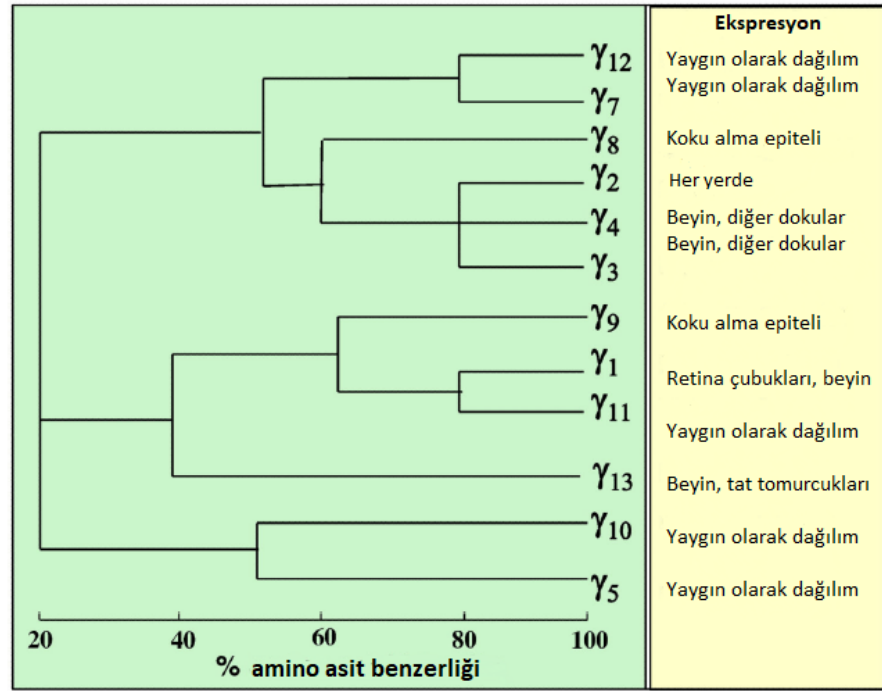
G β alt biriminin üyesi olan G β_1 , G β_2 , G β_3 ve G β_4 alt birimleri yüksek dizi benzerliklerini paylaşır (%80 ila 90 arasında), G β_5 ise diğer G β alt birimlerine ~%50 benzerdir. G β_5 esas olarak beyinde bulunurken, diğer G β alt birimleri daha yaygın dağılmıştır. İnsan G β alt birimlerinin filogenetik ilişkisi ve ifadeleri Şekil 4.1.6'da gösterilmiştir (Syrovatkina et al., 2016).



Şekil 4.1.6: İnsan G β alt birimlerinin filogenetik ilişkisi ve ekspresyonu (Syrovatkina et al., 2016).

G β alt biriminin yapısı, yedi WD40 dizi tekrarından ve bir sarmal N-terminalinden oluşan yedi kanatlı bir pervane şeklindedir. G γ , N-terminaline ve G β 'nin 5. ve 6. sarmalına bağlanan iki α -helisinden oluşan küçük bir alt birimdir. G β , Anahtar I ve II tarafından yapılan hidrofobik bir cebe ve ayrıca N-terminalinin bir parçasına temas ederek G α 'ya bağlanır (Baltoumas et al., 2013).

G γ alt birimleri daha çeşitlidir ve dizisel olarak aralarında %20 ile %80 arasında benzerlik bulunur (Syrovatkina et al., 2016). G γ , bir halka ile birbirine bağlanan iki α -heliksinden oluşur. G γ , GPCR/G protein etkileşimi ve membran hedeflemesi için gerekli olan bir C-terminal sisteininde prenil edilir. G-proteini β ve γ alt birimleri, G γ 'nin N-terminali ile G β 'nin N-terminali arasında bir heliks-heliks etkileşimi ile bir arada tutulan birleşik bir işlevsel birim oluşturur. Çoğu G β alt birimi, çoğu G γ alt birimi ile etkileşime girebilse de, 60 olası dimer kombinasyonunun tamamı bulunmamaktadır. G $\beta\gamma$ dimerleri aynı G α izoformu ile etkileşime girebilir (Moreira, 2014). İnsan G γ alt birimlerinin filogenetik ilişkisi ve ifadeleri Şekil 4.1.7'de gösterilmiştir (Syrovatkina et al., 2016).



Şekil 4.1.7: İnsan Gγ alt birimlerinin filogenetik ilişkisi ve ekspresyonu (Syrovatkin et al., 2016).

4.1.1. Gα alt biriminin reseptör proteinlerle etkileşimi

İnsan genomunda yaklaşık %4'lük bir paya sahip G proteini eşlenikli reseptörler (GPCR'lar) hücre zarlarına gömülü olarak bulunur ve doğadaki en yaygın sinyal ileti mekanizmasını oluşturur. GPCR'lar besinlerden hormonlara, feromonlardan ve ışığa kadar çok sayıda hücre dışı sinyallere karşı biyolojik bir sensör olarak görev yapmaktadır. Bu yüksek çeşitlilik, GPCR'lerin endokrin, sinir, kardiyovasküler, duyuşal ve bağışıklık sistemlerinin işlevinde rol almasını sağlamaktadır. GPCR'ların bu önemli görevi yerine getiriyor olması onu farmakolojik alandaki çalışmaların en önemli hedefi haline getirmektedir (Calebiro & Godbole, 2018; Schwartz & Sakmar, 2011).

Bu reseptörlerin fizyolojideki rolünün klasik bir örneği, kalp kasılmasının düzenlenmesinde yer almalarıdır. Kardiyomiyositlerin yüzeyinde bulunan β-adrenerjik reseptörler, sempatik aktivasyonla salınan adrenal ve noradrenalinin pozitif iyonotropik ve kronotropik etkilerine aracılık eder. G_s proteinine bağlı bu reseptörlere adrenal veya noradrenalinin bağlanması, adenilil siklazları aktive ederek

protein kinaz A'yı (PKA) uyarıp cAMP'yi üretir. PKA, sırayla, L-tipi Ca^{2+} kanalları, fosfolamban ve troponin I dahil olmak üzere kardiyak kontraktilitede yer alan farklı molekülleri fosforile eder ve sonuçta kardiyomiyosit kasılmasının artmasına neden olur. Parasempatik aktivasyon, $G_{i/o}$ proteinlerine bağlı muskarinik (M2) reseptörlere bağlanan ve böylece adenilil siklaz aktivasyonunu inhibe eden asetilkolin salınımı yoluyla bu etkilere karşı koyar (Calebiro & Godbole, 2018).

Ek olarak, $G_{i/o}$ aktivasyonu üzerine salınan $\beta\gamma$ alt birimleri, iletken dokudaki potasyum (GIRK) kanallarını aktive ederek membran potansiyelini kararlı hale getirir. Endokrin sistemde, GPCR'ler çeşitli hormonlar, hipotalamik salınım faktörleri ve yerel modülatörler için reseptörler olarak önemli bir rol oynar. Bilinen tüm majör hipotalamik saliverici (TRH, GnRH, CRH, GHRH) ve inhibe edici (somatostatin, dopamin) hormonlar, özgül GPCR'ler aracılığıyla etki eder. GH ve PRL dışında, ön (TSH, LH, FSH, ACTH, MSH) ve arka (vazopressin, oksitosin) hipofiz hormonları da GPCR'lerin aktivasyonu yoluyla sinyal verir (Calebiro & Godbole, 2018).

GPCR'lerin rolü, agonistlerin bağlanması sonucu özgül heterotrimerik G proteinlerinin aktivasyonunu sağlayarak efektör proteinlerinin modülasyonuna yol açmaktır (Rosenbaum, Rasmussen, & Kobilka, 2009). Bir GPCR'nin yapısı üç kısma ayrılabilir:

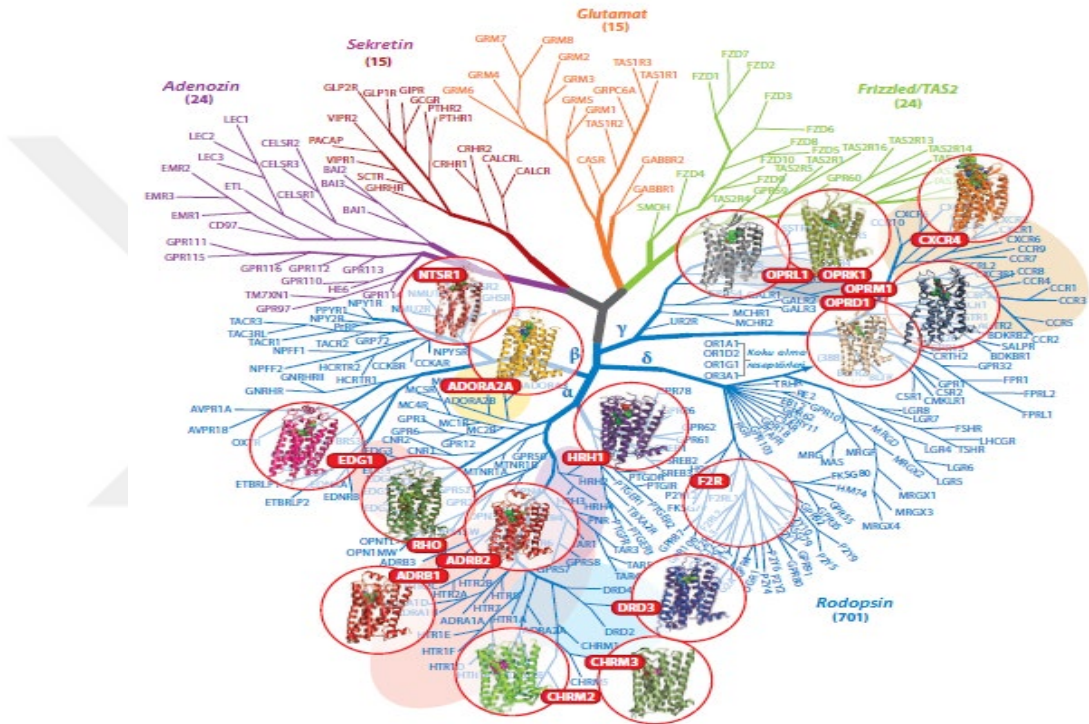
- (1) N terminalinden ve üç hücre dışı döngüden (ECL1–ECL3) oluşan hücre dışı bölge,
- (2) 7 α -heliksten (TM1–TM7) oluşan TM bölgesi,
- (3) 3 hücre içi halka (ICL1–ICL3), bir amfipatik sarmal (H8) ve C ucundan oluşan hücre içi bölge.

Geniş anlamda, hücre dışı bölge ligand etkileşimini modüle eder; TM bölgesi yapısal çekirdeği oluşturur, ligandları bağlar ve bu bilgiyi konformasyonel değişiklikler yoluyla hücre içi bölgeye iletir ve hücre içi bölge sitozolik sinyal proteinleri ile arayüz oluşturur (Venkatakrishnan et al., 2013).

Çeşitli çalışmalar, ICL2'nin ve ICL3'ün N- ve C-terminal bölgelerinin GPCR'ler üzerinde G-protein etkileşimli bölgeler olduğunu ileri sürmüştür. Bir ligandın hücre

dışı bölgeye bağlanması, transmembran çekirdek bölgesinde yapısal bir yeniden düzenlemeye neden olur ve bu da sitoplazmik taraftaki hücre içi bölgede konformasyonel bir değişikliğe yol açar. Bu da, G-proteinleri gibi hücre içi efektörlerle etkileşimi kolaylaştırır (Syrovatkina et al., 2016).

İnsan GPCR'ları filogenetik analiz yöntemleriyle belirlenmiş olarak beş ana reseptör ailesi içinde sınıflandırılırlar. Bunlar: rodopsin, sekretin, glutamat, yapışma ve kıvrılmış tat-2 reseptörleridir (Şekil 4.1.1.1) (Oldham & Hamm, 2008).



Şekil 4.1.1.1: GPCR reseptör ailesi ve alt birimleri (Katritch, Cherezov, & Stevens, 2013).

Yapılan çalışmalar çeşitli G_α alt birimlerinin opsin, β_2 adrenerjik reseptör (β_2AR), adenosin A1 reseptörü (A1AR), adenosin A2A reseptörü (A2AAR), μ -opioid reseptörü (μOR), kalsitonin reseptörü, serotonin 5-HT1B reseptörü gibi çok farklı GPCR'lar ile etkileşime girdiğini göstermiştir (Tablo 4.1.1.1) (Wang & Miao, 2019).

Tablo 4.1.1.1: G proteinleri veya G protein benzerleri ile kompleks oluşturan GPCR'lerin yapıları (Wang & Miao, 2019).

GPCR	G proteini veya G proteini benzeri	PDB ID (çözünürlük)	Metod	Referans
Opzin	Go transdüsünün C-terminal peptidi	3DQB (3.2Å)	X-ray	(Scheerer et al., 2008)
β_2 AR	G_i ve nanobody Nb35	3SN6 (3.2Å)	X-ray	(Rasmussen, DeVree, et al., 2011)
β_2 AR	Nanobody Nb80	3P0G (3.5Å)	X-ray	(Rasmussen, Choi, et al., 2011)
M2	Nanobody Nb9-8	4MQS (3.5Å)	X-ray	(Kruse et al., 2013)
β_2 AR	Nanobody Nb6B9	4LDE (2.7Å), 4LDL (3.1Å), 4LDO (3.2Å)	X-ray	(Ring et al., 2013)
μ OR	Nanobody Nb39	5C1M (2.1Å)	X-ray	(Huang et al., 2015)
A_{2A} AR	Mini- G_i	5G53 (3.4Å)	X-ray	(Carpenter et al., 2016)
GLP-1R	G_i	5VAI (4.1Å)	Cryo-EM	(Zhang et al., 2017)
Kalsitonin reseptörü	G_i	5UZ7 (4.1Å)	Cryo-EM	(Liang et al., 2017)
Rodopsin	Arestin	5W0P (3.0Å)	X-ray	(Zhou et al., 2017)
GLP1	G_i	6B3J (3.3Å)	Cryo-EM	(Liang et al., 2018)
KOR	Nanobody Nb39	6B73 (3.1Å)	X-ray	(Che et al., 2018)
μ OR	G_i	6DDE (3.5Å), 6DDF (3.5Å)	Cryo-EM	(Koehl et al., 2018)
A_1 AR	G_i	6D9H (3.6Å)	Cryo-EM	(Draper-Joyce et al., 2018)
A_{2A} AR	G_i ve nanobody Nb35	6GDG (4.1Å)	Cryo-EM	(Garcia-Nafria, Lee, et al., 2018)
Rodopsin	G_i	6CMO (4.5Å)	Cryo-EM	(Kang et al., 2018)
5-HT _{1B}	G_o	6G79 (3.8Å)	Cryo-EM	(Garcia-Nafria, Nehmé, et al., 2018)

β_2 -AR ve G_{α_s} proteini arasındaki etkileşimler, reseptörün TM5'inin karboksil-terminal ucu boyunca meydana gelir. β_2 -AR'nin TM5'ine ait Glu225, Gln229 ve Lys232 kalıntıları, G_{α_s} 'ın $\alpha 5$ sarmalının karboksil-terminal ucunda bulunan Asp381, Gln384 ve Arg385 ile güçlü elektrostatik etkileşime girmektedir. TM3'ün karboksil terminalindeki Thr136 ve Ile135 kalıntılarının ana zincir oksijenleri de G_{α_s} 'ın Ras bölgesinin aynı $\alpha 5$ sarmalının Arg380 ve Gln384 ile polar etkileşim gerçekleştirmektedir (Syrovatkina et al., 2016).

4.1.2. G_{α} 'nın efektör proteinlerle etkileşimleri

G proteinleri ve efektörleri arasındaki etkileşimlerin yapısal temelleri hakkındaki bilgi büyük ölçüde G_{α} -efektör kompleksinin kristal yapılarından sağlanmıştır (Baltoumas et al., 2013). Efektörler, G_{α} ve $G_{\beta\gamma}$ ile etkileşimleri yoluyla ya ikinci haberciler olarak hareket eden ya da doğrudan fizyolojik tepkilere yol açan çeşitli bir protein grubu oluşturur. Adenilil siklazlar ve fosfolipazlar, iyon kanalları, yapışma

proteinleri ve tübülünler gibi enzimler dahil olmak üzere birçok protein efektör olarak görev yapabilir (S. R. Sprang, 1997). Yapılan çeşitli çalışmalar çok sayıda yeni G-protein efektörü tanımlamıştır. Her $G\alpha$ ailesi ve $G\beta\gamma$ dimer bir dizi farklı efektöre bağlanabilir ve birçok efektör birden fazla G-proteini tarafından düzenlenebilir (Baltoumas et al., 2013).

G proteinleri tarafından efektör proteinlerinin aktivitesinin modülasyonu döngüsel bir işlemdir. $G\beta\gamma$ heterodimer ile GDP'ye bağlı bir $G\alpha$ alt birimi, G protein heterotrimerik kompleksini oluşturur. Bu kompleks birbirine bağlıyken, hiçbir bileşen efektörlerle etkileşime girme yeteneğine sahip değildir. Agonistle uyarılan GPCR'lerin heterotrimer ile özel olarak bağlanması, $G\alpha$ 'nın katalitik bölgesinde GTP'nin GDP ile yer değişimi ve $G\alpha$ 'nın $G\beta\gamma$ 'den tamamen veya kısmen ayrılmasıyla sonuçlanır. Bir sinyal döngüsü, GTP'nin $G\alpha$ tarafından enzimatik hidrolizi ile sonlandırılır, bu da G-GDP'nin efektörden ayrılmasına ve $G\beta\gamma$ ile yeniden birleşmesine neden olur (Stephen R. Sprang, Chen, & Du, 2007).

$G\alpha$ alt birimine GTP nükleotidi bağlanması üzerine I-III anahtar bölgelerinde gerçekleşen konformasyonel değişimler $G\alpha$ tarafından hücre içindeki efektörlerinin özgül olarak tanınmasına izin verir. $G\alpha$ -GTP bağlı yapıda $G\alpha$ içindeki $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ sarmalları tarafından oluşturulan yüksek oranda korunmuş olan hidrofobik aralığın efektör bağlantısı için evrensel bir bölge oluşturduğu görülmüştür. Ek efektör bağlama bölgeleri, $G\alpha$ 'nın $\alpha 2/\alpha 4$ ve $\alpha 3/\alpha 5$ sarmalları tarafından oluşturulur (Tablo 4.1.2.1) (Johnston & Siderovski, 2007). Bununla birlikte, $\alpha 3$ - $\beta 5$ döngüsü, aileler arasında hem dizi hem de yapı olarak farklılık gösterir ve G-proteinlerinin efektörlerine karşı seçiciliğinde bir anahtar olduğu öne sürülmüştür (Baltoumas et al., 2013).

Tablo 4.1.2.1: G alfa proteini ve etki ettiği efektör yapıları (Wettschureck & Offermanns, 2005).

İsim	Gen	Ekspresyon	Efektör
α-Altıbirimleri			
G_{α_s} sınıfı			
G_{α_s}	<i>GNAS</i>	Her yerde	AC (tüm tipler) ↑
$G_{\alpha_{sXL}}$	(<i>GNASXL</i>)	Nöroendokrin	AC ↑
$G_{\alpha_{oz}}$	<i>GNAL</i>	Koku epitelium, beyin	AC ↑
$G_{\alpha_{12}}$ sınıfı			
$G_{\alpha_{11}}$	<i>GNAI1</i>	Yaygın olarak dağılmış	AC (tip I,III,V,VI,VIII,IX) ↓ (Direkt düzenleme)
$G_{\alpha_{12}}$	<i>GNAI2</i>	Her yerde	
$G_{\alpha_{13}}$	<i>GNAI3</i>	Yaygın olarak dağılmış	
G_{α_o}	<i>GNAO</i>	Nöronal, nöroendokrin	VDC ↓, GIRK ↑ ($G\beta\gamma$ aracılığıyla)
G_{α_z}	<i>GNAZ</i>	Nöronal, trombositler	AC (ör., V,VI) ↓ (direkt düzenleme); Rap1GAP
$G_{\alpha_{prot}}$	<i>GNAT3</i>	Tat hücreleri, saç hücreleri	PDE ↑ ?;
$G_{\alpha_{tr}}$	<i>GNAT1</i>	Retinal çubuklar, tat hücreleri	PDE 6 (γ -altıbirim çubuk) ↑
$G_{\alpha_{tc}}$	<i>GNAT2</i>	Retinal koniler	PDE 6 (γ - altıbirim koni) ↑
$G_{\alpha_{11}}$ sınıfı			
G_{α_1}	<i>GNAQ</i>	Her yerde	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{11}}$	<i>GNAI1</i>	Yaklaşık olarak her yerde	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{14}}$	<i>GNAI4</i>	Böbrek, akciğer, dalak	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{15/16}}$	<i>GNAI6 (Gna15)</i>	Genellikle beyin	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{12/13}}$ sınıfı			
$G_{\alpha_{12}}$	<i>GNAI2</i>	Her yerde	PDZ-RhoGEF/LARG, Btk, Gap1m, cadherin
$G_{\alpha_{13}}$	<i>GNAI3</i>	Her yerde	p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF/LARG, radixin

4.1.3. $G\alpha$ aktivasyon mekanizması

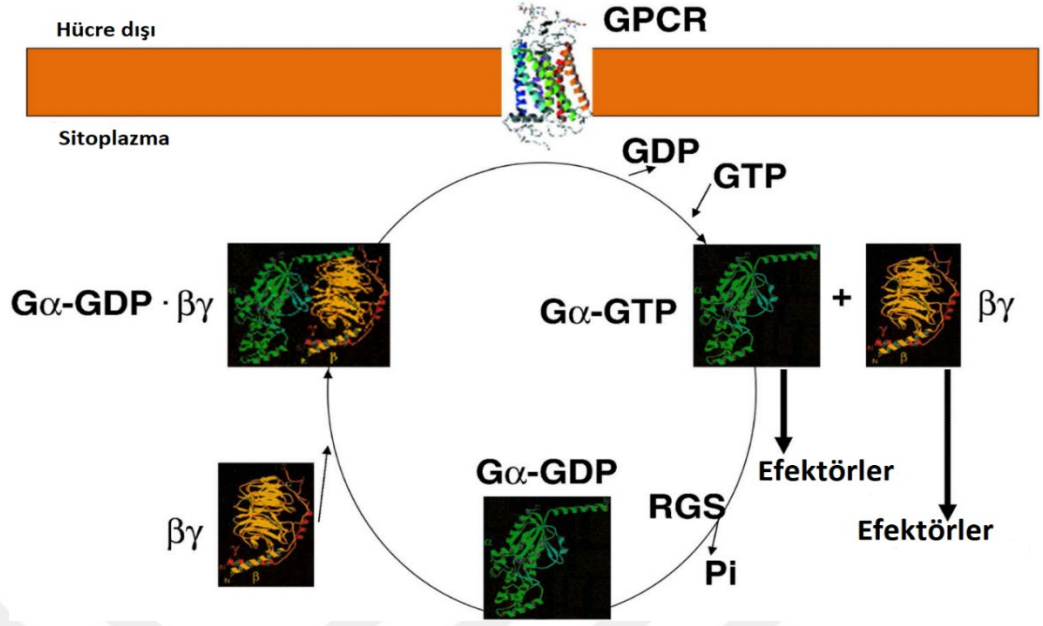
GTP nükleotidinin hücre içi derişimi GDP nükleotidinden daha fazla olması nedeniyle GPCR tarafından uyarılan G proteini çok hızlı bir şekilde GDP-GTP nükleotid değişimini gerçekleştirir. GTP'nin $G\alpha$ alt birimine bağlanması, $G\alpha$ (GTP), $G\beta\gamma$ ve reseptörün yapısal olarak yeniden düzenlenmesine neden olur, bu da reseptörden ayrılmaya ve efektör ile etkileşime izin verir. G proteini üzerindeki 3 anahtar bölgesinde meydana gelen konformasyonel değişiklikle birlikte $G\alpha$ ve $\beta\gamma$ alt birimleri birbirinden ayrılırlar (Oldham & Hamm, 2008).

Guanin nükleotit bağlanma ve ayrılma, G-proteinlerinin Ras-benzeri domeninde gerçekleşir ve bu Ras-benzeri domen hem guanin nükleotid bağlanması hem de GTP hidrolizinde bir platform görevi görür. Bu Ras benzeri domen, tipik bir α/β nükleotid bağlama katıdır ve her iki tarafta yer alan beş halkalı altı şeritli bir β -tabakadan oluşur. Guanin bağlama bölgeleri için iki önemli motif bulunmaktadır. Birincisi, aspartik asidin guanin bazıyla çatallı bir H bağı oluşturduğu düşünülen bir N/TKXD motifidir (burada X herhangi bir amino asittir). İkincisi, Walker A motifi olarak da bilinen GXXXXGKS/T dizi motifini içeren yüksek oranda korunmuş P-döngü bölgesidir. Bu

motife sahip G proteinleri “P-halkası içeren nükleotid trifosfat hidrolaz süper ailesi”ne aittir. (Syrovatkina et al., 2016).

Guanin nükleotidi değişim faktörleri (GEF), nükleotidin afinitesini zayıflatmak için çalışır. G-proteinlerinin GDP için yüksek bir afinitesi vardır, bu da GDP ayrılma sürecinin yavaşlamasına neden olur. Bu engelin üstesinden gelmek için G-proteinleri, bağlı GDP için ilginliğini azaltan ve daha sonra yüksek hücrel derişimi nedeniyle trifosfat parçasının bağlanmasını sağlayan GEF'lerin etkisini kullanır (Şekil 4.1.3.1). G-proteinleri ile GDP veya GTP arasındaki etkileşim çok yüksek olmakla birlikte, GEF'in her iki nükleotide bağlı durumdaki G-proteinine ilginliği çok daha düşüktür. GEF'ler, G-proteinlerinin iki anahtar bölgesinde bozulmalara neden olur. Bağlı GDP, Switch I ve Switch II olarak adlandırılan iki döngü bölgesi tarafından kapsanır ve bu bölgelerin ikincisi korunan N/TKXD motifinin konumudur. Anahtar bölgeleri, P-döngüsü ile birlikte, bağlı nükleotidin fosfatları ve ayrıca koordine edici bir Mg^{2+} iyonu ile etkileşime girer. Bir Ras süper ailesi GTPaz'ın değişim reaksiyonunda, bir GEF, GDP'ye bağlı GTPaz ile, nükleotidin bağlanma bölgesinden kısmen rekabet edeceği şekilde arayüz oluşturur. Daha spesifik olarak, Mg^{2+} iyonu, GTPaz üzerinde bulunan kalıntılar tarafından yer değiştirir ve P-döngü bölgesi ile nükleotit fosfatlar arasındaki etkileşimlerde bozulmaya neden olur. Bu, anahtar bölgeleri ve nükleotid arasında bir "itme-çekme" etkisi yaratır. GTPaz'ın nükleotit için ilginliği, bağlanma bölgesinden gevşetildiğinde azalır ve nükleotit sonunda serbest bırakılır. Son olarak, GTP'yi bağlamakta serbest olan GEF ve GTPaz arasında yüksek ilginlikli bir ikili kompleks oluşur (Syrovatkina et al., 2016).

GDP nükleotidi, $G\alpha$ alt birimine bağlı olarak farklı oranlarda heterotrimerik G proteininden kendiliğinden salınır. Örneğin, $G\alpha_o$ GDP salım hızı (k_{off}) 0.19 dak^{-1} iken $G\alpha_{i2}$ salım hızı 0.072 dak^{-1} 'dir. Bununla birlikte, $G\alpha$ alt birimlerinin etkin olmayan durumu, $G\beta\gamma$ bağlanmasıyla kontrol edilir (Cabrera-Vera et al., 2003). Higashijima ve ark. Mg^{2+} yokluğunda $G\beta\gamma$ 'nin $G\alpha_o$ 'nun GPCR'a olan afinitesini yaklaşık 300 kat arttırdığını göstermiştir (Higashijima, Ferguson, Smigel, & Gilman, 1987). GDP salınımı, G proteininin reseptör aktivasyonu ile büyük ölçüde kolaylaştırılır (Şekil.4.1.3.1) (Cabrera-Vera et al., 2003).



Şekil.4.1.3.1: G protein döngüsü (Syrovatkina et al., 2016)

4.2. G_{α_o} Alt Birimi

G_{α} ve $G\beta\gamma$ alt birimlerinden oluşan heterotrimerik G proteinleri fonksiyonel olarak hücre yüzeyi reseptörlerinden aldığı sinyali hücre içi efektör yapılara, enzimlere ve iyon kanallarına iletir. G_{α} alt birimlerinden biri olan G_{α_o} ilk olarak tanımlandığı yer olan beyinde son derece bol miktarda bulunur. Beyin hücrelerinin yanı sıra kalp, hipofiz bezi ve pankreasta da ifade edilir. Beyin proteinlerinin %0,2-0,5'ini ve büyüme konisi zarının %10'unu oluşturan sinir sisteminde son derece bol bulunan bir proteindir. Sinir sisteminde G_{α_o} çeşitli görevler almaktadır. Sinir hücrelerinde nörit büyümesin üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir (Nakata & Kozasa, 2005). G_{α_o} 'nın diğer bir işlevi, kalsiyum kanallarının düzenlenmesidir. Sinir sisteminde G_{α_o} 'nın nöronal Ca^{2+} ve K^+ kanallarını aktive ettiği de düşünülmüştür. G_{α_o} alt birimi, γ -aminobütirik asit tip B, muskarinik, opioid ve adrenerjik reseptörler gibi bir dizi hücre yüzeyi reseptörü ile etkileşime girer (Valenzuela et al., 1997).

G_{α_o} proteini G_i proteini ailesinin bir üyesidir ve ilk olarak 1986 yılında sığır beyninden boğmaca toksin substratlarının saflaştırılması ile izole edilip cDNA dizisi yayınlanmıştır (Itoh et al., 1986) (Şekil 4.2.1).

```

1 CA GGA AAA AGC ACC ATT GTG AAG CAG ATG AAG ATC ATC CAT GAA GAT GGC TTC TCT GGA GAA GAC GTA AAG CAG TAC AAG CCT GTC GTC
1 Gly Lys Ser Thr Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu Asp Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val
90 TAC AGC AAC ACC ATC CAG TCT CTG GCA GCC ATT GTG CGG GCC ATG GAT ACT CTG GGC GTG GAG TAT GGT GAC AAG GAG AGG AAG GCA GAC
30 Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr Leu Gly Val Glu Tyr Gly Asp Lys Glu Arg Lys Ala Asp
180 TCC AAG ATG GTG TGT GAC GTG GTG AGT CGC ATG GAG GAC ACT GAA CCA TTC TCT GCA GAA CTG CTT TCT GCC ATG ATG CGA CTC TGG GGC
60 Ser Lys Met Val Cys Asp Val Val Ser Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe Ser Ala Glu Leu Leu Ser Ala Met Met Arg Leu Trp Gly
270 GAC TCG GGG ATC CAG GAG TGC TTC AAC CGA TCT CGG GAG TAT CAG CTC AAC GAC TCT GCC AAA TAC TAC CTG GAC AGC TTG GAT CGG ATT
90 Asp Ser Gly Ile Gln Glu Cys Phe Asn Arg Ser Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu Asp Arg Ile
360 GGA GCC GCT GAT TAC CAG CCC ACC GAG CAG GAC ATC CTC CGA ACC AGG GTC AAA ACA ACT GGC ATC GTA GAA ACC CAC TTC ACC TTC AAG
120 Gly Ala Ala Asp Tyr Gln Pro Thr Glu Gln Asp Ile Leu Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe Lys
450 AAC CTC CAC TTC AGG CTG TTT GAC GTT GGG GGC CAG CGA TCT GAA CGT AAG AAG TGG ATC CAC TGC TTC GAG GAT GTC ACG GCC ATC ATC
150 Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp Val Thr Ala Ile Ile
540 TTC TGT GTC GCA CTC AGC GGC TAT GAC GAT GTG CTC CAC GAG GAC GAA ACC ACG AAC CGC ATG CAC GAG TCT CTC ATG CTC TTC GAC TCC
180 Phe Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu His Glu Asp Glu Thr Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Met Leu Phe Asp Ser
830 ATC TGT AAC AAC AAG TTT TTC ATC GAT ACC TCC ATC ATT CTC TTC CTC AAC AAG AAA GAC CTC TTT GGC GAG AAG ATT AAG AAG TCA CCC
210 Ile Cys Asn Asn Lys Phe Phe Ile Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Leu Phe Gly Glu Lys Ile Lys Lys Ser Pro
720 TTG ACC ATC TGC TTT CCT GAA TAC CCA GGC TCC AAC ACC TAT GAA GAC GCA GCT GCC TAC ATC CAA ACA CAG TTT GAA AGC AAA AAC CGC
240 Leu Thr Ile Cys Phe Pro Glu Tyr Pro Gly Ser Asn Thr Tyr Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Ile Gln Thr Gln Phe Glu Ser Lys Asn Arg
810 TCA CCC AAC AAA GAA ATT TAC TGT CAC ATG ACT TGT GCC ACA GAC ACG AAT AAT ATC CAG GTG GTA TTC GAC GCC GTC ACC GAC ATC ATC
270 Ser Pro Asn Lys Glu Ile Tyr Cys His Met Thr Cys Ala Thr Asp Thr Asn Asn Ile Gln Val Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Ile Ile
900 ATT GCC AAC AAT CTC CGG GGC TGT GGC TTG TAC TGA CCTCTGTCTGTATAGCAACCTATTGACTGCTTCATGGACTCTTGCTGTTGATGTTGATCTCTGGTA
300 Ile Ala Asn Asn Leu Arg Gly Cys Gly Leu Tyr End
1007 GCATGACCTTTGGCCTTTGTGAAGACACACAGCCTTTCTGTACCAAGCCCTGTCTAACCTACGACCCAGAGTGACTGACGGCTGTGTATTTCTGTAGAATGCTGTAGAATACGGTTT
1128 AGTTGAGTCTTTACATTAGAACTTGAAGGATTTAAAAAAGGATTTT

```

Şekil 4.2.1: AGX3'ten ($G\alpha_o$) *EcoRI* fragmanının nükleotid ve amino asit dizisi. Nükleotid dizisinin numaralandırılması, açık okuma çerçevesindeki ilk nükleotitte başlar. Çıkarılan amino asit dizisi, nükleotid dizisinin altında gösterilir. Amino asit dizisi, okuma çerçevesindeki ilk amino asit olan Glisin ile başlar. $G\alpha_o$ sıçan beyninden elde edilen triptik peptitlerin amino asit dizilerinin altı çizilmiştir (Itoh et al., 1986).

G_o proteininin hücre içi fonksiyonlarındaki bozuklukların çeşitli hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir. Bu hastalıklardan biri olan Alzheimer hastalığına (AD) beyin hücreleri içerisinde amiloid öncü proteinlerinin (APP), biriken β -amiloid peptitlerinin ($A\beta$) neden olduğu bilinmektedir. Yeniden düzenlenmiş hücre zarlarının kullanıldığı çalışmalar, sitoplazmik alanda APP'nin heterotrimerik G proteini $G\alpha_o$ ile doğrudan etkileşime girebileceğini gösterilmiştir. APP'nin hücre dışı alanına karşı antikorların, endojen APP ligandlarını taklit ederek $G\alpha_o$ aktivitesini uyarabildiği gösterilmiştir. İnsan beyni örneklerini kullanan biyokimyasal analizler, kronik olarak aktive edilen yabani (Wild) tip APP veya AD ile bağlantılı mutant APP izoformlarının aşırı ekspresyonu, G_o 'ya bağlı nörotoksik tepkileri tetikleyebilirken, AD hastalarında endojen APP- G_o etkileşimlerinin bozulduğunu öne sürülmüştür (Copenhaver & Kogel, 2017).

$G\alpha_o$ proteinin ve ek varyantı olan $G\alpha_{o1}$ proteinin görme hücreleri olan ON bipolar ve OFF bipolar hücreleri ile bağlantısı olduğu görülmüştür. $G\alpha_o$ proteindeki görülen mutasyonlar bu hücrelerle olan etkileşimini bozmakta ve hastalığa neden olmaktadır. Kalp kası hücrelerinde de ifade edilen $G\alpha_o$ proteinin mutasyonları sonucu kardiyovasküler hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Wettschureck & Offermanns, 2005).

G α alt biriminin GTPaz domeninde GDP/GTP'nin bağlandığı nükleotid bağlama bölgesinde bulunan G1, G2, G3, G4 ve G5 motifleri tüm G proteinlerinde iyi korunmaktadır (S. R. Sprang, 1997). Bu bölgelerin G α_o 'daki karşılıkları şöyledir:

G1: GAGESGKS	(40-47 numaralı amino asitler)
G2: <u>R</u>VKTTGI	(178-184 numaralı amino asitler)
G3: MFDVGGQR	(198-205 numaralı amino asitler)
G4: FLNKKD	(267-272 numaralı amino asitler)
G5: THFTCAT	(321-327 numaralı amino asitler)

Tüm proteinlerde korunan amino asitler kalın fontla gösterilmiştir. Tez çalışmasına konu olan R178 amino asidi ise G2 bölgesinin ilk amino asidi olup altı çizili olarak gösterilmiştir.

4.3. G Proteini Mutasyonları

Heterotrimerik G proteinleri hücre dışı sinyallerin hücre yüzeyi reseptörlerle etkileşime girmesi sonucu hücre içi sinyalleşmeyi tetikleyecek efektörlere bağlanır. Gen mutasyonları, değiştirilmiş gen ifadesi veya bakteriyel toksinler tarafından modifikasyona uğrayan G proteinleri çeşitli biyolojik sonuçlara neden olur. Yapısal aktivasyona veya fonksiyon kaybına yol açan G protein α alt birim genlerinde birçok mutasyon tanımlanmıştır. Bu tür G protein mutasyonları, sporadik endokrin tümörler, McCune-Albright sendromu ve Albright kalıtsal osteodistrofi dahil olmak üzere birçok insan hastalığının patogenezinde rol oynar (Weinstein & Shenker, 1993).

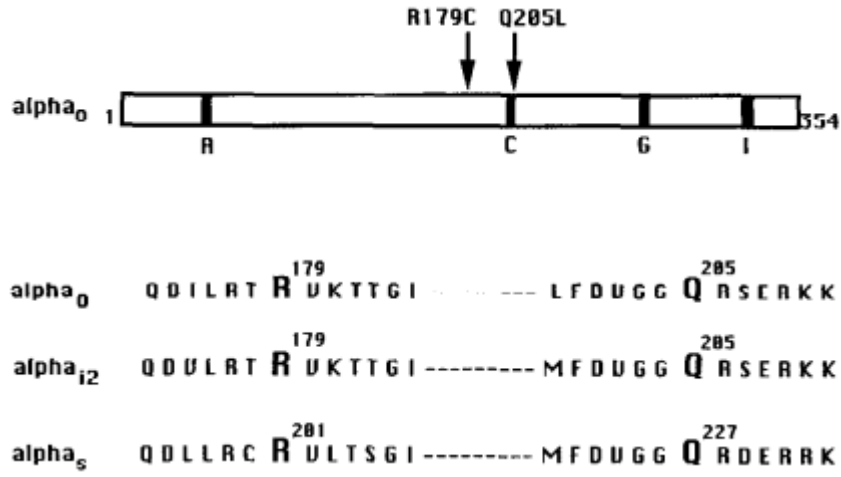
G proteinlerinin aktive edici mutasyonları, G α_s (gsp) ve G α_{i2} (gip), hipofiz tümörlerinin alt gruplarında rapor edilmiştir (B. Kan et al., 2003).

G α alt birimlerinin bakteriyel ekzotikler tarafından translayon sonrası modifikasyonları, G proteinlerinin hastalıklarla ilişkilendirilmesinin ilk örneklerini oluşturur. G α_s Arg201 rezidüsünün kolera toksini tarafından ADP ribozilasyonun

katalize edilmesiyle içsel GTPaz aktivitesinde önemli ölçüde azalmaya bağlı olarak yapısal aktivasyona neden olur. Boğmaca toksini ADP, $\alpha_{i/o}$ ailesinin üyelerinin karboksi terminalinden dört amino asitlik sistein amino asidini ribozillyerek G proteininin reseptörden ayrılmasına neden olur. Gerçekleşen bu süreçler, sırasıyla *V. cholera* ve *B. pertussis* enfeksiyonunun klinik belirtilerinden sorumludur (Weinstein & Shenker, 1993).

GTPaz domenin $\beta 6$ - $\alpha 5$ döngüsünde bulunan TCAT guanin nükleotid bağlama motifindeki rezidülerin mutasyonları, reseptörden bağımsız olarak GDP salınımını artırır. $G\alpha_s$ 'de (A366S), $G\alpha_i$ (A326S) ve $G\alpha_o$ (C325S)'deki benzer aktive edici mutasyonlar GDP salınımını artırır. Bu da bu bölgenin GDP salınımının ortak bir aracısı olarak hizmet ettiğini gösteriyor. TCAT motifine ek olarak, aynı zamanda kendiliğinden GDP salınımının $G\alpha$ alt birimlerinin N ve C terminal alanları içindeki kalıntıları da tanımlamıştır. Örneğin, $G\alpha_i$ 'nin $\alpha 5$ heliksinin içe bakan yüzeyinde bulunan üç mutasyon artan reseptör katalizli nükleotit değişim hızına ek olarak bazal nükleotit değişim hızında dramatik bir artışa neden olur. $G\alpha_s$ 'deki IV anahtarı sarmal alanı içindeki beş kalıntının mutasyonu, GDP salım, GTP γ S bağlanması ve GTP hidroliz oranını azaltır ve böylece sarmal ve GTPaz alanları arasındaki temasların bozulması da bazal GDP ayrışma oranlarını etkiler (Cabrera-Vera et al., 2003).

G_o 'nın nörit büyümesinde düzenleyici bir rolü olup olmadığını değerlendirmek için, G_o proteinine özgü reaktifleri ve yapısal olarak aktive edilmiş mutant ekspresyonunu kullanılarak, $G\alpha_o$ PC12 veya N1E-115 hücrelerinde eksprese edildiğinde, nörit büyümesinin arttığı gösterilmiştir (Cabrera-Vera et al., 2003; Xie, Li, Goshima, & Strittmatter, 1995). Sıçan $G\alpha_o$ proteini ile yapılan çalışmalar R179C mutasyonun etkinliği değiştirici etkileri olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3.1) (Strittmatter et al., 1994). Sıçan $G\alpha_o$ 'nun insandaki karşılığı R178 amino asididir. Arjinin çok uzun bir yan zincire sahip olduğundan herhangi bir amino asitle yer değiştirmesi yapısal ve diğer amino asitlerle etkileşim anlamında önemli olacağından tez çalışması kapsamında R178A mutasyonu kullanılmıştır.



Şekil 4.3.1: $G\alpha$ alt birimlerinin aktive edici mutasyonları. $G\alpha_0$ proteini ve R179C ve Q205L mutasyonlarını çevreleyen kalıntıların şematik bir diyagramı gösterilmiştir. Sıçan α_s , α_{12} ve α_0A 'nın amino asit sekansları, α_s ve α_{12} 'yi aktive ettiği bilinen bu nokta mutasyonlarının bölgeleri etrafındaki yüksek derecedeki tutarlılığı göstermekte. GTP'nin bağlanması ve hidrolizinde rol oynadığı düşünülen alanlar A, C, G ve I olarak belirtilmiştir (Strittmatter et al., 1994).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, $G\alpha_o$ proteinin üçüncül yapısının eksiksiz ve farklı durumlardaki (mutant, yabani, aktif, inaktif) modellerine ihtiyaç duyduğundan iki temel yöntemle yürütüldü:

- a) Benzeşim (Homoloji) Modellemesi
- b) Moleküler Dinamik Simülasyonu (MD)

$G\alpha_o$ proteininin üçüncül yapısının modellenmesinde MODELLER (Sali & Blundell, 1993) uygulamasının 9.23 sürümü kullanıldı. MODELLER uygulaması aracılığıyla oluşturulan $G\alpha_o$ yabani-tip, $G\alpha_o$ mutant-tipler üçüncül yapı modelleri moleküler dinamiklerinin belirlenmesi amacıyla NAMD (Phillips et al., 2005) yazılımıyla moleküler dinamik simülasyona tabii tutuldular.

Python programlama dili kullanılarak uygulamalarda kullanılacak betikler oluşturuldu. Betiklerin ve diğer uygulama dosyalarının düzenlenip oluşturulmasında Notepad++ uygulaması kullanıldı.

BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) uygulaması kullanılarak $G\alpha_o$ proteininin ikincil yapısına benzer olan protein dizilerinin amino asit dizi hizalamaları yapıldı. Aynı yöntemle G_i alt birimlerinde yaygın olarak görülen R179C nokta mutasyonun ve G1-G5 nükleotid bağlanma bölgelerinin $G\alpha_o$ alt birimindeki amino asit karşılıklarının belirlenmesi sağlandı.

Üçüncül yapıları oluşturulan $G\alpha_o$ proteinlerinin üç boyutlu görüntülenmesi amacıyla Chimera v1.14r (Pettersen et al., 2004) ve VMD v1.9.3 (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996) uygulamalarından yararlanıldı. Oluşturulan modellerin Ramachandran grafikleri SwissPDB v4.1 (Guex & Peitsch, 1997) uygulaması ile oluşturuldu.

5.1. Benzeşim (Homoloji) Modellemesi

G α_o proteininin yapısı daha önce modellenmesine karşın (Beki Kan et al., 2011) daha iyi çözünlüğe sahip yeni yapılar yayınlandığından model bu kalıplar kullanılarak yeniden oluşturuldu.

G α_o proteinin 354 amino asitlik dizisi FASTA formatına uygun olarak düzenlendi ve bu dosya MODELLER yazılımına girdi olarak verilerek MODELLER veri tabanında G α_o 'ya benzer diziler araştırıldı.

Elde edilen 2ode.pdb G α_i (Soundararajan et al., 2008), 7jsn.pdb G α_i (Gao et al., 2020) dizileri kullanılarak MODELLER yazılımı ile GDP, GTP ve R178A mutasyonunu içeren dört farklı protein modeli oluşturuldu:

- 1) Go-R178A-GDP
- 2) Go-R178A-GTP
- 3) Go-WildType-GDP
- 4) Go-WildType-GTP

Her proteinden 50 farklı model oluşturuldu ve içlerinden en düşük DOPE skoruna sahip olan model moleküler dinamik simülasyonunda kullanıldı.

2ode'nın A zinciri ve 7jsn'nin E zinciri modelleme kalıbı olarak kullanıldı. İki dizinin de çözünürlükleri sırasıyla 1,90 Å ve 3,2 Å'dür. R178'nin dizideki konumu BioEDIT yazılımı ile belirlendi.

Önce 2ode dizisi tek başına kullanılarak modeller oluşturuldu. Ardından 2ode ve 7jsn dizileri çoklu kalıp olarak kullanılarak modeller oluşturuldu. Son aşamada modelde bulunan halka kısımlar MODELLER işlevleri kullanılarak iyileştirildi.

5.2. Moleküler Dinamik Simülasyonu

Benzeşim modellemesi yöntemiyle elde edilen $G\alpha_o$ Alt birimine ait 4 farklı protein modeli için gereken psf uzantılı yapı dosyaları VMD (v1.9.3) yazılımı (Humphrey et al., 1996) kullanılarak elde edildi. Protein topoloji ve parametre dosyaları CHARMM Kuvvet Alanları'nın (CHARMM Force Field) son sürümü (toppar_c36_jul21.tgz) içinde bulunan par_all36m_prot.prm ve top_all36_prot.rtf (Huang et al., 2017) dosyaları kullanılarak elde edildi. Guanin nükleotidleri (GDP ve GTP) için gereken topoloji ve parametre dosyaları yine CHARMM Kuvvet Alanları içinde bulunan toppar_all36_na_nad_ppi.str ve par_all36_na.prm (Hart et al., 2012) dosyaları kullanılarak elde edildi. Guanin nükleotidleri için gereken topoloji verileri toppar_all36_na_nad_ppi.str'den elde edilen verilerden elle oluşturuldu. Protein modelleri VMD yazılımı kullanılarak su küresiyle kaplandı. Su küresi GDP nükleotidi içeren protein modellerinin en dışta kalan atomunu 15 Å, GTP nükleotidi içeren protein modellerinin en dışta kalan atomunu ise 25 Å kadar kaplayacak şekilde düzenlendi. Moleküler dinamik simülasyonu NAMD (v2.14) yazılımı (Phillips et al., 2020) kullanılarak 2 fs adım aralığı ile 50.000.000 adımda toplam 100 µs'ye karşılık gelecek şekilde sulu ortamda gerçekleştirildi. Moleküler dinamik simülasyonları İstanbul Teknik Üniversitesi'nin Ulusal Yüksek Başarımli Hesaplama Merkezi'nin (UHeM) bilgisayar donanımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Proje Adı: gpmds1) (<https://www.uhem.itu.edu.tr/> Erişim tarihi: 19.12.2021).

6. BULGULAR

6.1. Benzeşim (Homoloji) Modellemesi

6.1.1. $G\alpha_o$ yabani-tip (WildType[WT]) üçüncül yapısının GDP ve GTP nükleotidleri ile modellenmesi

354 amino asitten oluşan insan $G\alpha_o$ protein dizisi (GenBank ID: J03238.1) FASTA formatında GoAlpha.ali olarak kaydedilip MODELLER yazılımına girdi olarak verildi.

GoAlpha.ali

```
1 >P1;GoAlpha
2 sequence:GoAlpha:::::0.00: 0.00
3 MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHED
4 GYSEDECKQYKVVVYSNTIQSIIAIIIRAMGRCLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGV
5 MTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLNDSASYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRT
6 RVKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQRSEKWKIHC FEGVTAIIFCVALSDYDLVLAE
7 DEEMNRMHESMKLFDSICNNKWF TETSIILFLNKKDLFE EKIKRSPLTICYPEYTG SNT
8 YEEAAAYIQCFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDAVTDV IIKNNLKECGLY*
9
```

MODELLER veri tabanında $G\alpha_o$ alt birim proteininin ikincil yapısına %98 oranında benzer olan 2ode dizisi elde edildi. Bu dizi **Align2d.py** Python betiği ile MODELLER yazılımına verilerek her iki dizinin hizalanması sağlandı.

Align2d.py

```
1 from modeller import *
2
3 env = environ()
4 aln = alignment(env)
5 mdl = model(env, file='2ode', model_segment=('FIRST:A','LAST:A'))
6 aln.append_model(mdl, align_codes='2odeA', atom_files='2ode.pdb')
7 aln.append(file='GoAlpha.ali', align_codes='GoAlpha')
8 aln.align2d()
9 aln.write(file='GoAlpha-2odeA.ali', alignment_format='PIR')
10 aln.write(file='GoAlpha-2odeA.pap', alignment_format='PAP')
```

Yürütülen betik sonucunda ‘GoAlpha-2odeA.ali’ ve ‘GoAlpha-2odeA.pap’ hizalama dosyaları elde edildi. Böylece proteinlerin dizisel olarak hizalanmaları sağlanmış oldu.

GoAlpha-2odeA.ali

```

1
2 >P1;2odeA
3 structureX:2ode.pdb: 33 :A:+316 :A:::
4 -----EVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
5 NTIQSIIAIIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
6 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVRKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQSRERKKWIHCFEGVTAIIFCV
7 ALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIIILFLNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAA
8 AYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVTDVIIKNNL-----*
9
10 >P1;GoAlpha
11 sequence:GoAlpha: : : : 0.00: 0.00
12 MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAKEVKKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
13 NTIQSIIAIIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
14 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVRKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQSRERKKWIHCFEGVTAIIFCV
15 ALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIIILFLNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAA
16 AYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVTDVIIKNNLKECGLY*
17

```

GoAlpha-2odeA.pap

```

1 _aln.pos 10 20 30 40 50 60
2 2odeA -----EVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQ
3 GoAlpha MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAKEVKKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQ
4 _consrvd *****
5
6 _aln.p 70 80 90 100 110 120 130
7 2odeA YKVVVYSNTIQSIIAIIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGV
8 GoAlpha YKVVVYSNTIQSIIAIIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGV
9 _consrvd *****
10
11 _aln.pos 140 150 160 170 180 190 200
12 2odeA QACFSRSREYQLNDSASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVRKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQ
13 GoAlpha QACFSRSREYQLNDSASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVRKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQ
14 _consrvd *****
15
16 _aln.pos 210 220 230 240 250 260 270
17 2odeA RSEKRWIHCFCFEGVTAIIFCVALSDDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIIILFLNKKD
18 GoAlpha RSEKRWIHCFCFEGVTAIIFCVALSDDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIIILFLNKKD
19 _consrvd *****
20
21 _aln.pos 280 290 300 310 320 330 340
22 2odeA LFEEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAAAYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVTDV
23 GoAlpha LFEEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAAAYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVTDV
24 _consrvd *****
25
26 _aln.pos 350
27 2odeA DVIIKNNL-----
28 GoAlpha DVIIKNNLKECGLY
29 _consrvd *****
30

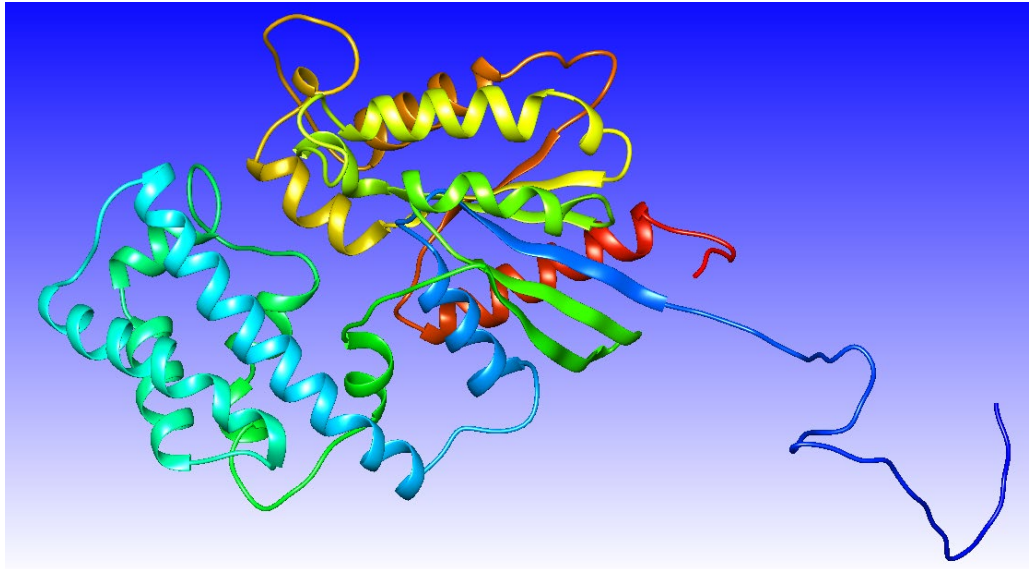
```

Daha sonra $G\alpha_o$ proteininin nükleotid içermeyen üçüncül yapısı **model-single.py** Python betiği ve 'GoAlpha-2odeA.ali' hizalama dosyası kullanılarak MODELLER uygulaması ile oluşturuldu.

model-single.py

```
1 from modeller import *
2 from modeller.automodel import *
3 #from modeller import soap_protein_od
4
5 env = environ()
6 a = automodel(env, alnfile='GoAlpha-2odeA.ali',
7               knowns='2odeA', sequence='GoAlpha',
8               assess_methods=(assess.DOPE,
9                               #soap_protein_od.Scorer(),
10                              assess.GA341))
11 a.starting_model = 1
12 a.ending_model = 1
13 a.make()
14
```

Oluşturulan nükleotid içermeyen $G\alpha_o$ protein yapı dosyası GAlpha_M.pdb dosyası olarak yeniden adlandırıldı.



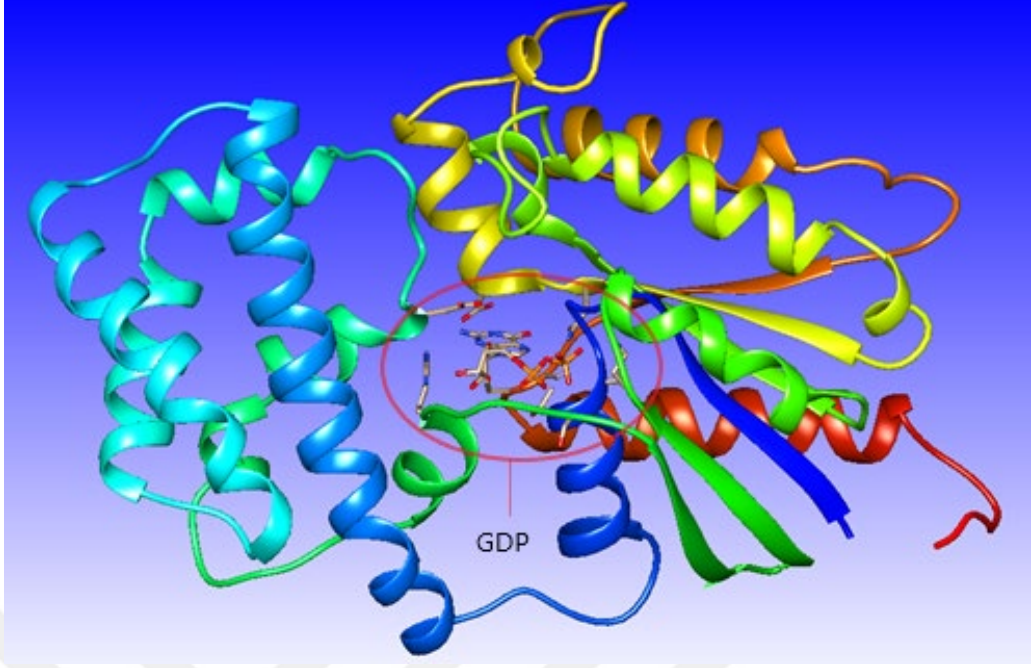
Şekil 6.1.1.1: Nükleotid içermeyen $G\alpha_o$ alt birim proteinin Chimera uygulaması ile görüntüsü.

Gα_o proteinin GDP nükleotidi içeren üçüncül yapısının oluşturulması için ‘GoAlpha-2odeA2.ali’ hizalama dosyası düzenlendi. 2ode yapı dosyasından AlF₄ molekülü ve Mg²⁺ iyonu çıkarıldı.

GoAlpha-2odeA2.ali

```
1 >P1;2odeA
2 structureX:2ode.pdb: 33 :A:+319 :A:::
3 -----EVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
4 NTIQSIIAIIIRAMGRCLKIDFGEAARADDARQLFVLAGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
5 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVKTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQSRERKKWIHCFEGVTAIIFCV
6 ALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFTEISIIILFNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAA
7 AYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDAVTDVLIKNNL-----/...*
8
9 >P1;GoAlpha_M
10 structureX:GoAlpha_M.pdb: : : : 0.00: 0.00
11 MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
12 NTIQSIIAIIIRAMGRCLKIDFGEAARADDARQLFVLAGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
13 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVKTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQSRERKKWIHCFEGVTAIIFCV
14 ALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFTEISIIILFNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAA
15 AYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDAVTDVLIKNNLKECGLY/---*
16
17 >P1;GoAlpha
18 sequence:GoAlpha: : : : 0.00: 0.00
19 MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
20 NTIQSIIAIIIRAMGRCLKIDFGEAARADDARQLFVLAGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
21 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVKTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQSRERKKWIHCFEGVTAIIFCV
22 ALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFTEISIIILFNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAA
23 AYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDAVTDVLIKNNLKECGLY/...*
24
```

Eklenen ve düzenlenen parametrelerle birlikte 2ode protein yapısında bulunan GDP nükleotid molekülü yapısı Gα_o alt birim proteininde karşılık gelen amino asitlerle bağ oluşturacak şekilde modele eklenmiş oldu. Böylece GDP içeren WildType model (GoWildTypeGDP.pdb) oluşturulmuş oldu.



Şekil 6.1.1.2: GDP nükleotid bağlı WildType $G\alpha_o$ (GoWildTypeGDP.pdb) proteinin Chimera uygulaması ile görüntüsü.

Oluşturulan modelin N-ucundan ilk 32 amino asidin kalıp yapılarda karşılığı olmadığından elde edilen modelin bu kısmı güvenilir değildir. O nedenle bu 32 amino asitlik dizi modelden çıkarılmıştır. Böylece moleküler dinamik simülasyonlarda bu bölgeden kaynaklanabilecek dengesizlikler ortadan kaldırılmıştır. Bu bölgenin bilinen herhangi bir işlevi ve düzenli bir ikincil yapısı olmadığından modelden çıkarılması çalışmanın kapsam ve güvenilirliğini etkilemeyecektir.

Modelde 141-150 ve 287-295 numaralı amino asit dizi aralıklarına karşılık gelen iki halkanın üçüncül yapıları **loop_refine.py** betiği ile MODELLER'da iyileştirilmiştir. Her halka için 50'şer adet model oluşturulup DOPE skorlarına göre en düşük enerjili üçüncül yapıları seçilmiştir.

Loop_refine.py

```
1  # Loop refinement of an existing model
2  from modeller import *
3  from modeller.automodel import *
4
5  log.verbose()
6  env = environ()
7  env.io.hetatm = True
8
9  # directories for input atom files
10 env.io.atom_files_directory = '.:../atom_files'
11
12 # Create a new class based on 'loopmodel' so that we can redefine
13 # select_loop_atoms (necessary)
14 class MyLoop(loopmodel):
15     # This routine picks the residues to be refined by loop modeling
16     def select_loop_atoms(self):
17
18         return selection(self.residue_range('141:A', '150:A'),
19                         self.residue_range('287:A', '295:A'))
20
21 m = MyLoop(env,
22            inimodel='GoAlpha.pdb', # initial model of the target
23            sequence='GoAlpha')    # code of the target
24 loop_assess_methods = assess.DOPE
25 m.loop.starting_model = 1        # index of the first loop model
26 m.loop.ending_model   = 50      # index of the last loop model
27 m.loop.md_level = refine.slow   # loop refinement method; this yields
28                                # models quickly but of low quality;
29                                # use refine.slow for better models
30
31 m.make()
32
```

GTP içeren modelin oluşturulması içeren GTP içeren 7jsn proteinin E zincir yapısı kalıp olarak kullanıldı. MODELLER'a verilen kalıp dosyalarının ardından **GoAlpha-mult.pap** ve **GoAlpha-mult.ali** dosyaları çıktı olarak elde edildi.

GoAlpha-mult.pap

```

1  _aln.pos      10      20      30      40      50      60
2  2odeA  -----EVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQ
3  7jsnE  -----
4  GoAlpha MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQ
5  _consrvd *****
6
7  _aln.p      70      80      90      100      110      120      130
8  2odeA  YKVVVYSNTIQSIIAIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLAGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGV
9  7jsnE  -----
10 GoAlpha YKVVVYSNTIQSIIAIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLAGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGV
11 _consrvd * * * * *
12
13 _aln.pos    140      150      160      170      180      190      200
14 2odeA  QACFSRSREYQLNDSASYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTRVKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQ
15 7jsnE  -----
16 GoAlpha QACFSRSREYQLNDSASYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTRVKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQ
17 _consrvd **** *
18
19 _aln.pos    210      220      230      240      250      260      270
20 2odeA  RSERKKWIHCFEGVTAIIFCVALSDDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIILFLNKKD
21 7jsnE  -----
22 GoAlpha RSERKKWIHCFEGVTAIIFCVALSDDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIILFLNKKD
23 _consrvd *****
24
25 _aln.pos    280      290      300      310      320      330      340
26 2odeA  LFEEKIKRSPLTICYPEYTGSNITYEEAAAYIQCFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQVFDAVT
27 7jsnE  -----
28 GoAlpha LFEEKIKRSPLTICYPEYTGSNITYEEAAAYIQCFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQVFDAVT
29 _consrvd *****
30
31 _aln.pos    350
32 2odeA  DVIKNNL.$----x
33 7jsnE  -----y
34 GoAlpha DVIKNNLKECGLY-
35 _consrvd * * *
36

```

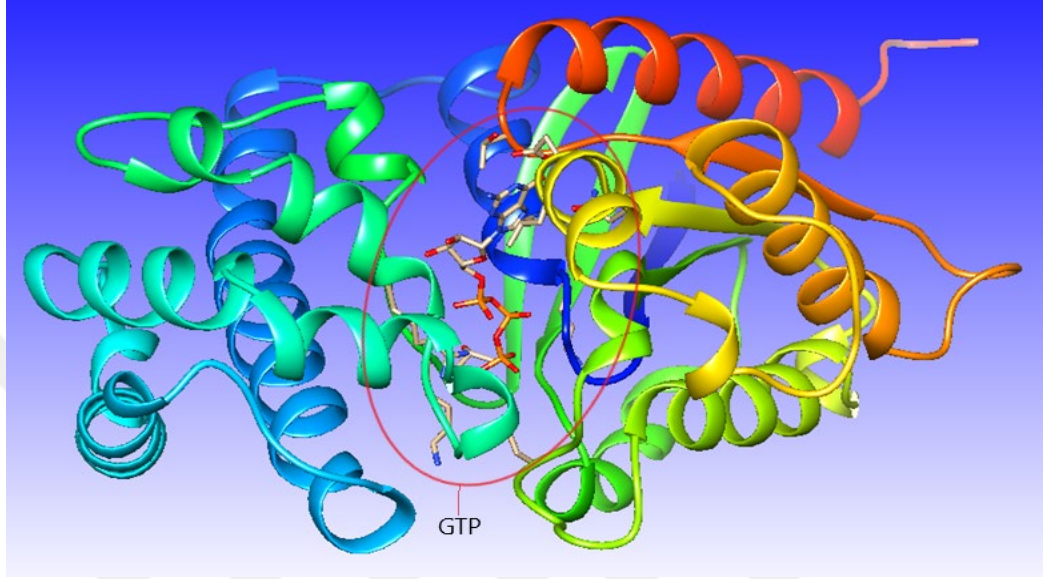
GoAlpha-mult.ali

```

1  >P1;2odeA
2  structureX:2ode.pdb:33 :A:316 :A:::
3  -----EVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
4  NTIQSIIAIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLAGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
5  SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTRVKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQRSERKKWIHCFEGVTAIIFCV
6  ALSDDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIILFLNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSNITYEEAA
7  AYIQCFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQVFDAVTDVIKNNL-----/*
8
9  >P1;7jsnE
10 structureX:7jsn.pdb: 36 :E: 351 :E:::
11 -----GAGESGKSTIVK-----
12 -----LND
13 SAGY-----
14 -----
15 -----HMTCATD-----/*
16
17 >P1;GoAlpha
18 sequence:GoAlpha: : : : 0.00: 0.00
19 MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
20 NTIQSIIAIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLAGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
21 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTRVKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQRSERKKWIHCFEGVTAIIFCV
22 ALSDDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWTETSIILFLNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSNITYEEAA
23 AYIQCFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQVFDAVTDVIKNNLKECGLY/*
24

```

Eklenen ve düzenlenen parametrelerle birlikte 7jsn proteinin E zincirinde bulunan GTP nükleotidi $G\alpha_o$ proteininde karşılık gelen rezidülerle bağ oluşturarak modele eklenmiş oldu.

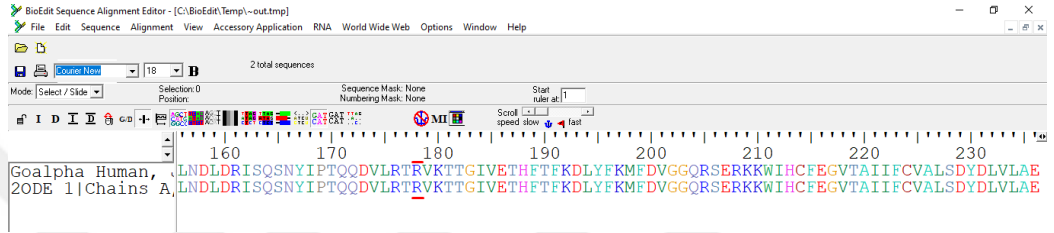


Şekil 6.1.1.3: GTP nükleotid bağlı WildType $G\alpha_o$ (GoWildTypeGTP.pdb) proteinin Chimera uygulaması ile görüntüsü.

GDP içeren modele benzer şekilde modelin N-ucundan ilk 32 amino asit modelden çıkarılmış, 141-150 ve 287-295 numaralı amino asitlere karşılık gelen iki halkanın üçüncül yapıları MODELLER yazılımı ile iyileştirilmiştir. Her iki halka için 50’şer farklı model oluşturulup içlerinden en düşük DOPE enerjisine sahip olan modeller seçilmiştir.

6.1.2. $G\alpha_o$ mutasyonlu üçüncül yapısının GDP ve GTP nükleotidleri ile modellenmesi

Yaygın olarak bulunan bir G_i mutasyonu olan R179 amino asidinin $G\alpha_o$ 'daki karşılığı BioEDIT yazılımı ile R178 olarak belirlenmiştir (Şekil 6.1.2.1) Tez çalışması kapsamında 178 numaralı Arjinin amino asidi Alanin olarak (R178A) değiştirilmiştir.



Şekil 6.1.2.1: $G\alpha_o$ proteinin amino asit dizisi ile 2ode amino asit dizisinin BioEdit uygulamasıyla hizalanması. Kırmızı çizgi $G\alpha_i$ alt birimdeki R179 amino asidinin $G\alpha_o$ alt birimindeki amino asit karşılığını göstermektedir.

$G\alpha_o$ alt birimi amino asit dizisinde karşılık gelen nokta mutasyonu, modelleme için kullanılacak kalıp dosyasında ve hizalama dosyalarında yeniden düzenlendi. $G\alpha_o$ alt biriminin mutasyonlu ve GTP nükleotidli üçüncül yapısının oluşturulabilmesi için $G\alpha_o$ alt birimi ikincil yapısı, 2ode A zinciri ve 7jsn E zinciri yapıları çoklu kalıp olarak MODELLER uygulaması ile hizalandı. **R179AGoGTP.py** Python betik dosyası MODELLER uygulamasıyla yürütülerek 'GoAlpha-mult.pap' ve 'GoAlpha-mult.ali' çıktı dosyaları oluşturuldu.

R179AGoGTP.py

```

1  # Illustrates the SALIGN multiple structure/sequence alignment
2
3  from modeller import *
4
5  log.verbose()
6  env = environ()
7
8  env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files/']
9
10 aln = alignment(env)
11 for (code, chain) in (('2ode', 'A'), ('7jsn', 'E')):
12     mdl = model(env, file=code, model_segment=('FIRST:'+chain, 'LAST:'+chain))
13     aln.append_model(mdl, atom_files=code, align_codes=code+chain)
14
15
16
17 aln.write(file='GoAlpha_mult.pap', alignment_format='PAP')
18 aln.write(file='GoAlpha_mult.ali', alignment_format='PIR')
19
20 aln.salign(rms_cutoff=1.0, normalize_pp_scores=False,
21            rr_file='${LIB}/asl.sim.mat', overhang=30,
22            gap_penalties_ld=(-450, -50), gap_penalties_3d=(0, 3),
23            gap_gap_score=0, gap_residue_score=0, dendrogram_file='lis3A.tree',
24            alignment_type='progressive', feature_weights=[0]*6,
25            improve_alignment=False, fit=False, write_fit=True,
26            write_whole_pdb=False, output='QUALITY')
27
28

```

GoAlpha-mult.pap

```

1  _aln.pos      10      20      30      40      50      60
2  2odeA      -----EVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQ
3  7jsnE      -----
4  GoAlpha    MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQ
5  _consrvd      *****
6
7  _aln.pos      70      80      90     100     110     120     130
8  2odeA      YKVVVYSNTIQSIIAIIRAMGRCLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGV
9  7jsnE      -----
10 GoAlpha    YKVVVYSNTIQSIIAIIRAMGRCLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGV
11 _consrvd      * * * * *
12
13 _aln.pos      140     150     160     170     180     190     200
14 2odeA      QACFSRSREYQLNDSASYLLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVRKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQ
15 7jsnE      -----
16 GoAlpha    QACFSRSREYQLNDSASYLLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVRKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQ
17 _consrvd      *****
18
19 _aln.pos      210     220     230     240     250     260     270
20 2odeA      RSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWF TETSII LFLNKKD
21 7jsnE      -----
22 GoAlpha    RSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWF TETSII LFLNKKD
23 _consrvd      *****
24
25 _aln.pos      280     290     300     310     320     330     340
26 2odeA      LFEEKIKRSPLTICYPEYTGSNTYEEAAAYIQCFEDLNRRKDTKEIYHTFCATDTKNVQFV F DAVT
27 7jsnE      -----
28 GoAlpha    LFEEKIKRSPLTICYPEYTGSNTYEEAAAYIQCFEDLNRRKDTKEIYHTFCATDTKNVQFV F DAVT
29 _consrvd      *****
30
31 _aln.pos      350
32 2odeA      DVIKNNL.$----x
33 7jsnE      -----y
34 GoAlpha    DVIKNNLKECGLY-
35 _consrvd      * * *
36

```

GoAlpha-mult.ali

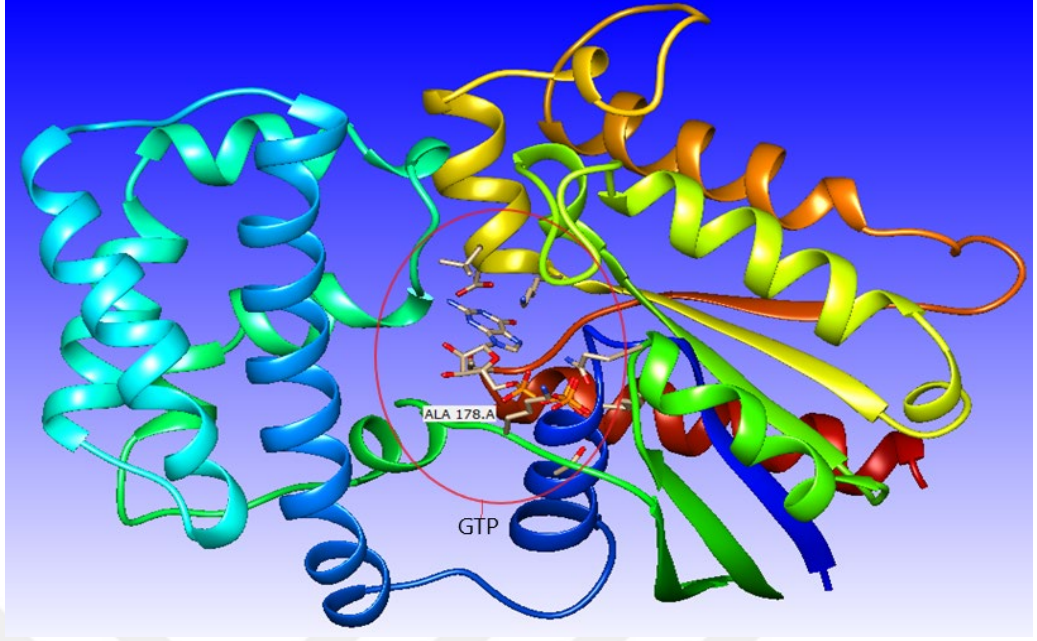
```
1 >Pl;2odeA
2 structureX:2ode.pdb:33 :A:+316 :A:::
3 -----EVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
4 NTIQSIIAIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
5 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTVRKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQSRERKKWIHCFEGVTAIIFCV
6 ALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFTEISIIILFNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAA
7 AYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDVVIKNNL-----/*
8
9 >Pl;7jsnE
10 structureX:7jsn.pdb: 36 :E: 351 :E:::
11 -----GAGESGKSTIVK-----
12 -----LND
13 SAGY-----
14 -----
15 -----HMTCATD-----/*
16
17 >Pl;GoAlpha
18 sequence:GoAlpha: : : : 0.00: 0.00
19 MGCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAKEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGYSEDECKQYKVVVYS
20 NTIQSIIAIIRAMGRLKIDFGEAARADDARQLFVLGSAEEGVMTPELAGVIKRLWRDGGVQACFSRSREYQLND
21 SASYYLNDLDRISQSNYIPTQQDVLRTAVKTTGIVETHFTFKDLYFKMFDVGGQSRERKKWIHCFEGVTAIIFCV
22 ALSDYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFTEISIIILFNKKDLFEKIKRSPLTICYPEYTGSENTYEEAA
23 AYIQCQFEDLNRRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDVVIKNNLKECGLY/*
24
```

Çoklu şablon kullanılarak gerçekleştirilen hizalama işlemi sonrasında G_{α} GTP nükleotidli alt biriminin R178A mutasyonlu üçüncül yapısı, **model-mult.py** Python betiği yürütülerek ve ‘GoAlpha-mult.ali’ hizalama dosyası kullanılarak MODELLER uygulaması ile oluşturuldu.

model-mult.py

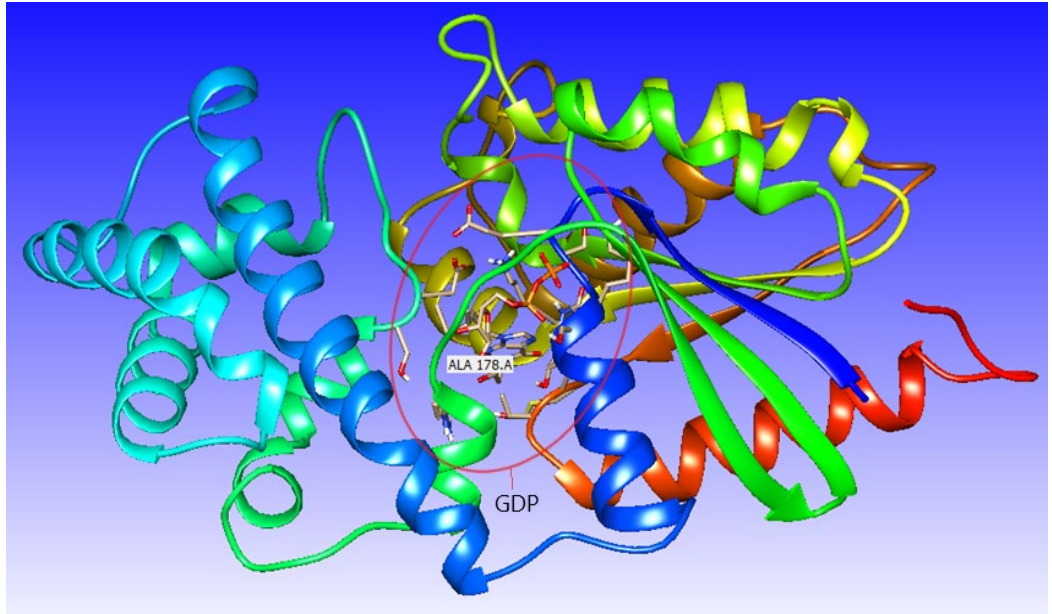
```
1 from modeller import *
2 from modeller.automodel import *
3
4 env = environ()
5 env.io.hetatm = True
6 a = automodel(env, alnfile='GoAlpha-mult.ali',
7               knowns=('2odeA','7jsnE'), sequence='GoAlpha')
8 a.starting_model = 1
9 a.ending_model = 10
10 a.make()
```

Oluşturulan 10 model arasından DOPE skorlarına göre en uygun üçüncül yapı seçildi. Oluşturulan R178A mutasyonlu GTP nükleotid molekülü bağlı model yapısının N-ucundan ilk 32 amino asit modelden çıkarılmıştır.



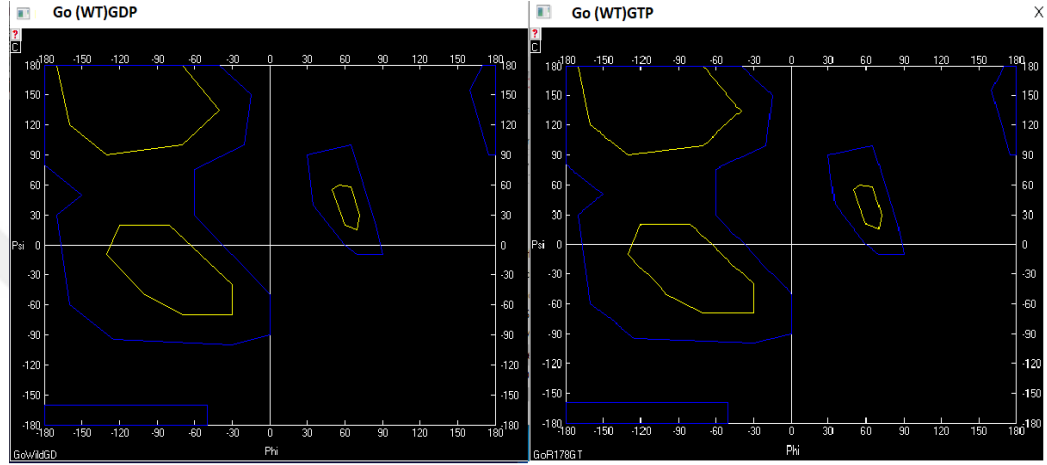
Şekil 6.1.2.2: GTP nükleotid bağlı R178A $G\alpha_o$ (GoR178AGTP.pdb) proteininin Chimera uygulaması ile görüntüsü.

GDP nükleotidi bağlı $G\alpha_o$ alt biriminin R178A mutasyonlu üçüncül yapısının oluşturulmasında 2ODE (G_i) alt birimi şablonundaki GDP molekülü ve A zinciri hariç diğer yapılar olan AlF^{-4} molekülü ve Mg^{+} atomu silinerek, bahsedilen yöntemlerle GDP nükleotid bağlı yapı oluşturuldu.

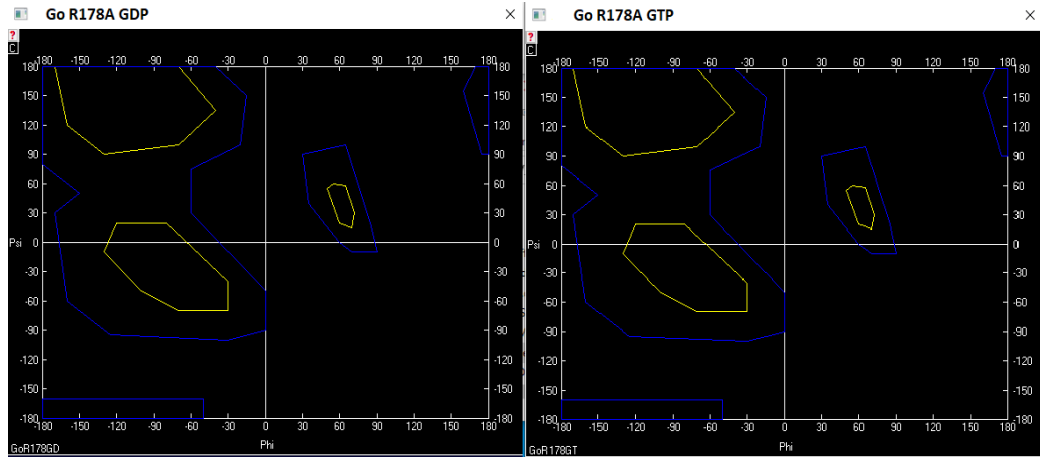


Şekil 6.1.2.3: $G\alpha_o$ alt biriminin GDP nükleotid molekülü bağlı R178A mutasyonlu üçüncül yapısının Chimera uygulaması ile görüntüsü.

$G\alpha_o$ alt biriminin GDP ve GTP nükleotid molekülü bağlı (WT) ve mutasyonlu üçüncül yapılarının oluşturulmasını takiben SwissPDB Viewer uygulaması kullanılarak, oluşturulan modellerin Ramachandran grafikleri elde edildi. Rezidüler arasında peptid bağına ilişkin Psi ve Phi açılarının beklenen değer aralığında olduğu görüldü (Şekil 6.1.2.4 ve Şekil 6.1.2.5).



Şekil 6.1.2.4: $G\alpha_o$ (WT) alt biriminin GDP (sol) ve GTP (sağ) nükleotid molekülü bağlı üçüncül yapılarının Ramachandran grafikleri.



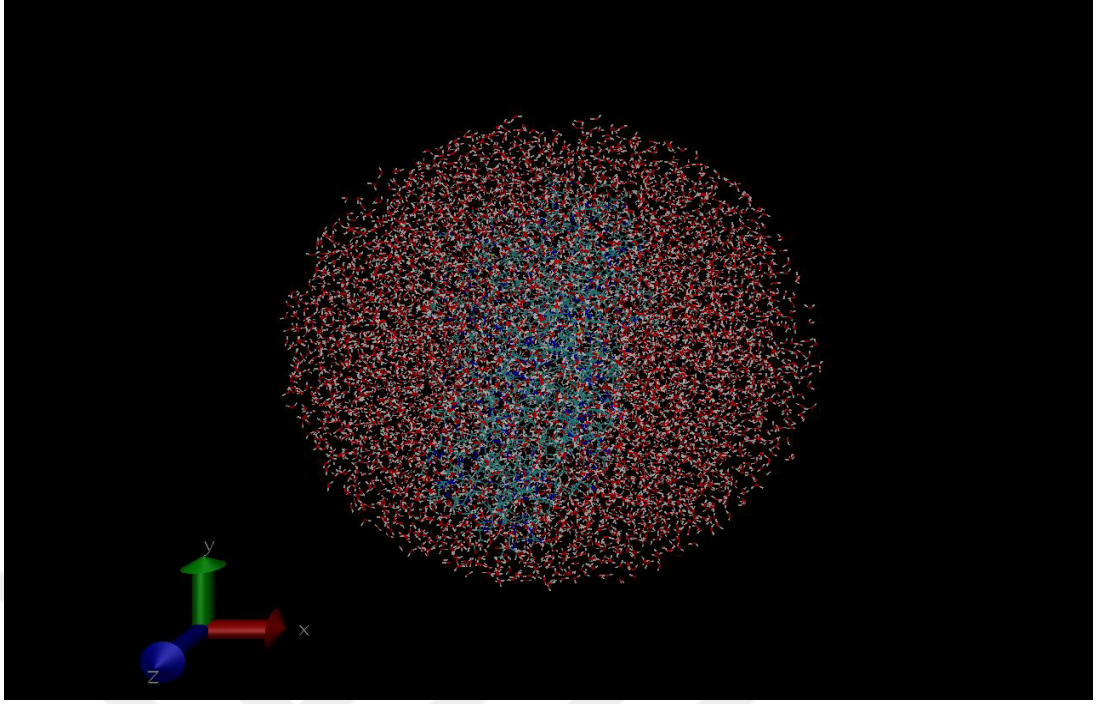
Şekil 6.1.2.5: $G\alpha_o$ R178A mutasyonlu alt biriminin GDP (sol) ve GTP (sağ) nükleotid molekülü bağlı üçüncül yapılarının Ramachandran grafikleri.

6.2. Moleküler Dinamik Simülasyonu

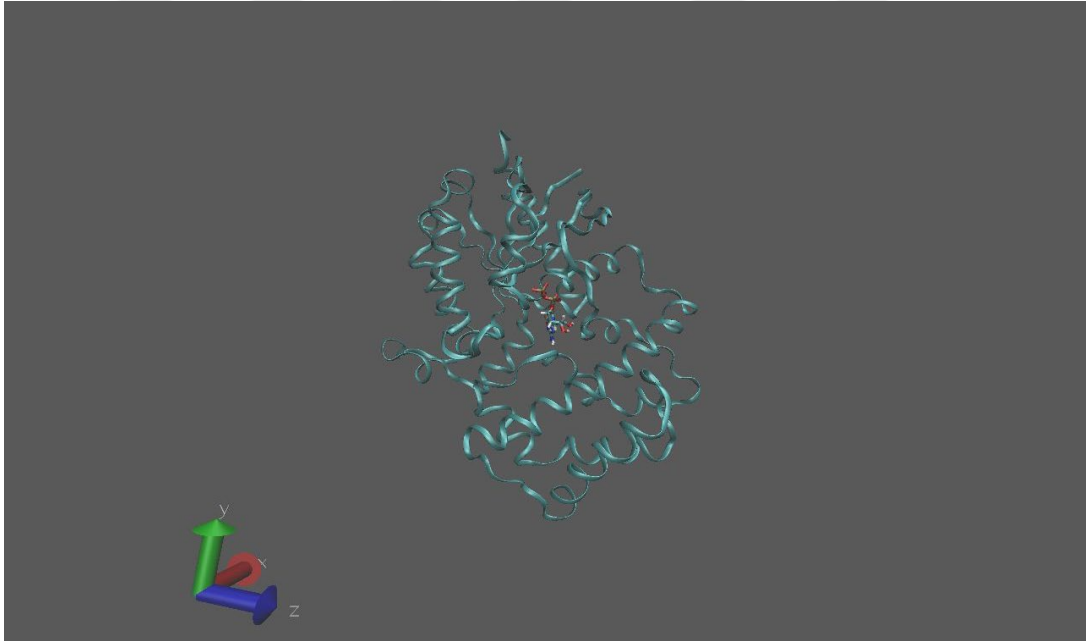
Benzeşim modellemesi yöntemiyle elde edilen 4 farklı $G\alpha_o$ modeli, ayrı ayrı olarak, su küresi ile kaplandıktan sonra 300 K derecede 2 fs adım aralığı ile 50.000.000 adımda NAMD yazılımı ve CHARMM kuvvet alanı kullanılarak moleküler dinamik simülasyona tabi tutuldu. Her model için toplam 100 μ s simülasyon süresine ulaşılmış oldu. Simülasyon sonrasında her modelin bütünü, nükleotid bağlanma bölgeleri (G1-G5 bölgeleri), bütün proteinin her bir amino asidi ve G1-G5 bölgelerinin amino asitleri için ayrı ayrı olarak RMSD değişimleri belirlendi. 50.000.000 adımdan oluşan simülasyon süresince her 5000 adımda bir parametre çıktısı alındı. Analiz sırasında bu çıktıların her 5 tanesinden biri VMD yazılımına yüklendi. Her simülasyon için böylece 25.000 adımda bir veri alınarak 2000 çerçeve elde edildi. Bu veriler kullanılarak aktif ve inaktif proteinlerin sulu ortamdaki davranışı ve bunun mutasyondan nasıl etkilendiği değerlendirildi. RMSD değeri söz konusu atom veya molekülün ortalama olarak ne kadar yer değiştirdiğinin ifadesidir.

6.2.1. GDP bağlı yabani-tip $G\alpha_o$ proteininin (GoWildGDP) moleküler dinamik simülasyonu

Simülasyon sonrası GDP içeren proteinin su küresi ile kaplanmış ve kaplanmamış halleri sırasıyla Şekil 6.2.1.1 ve Şekil 6.2.1.2’de verilmiştir. Protein bütünlüğünü korumakta ve GDP doğru yerde bulunmaktadır.

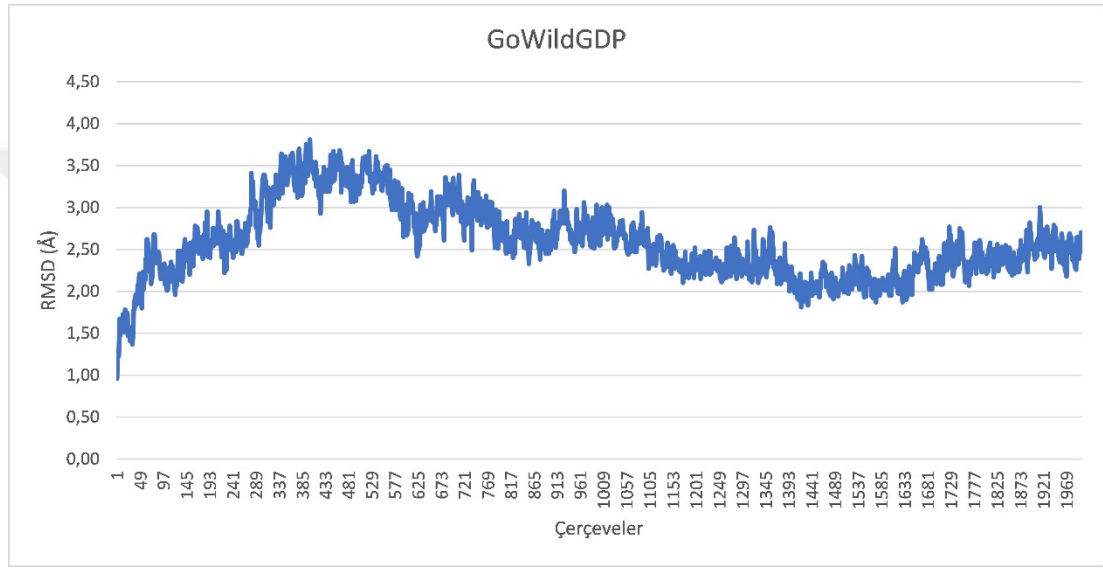


Şekil 6.2.1.1: Moleküler dinamik simülasyon sonrası su küresi ile çevrelenmiş $G\alpha_o$ proteini. Protein GDP bağlamaktadır.



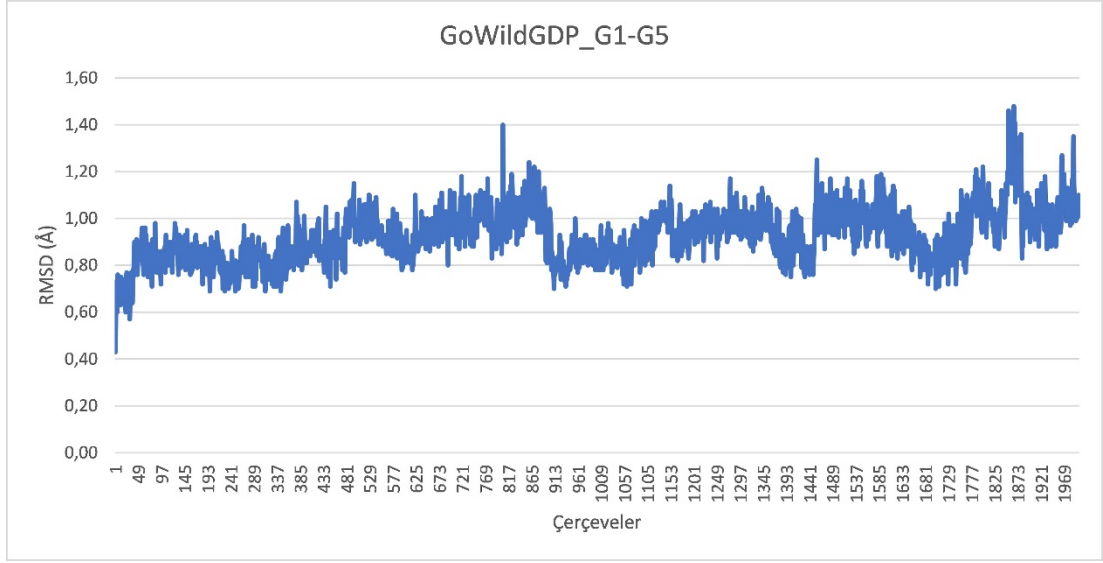
Şekil 6.2.1.2: Moleküler dinamik simülasyon sonrası $G\alpha_o$ proteini. Protein GDP bağlamaktadır. Su molekülleri gösterilmemektedir.

Proteinin tamamı, nükleotid bağlanma bölgeleri (G1-G5 bölgeleri), proteindeki her bir amino asit ve G1-G5 bölgelerinin amino asitleri için ayrı ayrı olmak üzere elde edilen RMSD değişimleri sırasıyla Şekil 6.2.1.3, Şekil 6.2.1.4, Şekil 6.2.1.5 ve Şekil 6.2.1.6'da verilmektedir. Bütün protein kompleksinin RMSD verileri proteinin simülasyonun ardından kararlı bir konformasyona ulaştığını göstermektedir (Şekil 6.2.1.3).



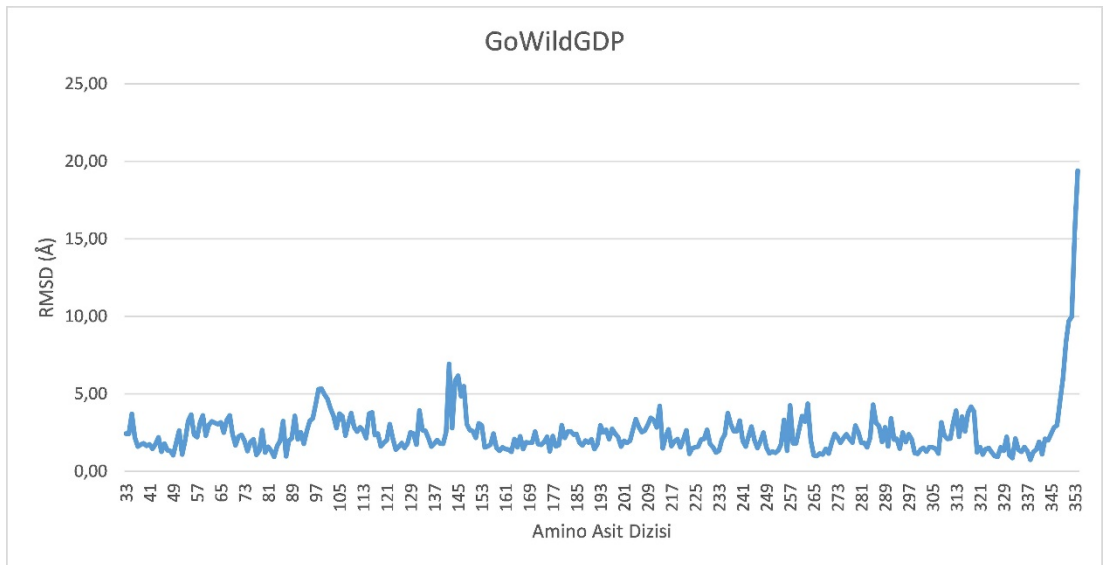
Şekil 6.2.1.3: Tüm protein kompleksine ilişkin RMSD verisi.

Benzer şekilde G1-G5 bölgelerine de bütün olarak bakıldığında simülasyon süresince sistemin hep kararlı olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.1.4). Simülasyonun sonuna doğru RMSD değeri çok az artmasına karşın RMSD'nin 2 Å değerinin altında olması sistemin oldukça kararlı olduğunu göstermektedir.



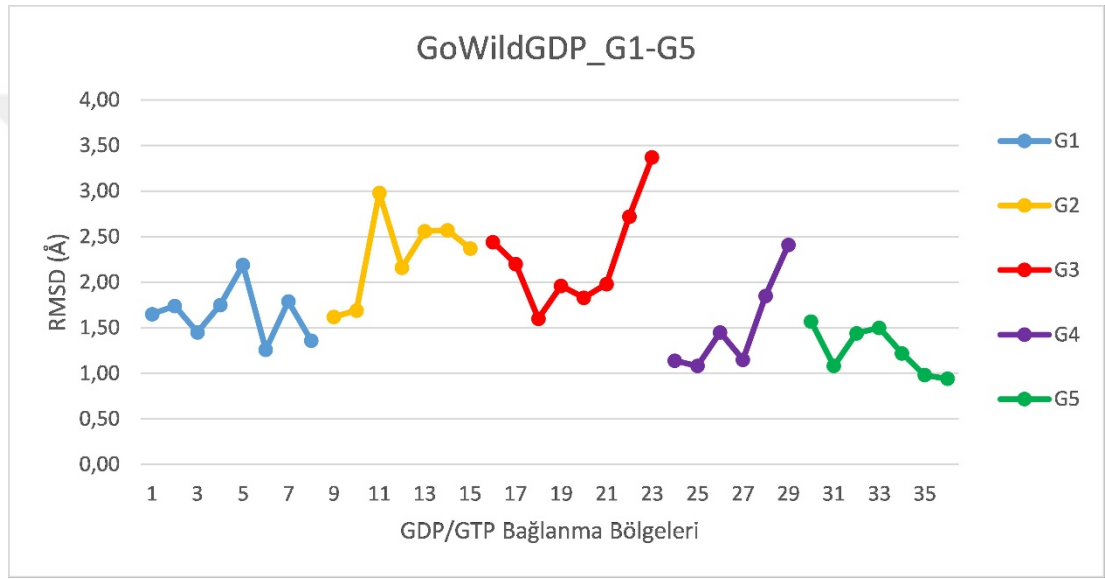
Şekil 6.2.1.4: Nükleotid bağlama bölgesine ilişkin RMSD verisi.

Proteini oluşturan her bir amino asidin RMSD değerlerine bakıldığında C-ucundaki birkaç amino asit dışında diğer RMSD değerlerinin düşük olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.1.5). Bu da sistemin kararlı bir konformasyona sahip olduğunu göstermektedir. C-ucundaki amino asitlerin yüksek RMSD değerlere sahip olması söz konusu bölgenin büyük serbestliğe sahip bir halka olması nedeniyle beklenen bir durumdur.



Şekil 6.2.1.5: Proteini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

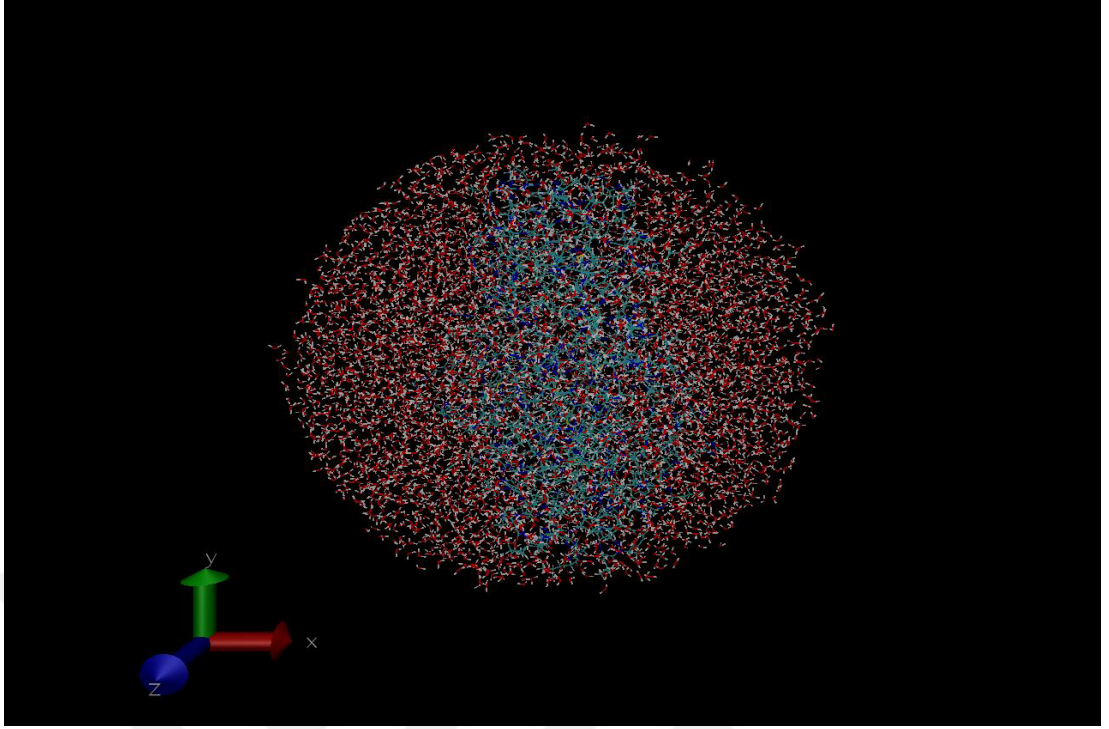
Nükleotid bağlanma bölgelerine bakıldığında ise neredeyse tüm bölgenin kararlı bir yapıda olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.1.6). G2’de bulunan K180 ve G3’te bulunan R205 amino asitlerinin RMSD değeri çok az da olsa yüksek olmasına karşın genelde nükleotid bağlanma bölgesinin kararlı olduğu görülmektedir. Nükleotid bağlanma bölgesinin simülasyon öncesinde kararlı durumda olması GDP’nin buradaki atomlarla kurduğu hidrojen bağlarının bir sonucudur. GDP’nin varlığı bu bağlar aracılığıyla bölgeyi kararlı kılmaktadır.



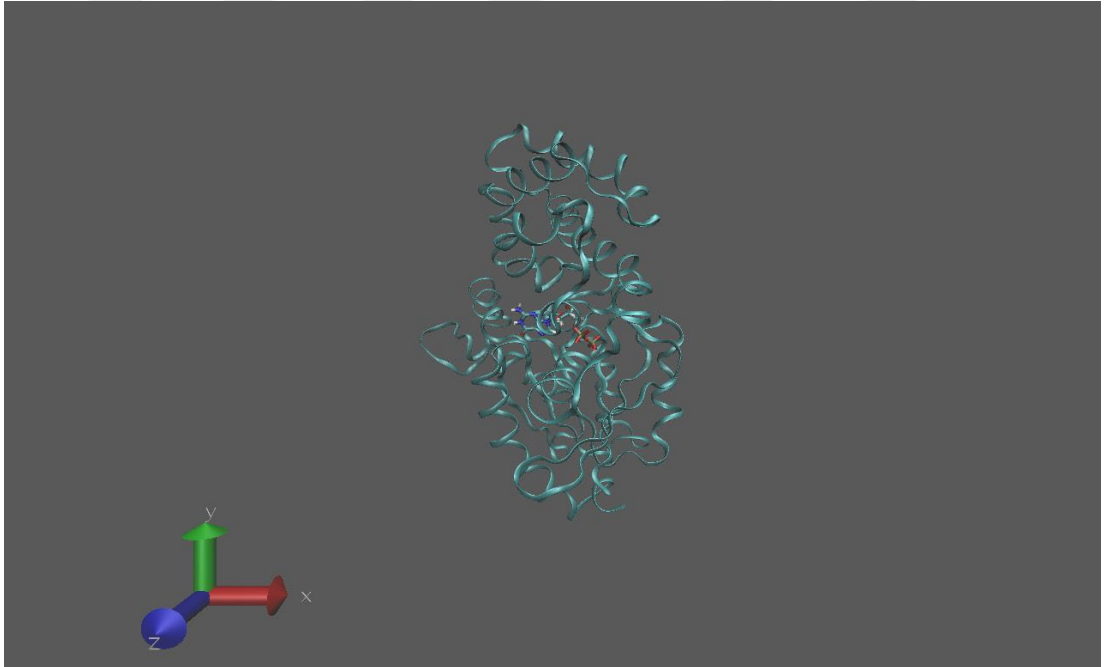
Şekil 6.2.1.6: Nükleotid bağlanma bölgesini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

6.2.2. R178A mutasyonu içeren GDP bağlı $G\alpha_o$ proteininin (GoR178GDP) moleküler dinamik simülasyonu

Simülasyon sonrası GDP içeren proteinin su küresi ile kaplanmış ve kaplanmamış halleri sırasıyla Şekil 6.2.2.1 ve Şekil 6.2.2.2’de verilmiştir. Protein bütünlüğünü korumakta ve GDP doğru yerde bulunmaktadır.

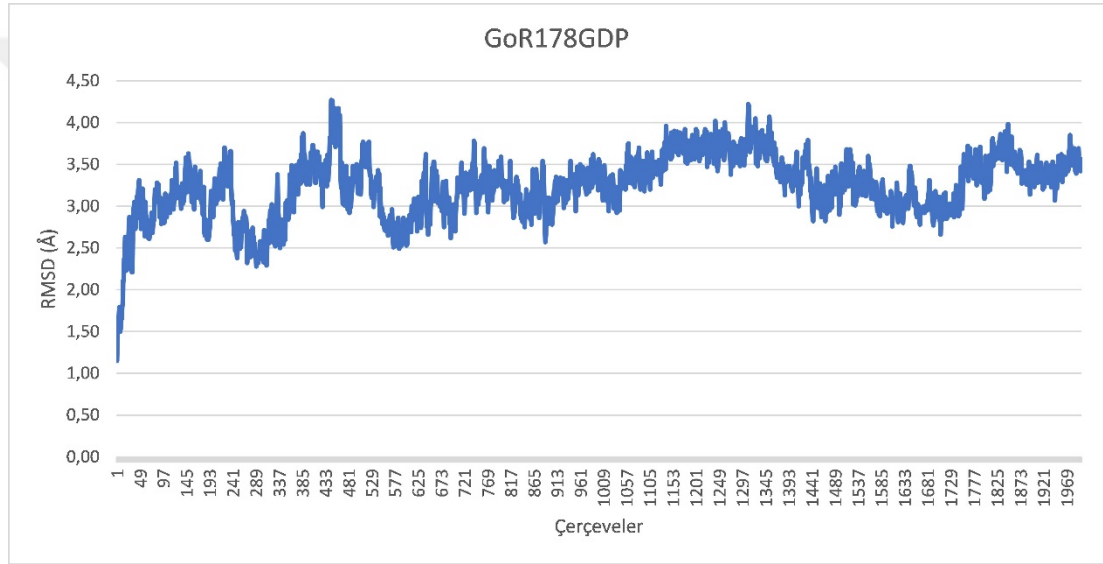


Şekil 6.2.2.1: Moleküler dinamik simülasyon sonrası su küresi ile çevrelenmiş $G\alpha_o$ proteini. Protein GDP bağlamakta ve R178A mutasyonu içermektedir.



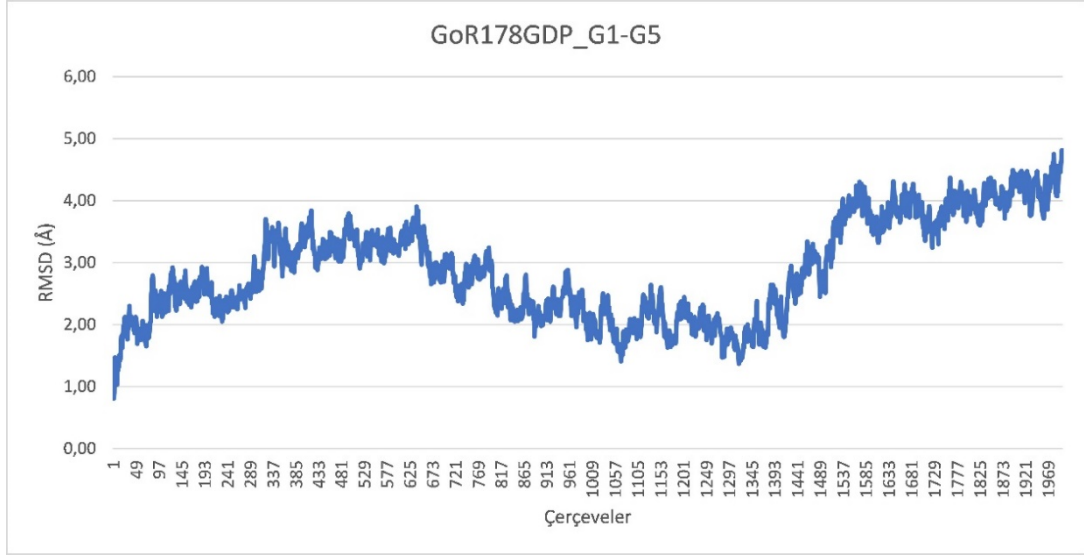
Şekil 6.2.2.2: Moleküler dinamik simülasyon sonrası $G\alpha_o$ proteini. Protein GDP bağlamakta ve R178A mutasyonu içermektedir. Su molekülleri gösterilmemektedir.

Proteinin tamamı, nükleotid bağlanma bölgeleri (G1-G5 bölgeleri), proteindeki her bir amino asit ve G1-G5 bölgelerinin amino asitleri için ayrı ayrı olmak üzere elde edilen RMSD değişimleri sırasıyla Şekil 6.2.2.3, Şekil 6.2.2.4, Şekil 6.2.2.5 ve Şekil 6.2.2.6'da verilmektedir. Bütün protein kompleksinin RMSD verileri proteinin simülasyonun sonuna doğru kararlı bir konformasyona ulaştığını göstermektedir (Şekil 6.2.2.3). Ancak yabani tip proteinin RMSD değerleri (Şekil 6.2.1.3) ile kıyaslandığında mutant proteine ait RMSD değerlerinin görece daha yüksek olduğu görülmektedir.



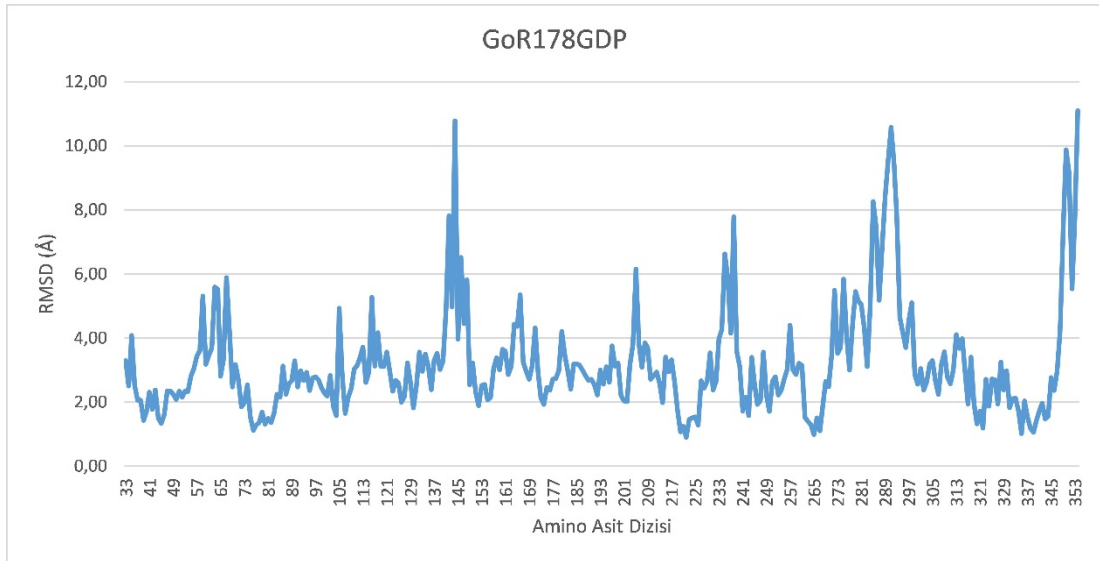
Şekil 6.2.2.3 Tüm protein kompleksine ilişkin RMSD verisi.

Benzer şekilde G1-G5 bölgelerine de bütün olarak bakıldığında simülasyonun sonuna doğru kararlı bir duruma geldiği görülmektedir (Şekil 6.2.2.4). Yine yabani tiple kıyaslandığında (Şekil 6.2.1.4) mutant proteine ait bağlanma bölgesinin RMSD değerlerinin görece daha yüksek olduğu görülmektedir.



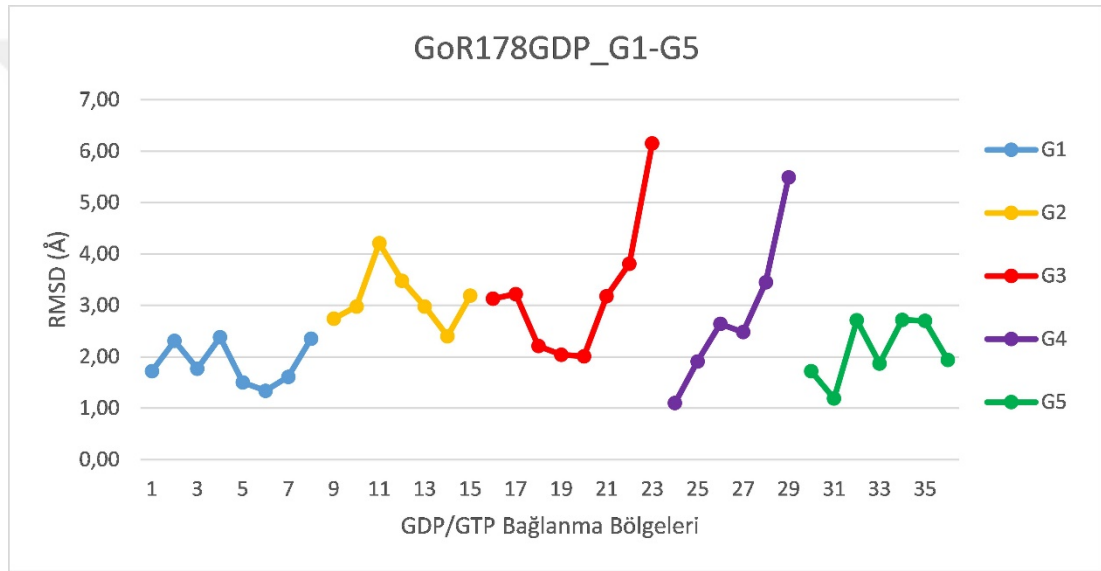
Şekil 6.2.2.4: Nükleotid bağlama bölgesine ilişkin RMSD verisi.

Proteini oluşturan her bir amino asidin RMSD değerlerine bakıldığında bazı amino asitlerin RMSD değerlerinin oldukça büyük olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.2.5). Özellikle yabani tip proteinin amino asitlerine ilişkin RMSD değerleriyle karşılaştırıldığında belirli bölgelerdeki amino asitlerin büyük bir hareketliliğe sahip olduğu görülmektedir. Bu bölgeler 142-148, 234-238 ve 285-293 numaralı amino asit aralıklarına karşılık gelmektedir. Söz konusu bu bölgeler nükleotid bağlanma bölgesine yakın bölgelerdir.



Şekil 6.2.2.5: Proteini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

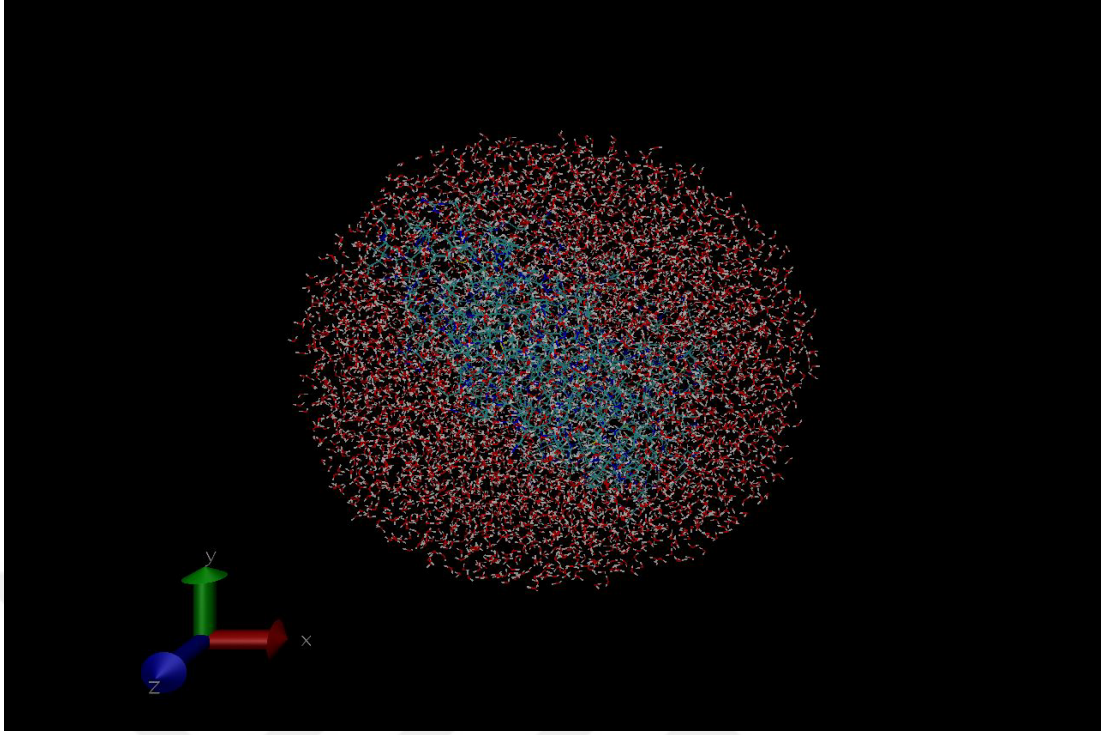
Nükleotid bağlanma bölgelerine bakıldığında G3'te bulunan R205 ve G4'de bulunan D272 amino asitleri dışındaki amino asitlerin kısmen kararlı oldukları, söz konusu iki amino asidin ise görece yüksek RMSD değerlerine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.2.6). Ancak yabani tip proteine ait bağlanma bölgesi amino asitlerin RMSD'lerine kıyasla daha yüksek değerlere sahiptirler. Nükleotid bağlanma bölgesinin simülasyon öncesinde kısmen kararlı durumda olması GDP'nin buradaki atomlarla kurduğu hidrojen bağlarının bir sonucudur. GDP'nin varlığı bu bağlar aracılığıyla bölgeyi kararlı kılmaktadır. R178 amino asidi G2'de bulunmaktadır.



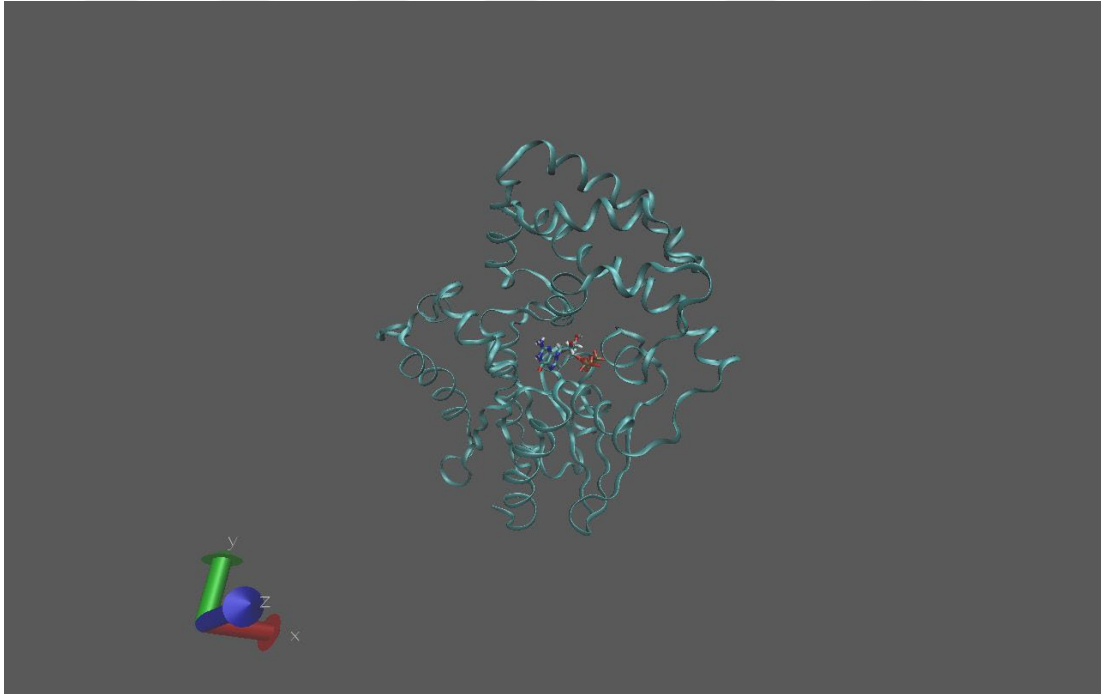
Şekil 6.2.2.6: Nükleotid bağlanma bölgesini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

6.2.3. GTP bağlı yaban tip $G\alpha_o$ proteininin (GoWildGTP) moleküler dinamik simülasyonu

Simülasyon sonrası GTP içeren proteinin su küresi ile kaplanmış ve kaplanmamış halleri sırasıyla Şekil 6.2.3.1 ve Şekil 6.2.3.2'de verilmiştir. Protein bütünlüğünü korumakta ve GTP doğru yerde bulunmaktadır.

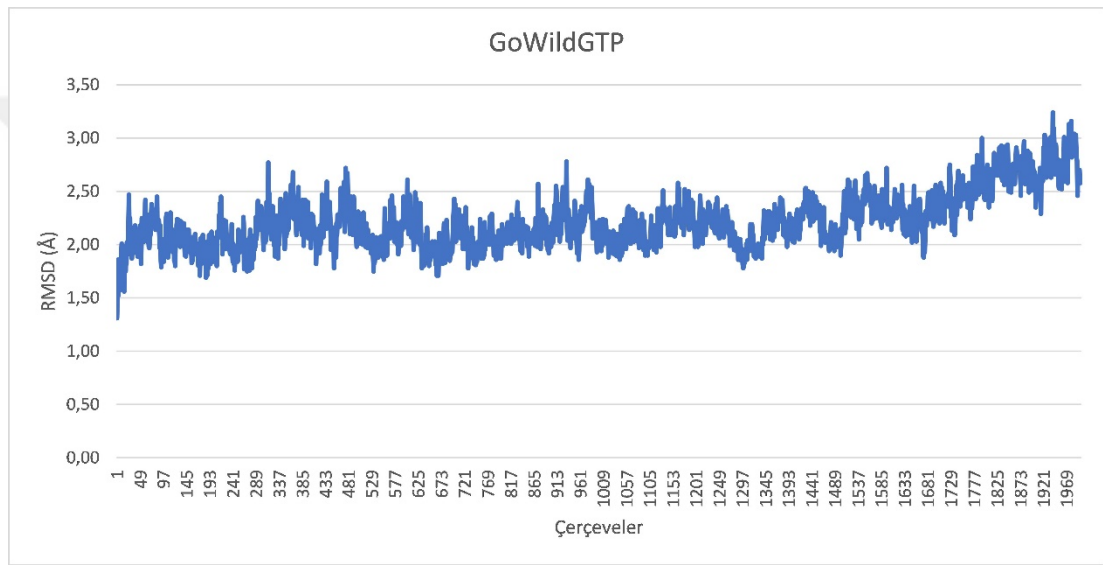


Şekil 6.2.3.1: Moleküler dinamik simülasyon sonrası su küresi ile çevrenmiş $G\alpha_o$ proteini. Protein GTP bağlamaktadır.



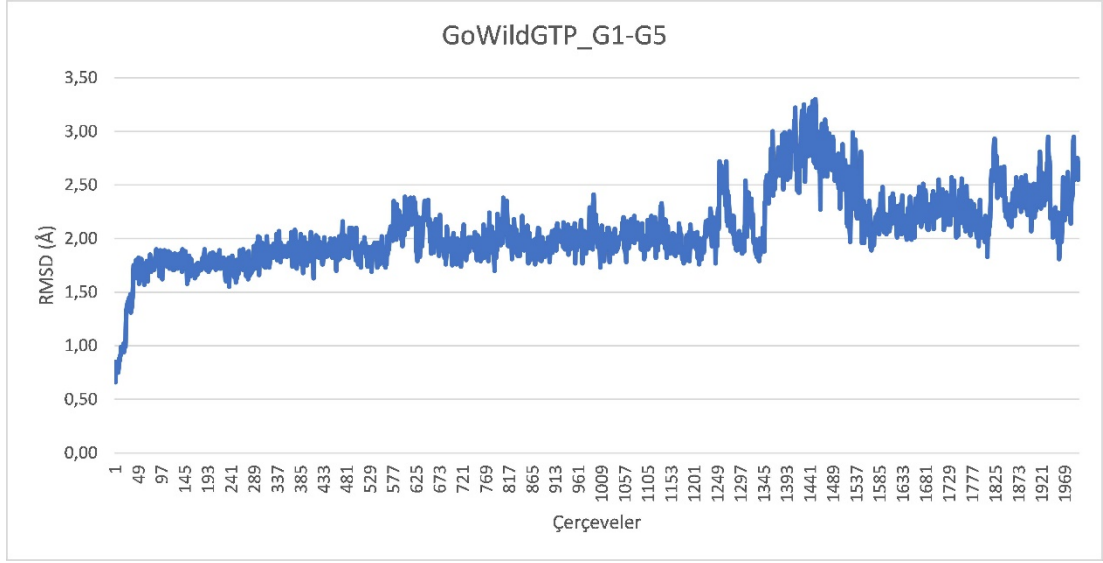
Şekil 6.2.3.2: Moleküler dinamik simülasyon sonrası $G\alpha_o$ proteini. Protein GTP bağlamaktadır. Su molekülleri gösterilmemektedir.

Proteinin tamamı, nükleotid bağlanma bölgeleri (G1-G5 bölgeleri), proteindeki her bir amino asit ve G1-G5 bölgelerinin amino asitleri için ayrı ayrı olmak üzere elde edilen RMSD değişimleri sırasıyla Şekil 6.2.3.3, Şekil 6.2.3.4, Şekil 6.2.3.5 ve Şekil 6.2.3.6’da verilmektedir. Bütün protein kompleksinin RMSD verileri proteinin simülasyonun son kısmı hariç, simülasyon süresince kararlı bir konformasyona sahip olduğunu göstermektedir. Ancak sonlara doğru RMSD’nin artma eğiliminde olduğunu görülmektedir (Şekil 6.2.3.3).



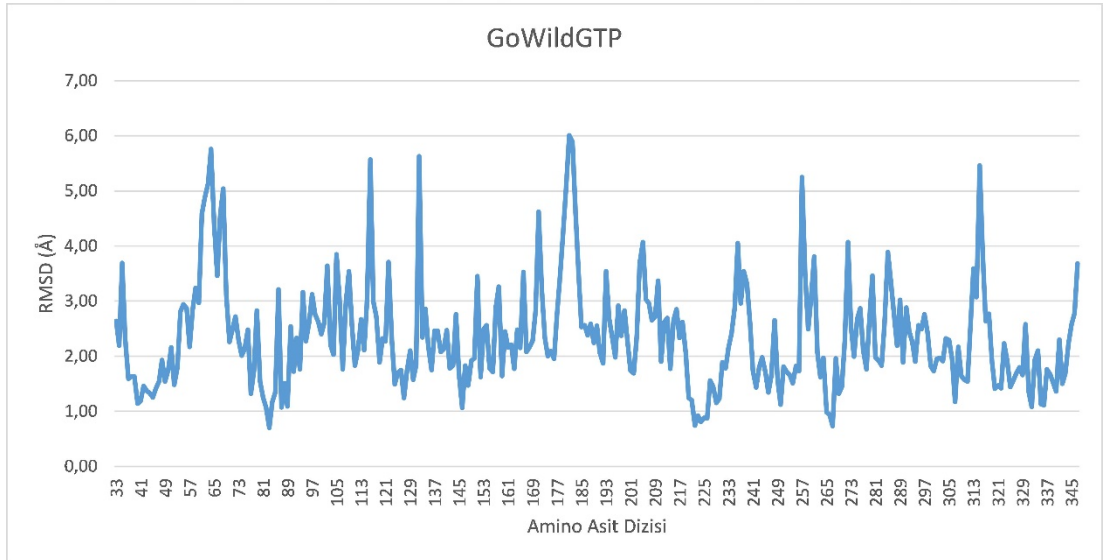
Şekil 6.2.3.3 Tüm protein kompleksine ilişkin RMSD verisi.

G1-G5 bölgelerine bütün olarak bakıldığında simülasyon başlarında kararlı olan sistemin sonlara doğru kararsızlaşma eğilimine girdiği ancak tekrar kararlı bir konformasyona doğru ilerlediği görülmektedir (Şekil 6.2.3.4).



Şekil 6.2.3.4: Nükleotid bağlama bölgesine ilişkin RMSD verisi.

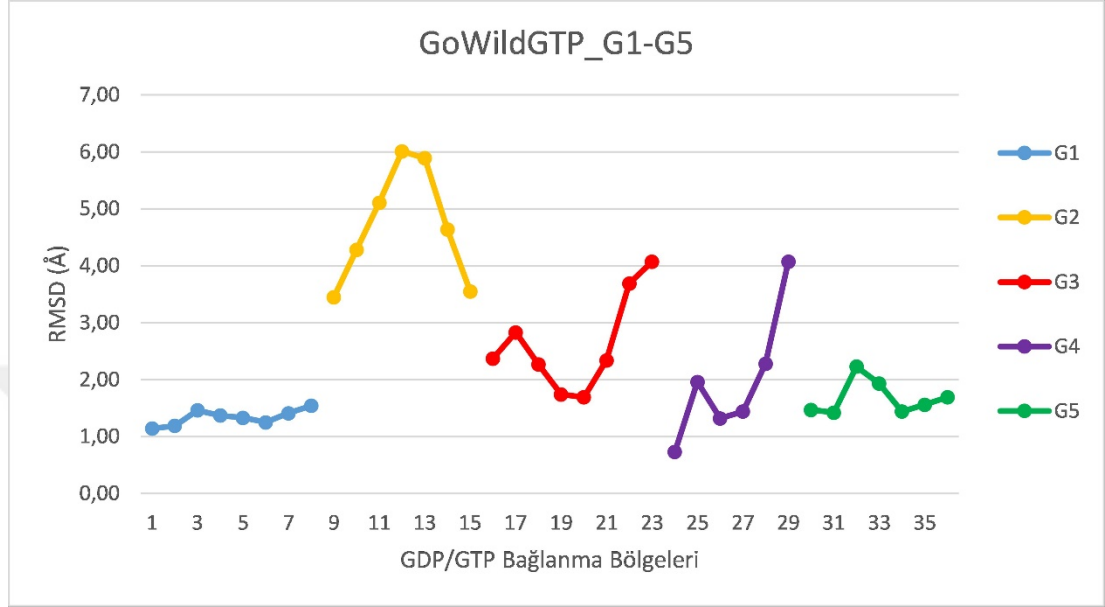
Proteini oluşturan her bir amino asidin RMSD değerlerine bakıldığında ise birçok bölgenin yüksek RMSD değerlerine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.3.5). Bu da sistemin pek kararlı bir konformasyona sahip olmadığını göstermektedir.



Şekil 6.2.3.5: Proteini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

Nükleotid bağlanma bölgelerine bakıldığında ise G2 bölgesinin ve yine sırasıyla G3 ve G4'de bulunan R205 ve D272 numaralı amino asitlerin kararsız oldukları

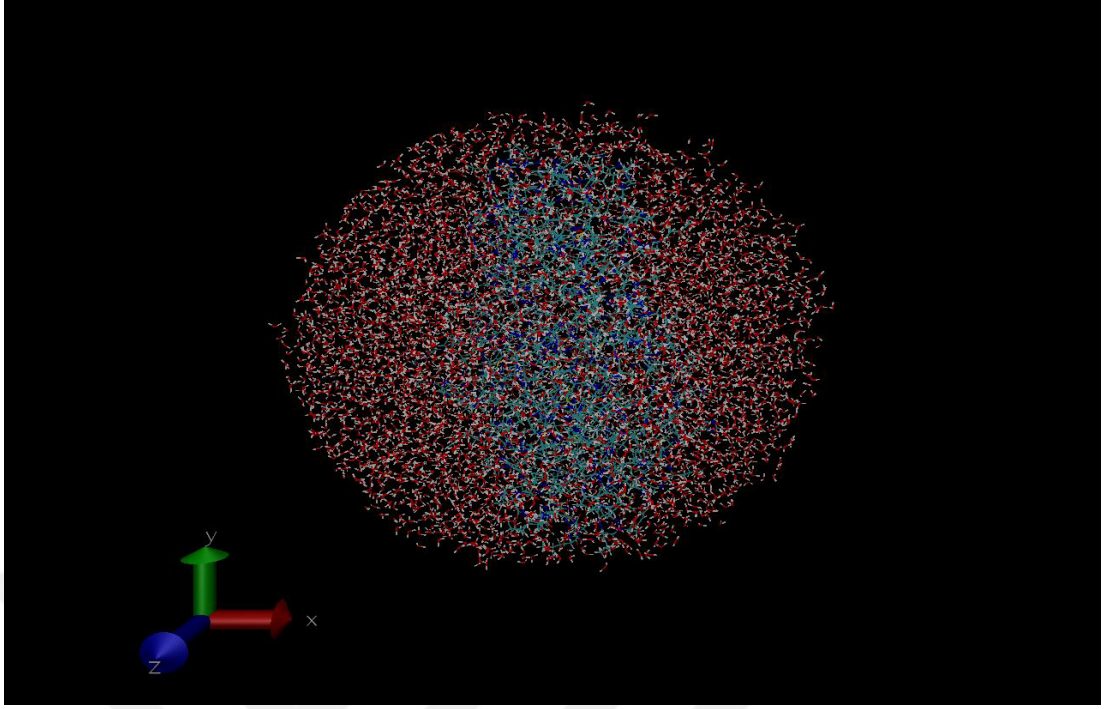
görülmektedir (Şekil 6.2.1.6). G1 ve G5 bölgelerinin ise oldukça kararlı oldukları, çok düşük RMSD değerlerine sahip oldukları görülmektedir.



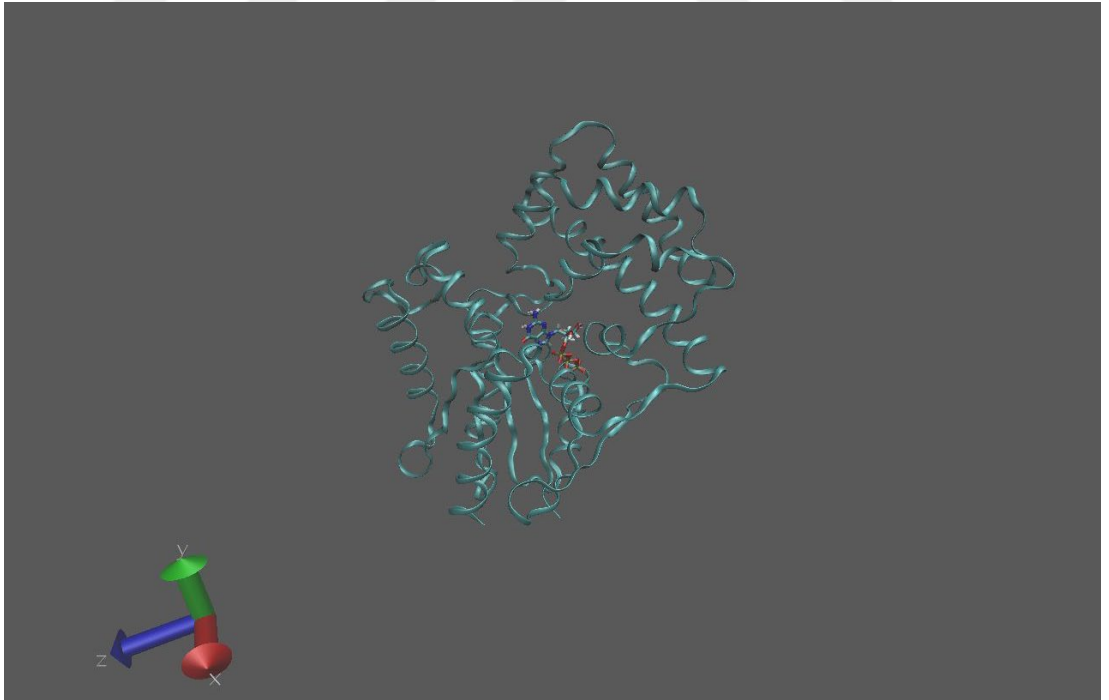
Şekil 6.2.3.6: Nükleotid bağlanma bölgesini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

6.2.4. R178A mutasyonu içeren GTP bağlı $G\alpha_o$ proteininin (GoR178GTP) moleküler dinamik simülasyonu

Simülasyon sonrası GTP içeren proteinin su küresi ile kaplanmış ve kaplanmamış halleri sırasıyla Şekil 6.2.4.1 ve Şekil 6.2.4.2’de verilmiştir. Protein bütünlüğünü korumakta ve GTP doğru yerde bulunmaktadır.

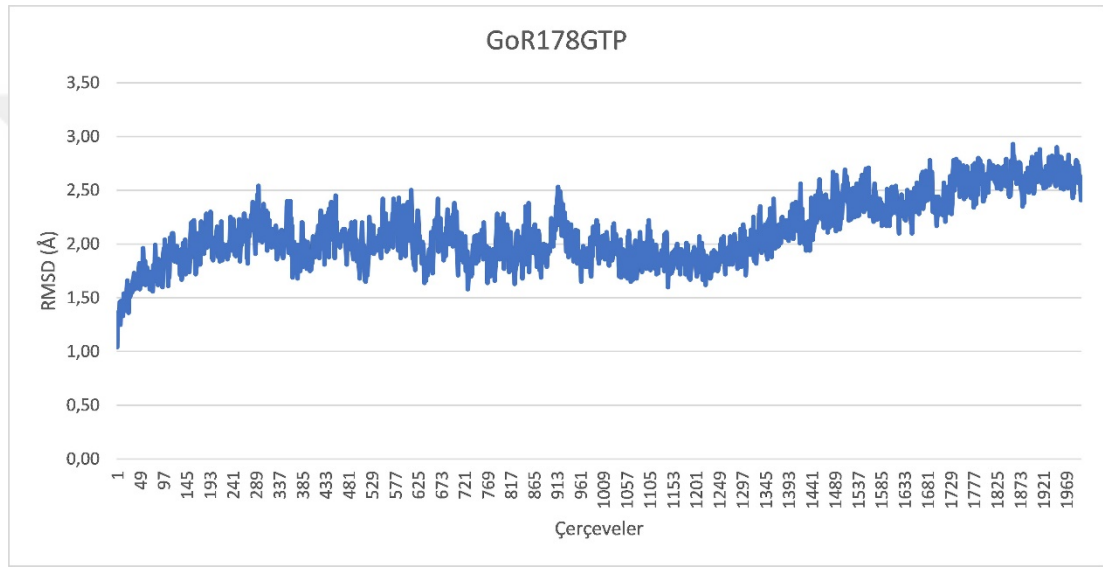


Şekil 6.2.4.1: Moleküler dinamik simülasyon sonrası su küresi ile çevrenmiş $G\alpha_o$ proteini. Protein GTP bağlamaktadır.



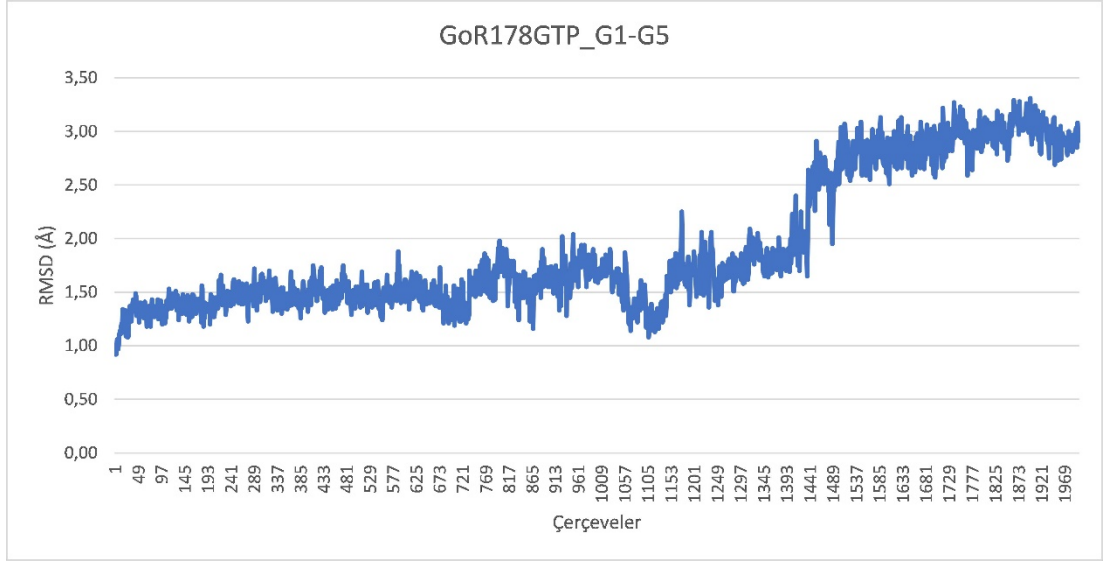
Şekil 6.2.4.2: Moleküler dinamik simülasyon sonrası $G\alpha_o$ proteini. Protein GTP bağlamaktadır. Su molekülleri gösterilmemektedir.

Proteinin tamamı, nükleotid bağlanma bölgeleri (G1-G5 bölgeleri), proteindeki her bir amino asit ve G1-G5 bölgelerinin amino asitleri için ayrı ayrı olmak üzere elde edilen RMSD değişimleri sırasıyla Şekil 6.2.4.3, Şekil 6.2.4.4, Şekil 6.2.4.5 ve Şekil 6.2.4.6’da verilmektedir. Bütün protein kompleksinin RMSD verileri proteinin simülasyonun son kısmı hariç, simülasyon süresince kararlı bir konformasyona sahip olduğunu göstermektedir. Ancak sonlara doğru burada da yabancı tipteki proteinde olduğu gibi RMSD’nin artma eğiliminde olduğunu görülmektedir (Şekil 6.2.4.3).



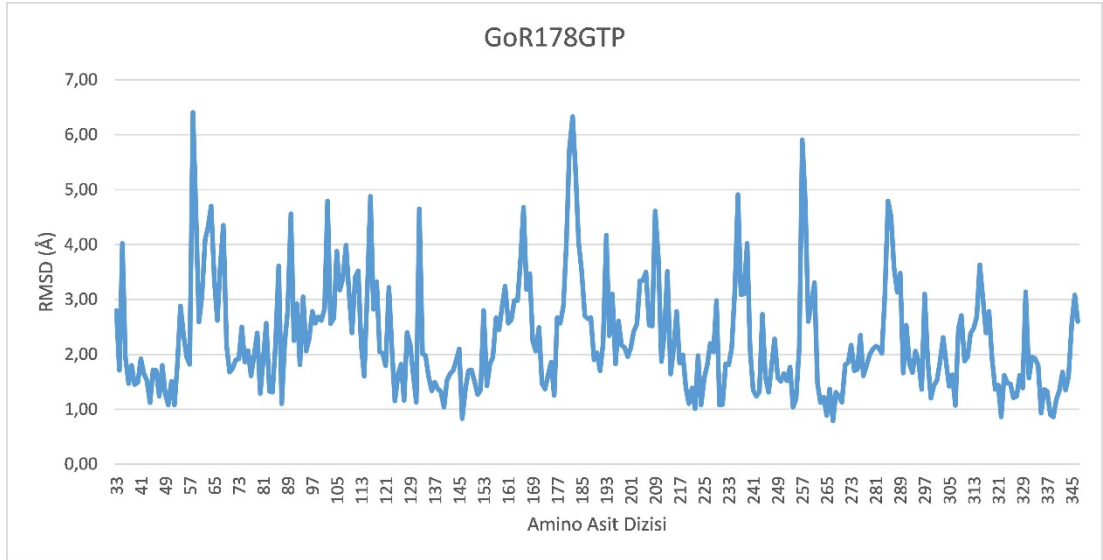
Şekil 6.2.4.3: Tüm protein kompleksine ilişkin RMSD verisi.

G1-G5 bölgelerine bütün olarak bakıldığında simülasyon başlarında kararlı olan sistemin sonlara doğru kararsızlaşma eğilimine girdiği görülmektedir (Şekil 6.2.4.4). RMSD değeri simülasyonun sonlarında yaklaşık olarak iki katına çıkmaktadır.



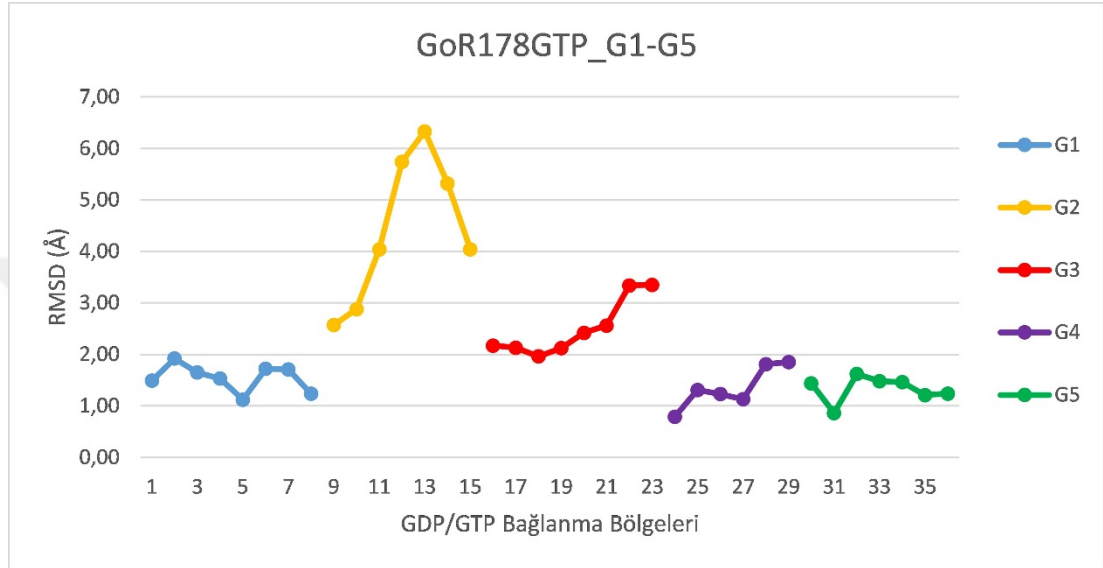
Şekil 6.2.4.4: Nükleotid bağlama bölgesine ilişkin RMSD verisi.

Proteini oluşturan her bir amino asidin RMSD değerlerine bakıldığında ise yabancı tip proteinde olduğu gibi birçok bölgenin yüksek RMSD değerlerine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.4.5). Bu da sistemin pek kararlı bir konformasyona sahip olmadığını göstermektedir.



Şekil 6.2.4.5: Proteini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

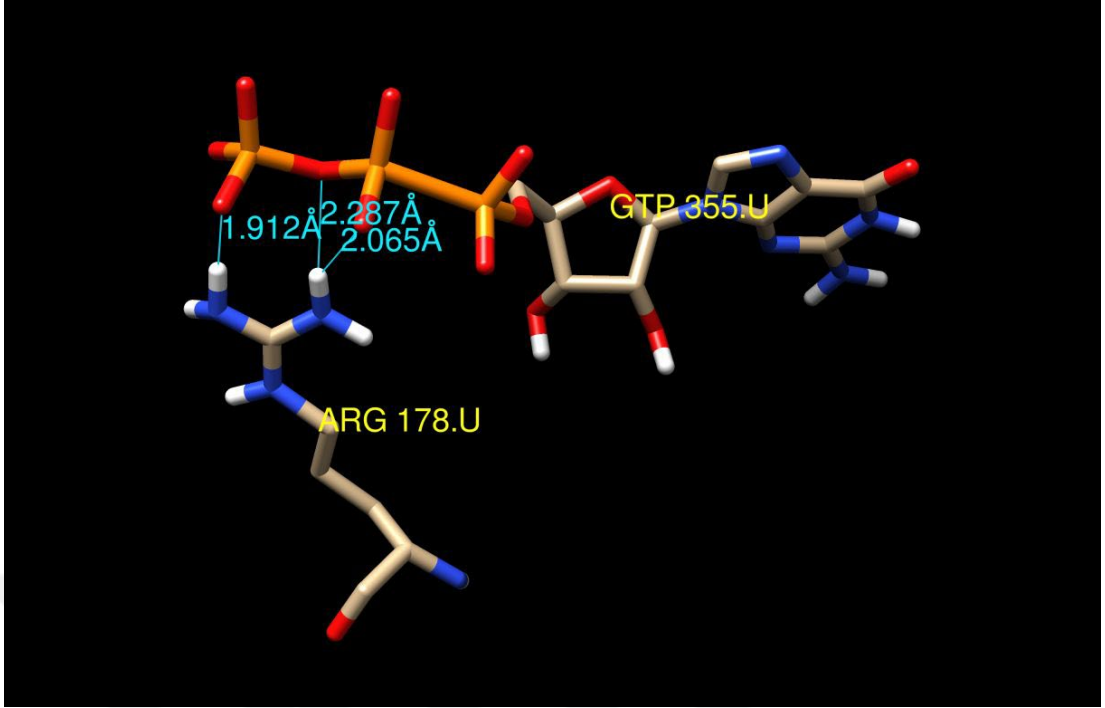
Nükleotid bağlanma bölgelerine bakıldığında ise G2 bölgesinin kararsız olduğu görülmektedir. (Şekil 6.2.4.6). G3 de bulun Q204 ve R205 numaralı amino asitlerin de görece kararsız oldukları görülmektedir. Diğer bölgelerin ise oldukça kararlı oldukları, çok düşük RMSD değerlerine sahip oldukları görülmektedir.



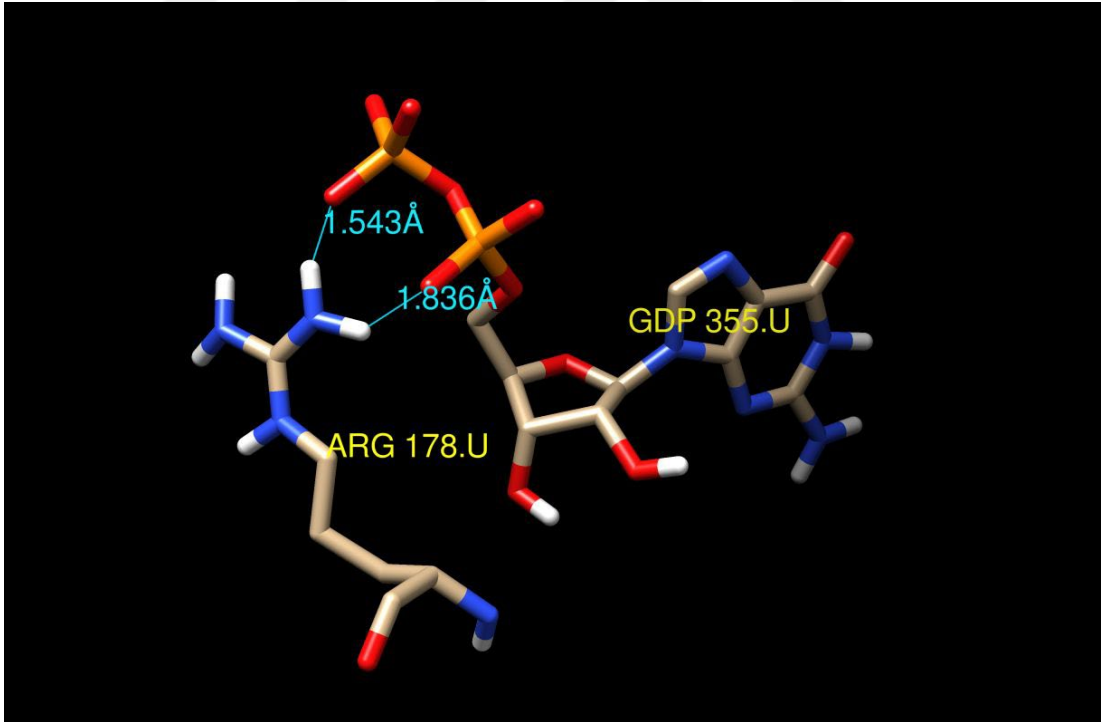
Şekil 6.2.4.6: Nükleotid bağlanma bölgesini oluşturan tüm amino asitlerin her birine ilişkin RMSD verisi.

6.2.5. R178A ve R178 amino asitleri ile GDP ve GTP arasında kurulan H⁺ bağları

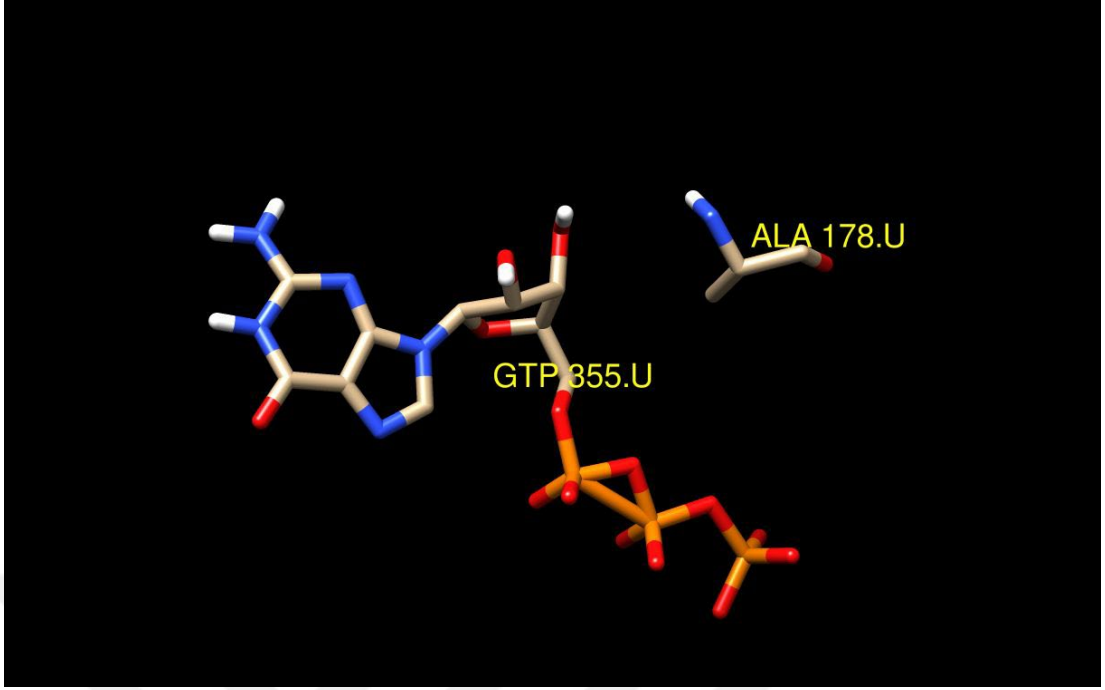
R178-GTP ve R178-GDP amino asit ve nükleotid çiftleri arasında kurulan hidrojen bağları sırasıyla Şekil 6.2.5.1 ve Şekil 6.2.5.2’de gösterilmiştir. Şekil 6.2.5.3 ve Şekil 6.2.5.4’de görüldüğü üzere R178A-GTP ve R178A-GDP amino asit ve nükleotid çiftleri arasında hidrojen bağı tespit edilememiştir. Arjinin amino asidi oldukça uzun bir yan zincire sahip olmasına karşın alanin amino asidinin yan zinciri kısadır. Yan zincirler arasındaki bu büyük fark nedeniyle arjinin amino asidi yerine geçen alanin amino asidinin benzer hidrojen bağları kuramaması biyofiziksel açıdan beklenen bir durumdur. Hidrojen bağları Chimera yazılımı ile belirlenmiştir.



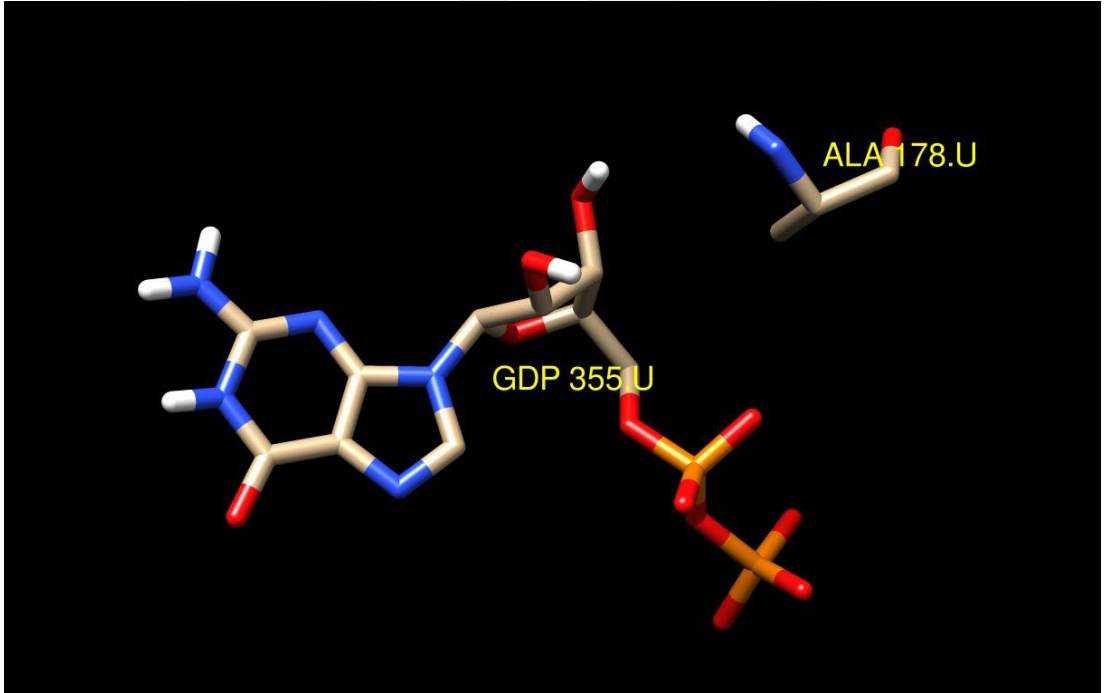
Şekil 6.2.5.1 R178: (Arjinin) amino asidi ile GTP arasında kurulan hidrojen bağları.



Şekil 6.2.5.2: R178 (Arjinin) amino asidi ile GDP arasında kurulan hidrojen bağları.



Şekil 6.2.5.3: R178A (Alanin) amino asidi ile GTP arasındaki etkileşim.



Şekil 6.2.5.4: R178A (Alanin) amino asidi ile GDP arasındaki etkileşim.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmasında R178A mutasyonunun insan G_o proteini alfa alt birimi ($G\alpha_o$) üzerindeki etkisi araştırıldı. R178 amino asidi sıçan G_i proteini alfa alt birimindeki ($G\alpha_i$) R179 amino asidinin insan $G\alpha_o$ proteinindeki karşılığıdır. R179 mutasyonuna ilişkin yapılan çalışmalar bu mutasyonun onkojenik olduğunu düşündürmektedir (Strittmatter et al., 1994). Onkojenik G proteini mutasyonları çoğunlukla GDP/GTP bağlanma bölgelerinde bulunan amino asitlere denk düşmektedir. Bu bölgedeki mutasyonların GTP'nin hidrolizini engelleyerek proteinin sürekli aktif kalmasına neden olduğu ve fizyolojik etkilerinin bunun sonucunda ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (Demeure, Doffek, Komorowski, & Gorski, 1996). Tez çalışmasında R178A mutasyonunun proteinin genel yapısını, G1-G5 dizilerinden oluşan bağlanma bölgesinin yapısını nasıl etkilediği incelendi.

GDP bağlı yabani tip G_o alfa alt birimi modelinin (GoWildGDP) moleküler dinamik simülasyon sonuçları proteinin genel olarak kararlı bir yapıya kavuştuğunu göstermektedir (Şekil 6.2.1.3). Tüm amino asitlerin (C-unundaki birkaç amino asit hariç) RMSD değerlerinin düşük ve benzer olması da (Şekil 6.2.1.5) bu çıkarımı doğrulamaktadır. Nükleotid bağlanma bölgesinde ise, özellikle G2 ve G3'te, az da olsa RMSD değerlerinde artış bulunmaktadır (Şekil 6.2.1.6). G_o -GDP kompleksi G proteinin inaktif formu olduğundan fizyolojik koşullarda tek başına değil, $\beta\gamma$ dimeri ile birleşerek heterotrimerik yapıda bulunur. Bu birleşmenin yapıyı daha kararlı hale getirdiği göz önüne alınırsa simülasyonun proteini kararlı bir yapıya kavuşturduğu söylenebilir.

R178A mutasyonu içeren GTP bağlı, yani aktif durumdaki G_o alfa protein modelinin (GoR178GDP) moleküler dinamik simülasyonuna bakıldığında ise proteinin tam kararlı yapıya kavuşmadığı (Şekil 6.2.2.3), özellikle nükleotid bağlanma bölgesinin daha da kararsız bir yapısının bulunduğu görülmektedir (Şekil 6.2.2.4). Birçok amino asidin RMSD değerinin oldukça yüksek olması da (Şekil 6.2.2.5) kısmi kararsızlığa işaret etmektedir. Yabani tip protein yapısıyla kıyaslandığında nükleotid bağlanma bölgesinde de artan RMSD değerleri söz

konusudur. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında R178A mutasyonunun $G\alpha_o$ -GDP protein kompleksini kısmen kararsız hale getirdiği söylenebilir.

R178A mutasyonunun $G\alpha_o$ -GDP üzerindeki bu etkisi GDP'nin G2 bölgesinin bir amino asidi olan R178 ile hidrojen bağları üzerinden gerçekleşen etkileşimiyle açıklanabilir. Yabani tip proteinde R178 amino asidi GDP ile 2 adet hidrojen bağı kurmaktadır (Şekil 6.2.5.2). Oysa mutant proteinde arjininin yerini alan alanin amino asidi, yani R178A, yan zinciri arjinine kıyasla çok kısa olduğu için GDP ile hidrojen bağı kuramamaktadır (Şekil 6.2.5.4). Protein yapılarında yapısal kararlılık temelde hidrojen bağları tarafından sağlandığından, hidrojen bağı sayısındaki azalma kararlık üzerinde olumsuz etkiye neden olacaktır. Bu etkene karşılık iki nokta da göz önünde bulundurulmalıdır. Birinci nokta GDP'nin fizyolojik koşullardaki üçüncül yapısı ile ilgilidir. GDP bağı $G\alpha_o$ proteini inaktif durumdadır ve inaktif $G\alpha_o$ tek başına bulunmaz, $\beta\gamma$ dimeri ile heterotrimerik kompleks yapmak zorundadır. Oysa simülasyon tek başına $G\alpha_o$ üzerinde yürütülmüştür. Dolayısıyla $\beta\gamma$ dimerinin kararlılık üzerine olan etkisi simülasyon sonucuna yansımamaktadır. İkinci nokta ise simülasyon süresi ile ilgilidir. Kimi proteinlerin kararlı duruma gelmesi daha uzun simülasyon sürelerinin sonunda gerçekleşmektedir. Simülasyon süresi daha arttırılabilirse mutant $G\alpha_o$ proteini daha kararlı bir yapıya kavuşması olasılıklardan biridir. Bunu belirlemenin tek yolu simülasyon süresini arttırmaktır.

GTP bağı yabani tip $G\alpha_o$ proteininin (GoWildGTP) simülasyon sonuçları, proteinin tamamı kararlı durumdayken simülasyonun sonunda (RMSD değerinin artma eğilimine girmesinin de gösterdiği gibi) kararsız hale geçme eğiliminde olduğunu göstermektedir (Şekil 6.2.3.3). Bu belirsizlik ancak simülasyon süresi uzatılarak giderilebilir. Yine de RMSD değerinde çok dik bir artışın olmaması nedeniyle yapının kararlı olduğu söylenebilir. Nükleotid bağlanma bölgesinde ise kararlı yapının kısa süreliğine (1450 numaralı çerçeve civarında) kararsızlaştığı ancak sonra tekrar, kısmen de olsa, kararlı bir yapıya ulaştığı görülmektedir (Şekil 6.2.3.4). Tek tek amino asitlerin RMSD değerlerine bakıldığında da belirli amino asitlerin büyük RMSD değerlerine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.3.5). Nükleotid bağlama bölgesinde ise G2 bölgesinin büyük RMSD değerlerine sahip olduğu, G3 ve

G4 bölgelerinin kısmen yüksek RMSD değerlerine sahip olduğu, G1 ve G5'in ise çok kararlı olduğu görülmektedir (Şekil 6.2.3.6).

Oysa GTP bağlı mutant $G\alpha_o$ proteininin (GoR178GTP) simülasyon sonuçları daha kararlı bir yapıyı göstermektedir. Proteinin bütüne bakıldığında simülasyon sonuna doğru RMSD değerlerinde hafif bir artış olmasına rağmen protein kararlı bir yapıya kavuşmaktadır (Şekil 6.2.4.3). Benzer bir RMSD profili nükleotid bağlanma bölgesi için de gözlenmektedir (Şekil 6.2.4.4). Simülasyon sonlarına doğru artan RMSD değerleri sonrasında kararlı hale gelmektedir. Bütün protein yapısındaki RMSD profilinin nedeni büyük olasılıkla nükleotid bağlanma bölgesindeki bu hareketliliiktir. Tek tek amino asitlerin RMSD profilleri de yabani tip proteininkine benzer şekilde kimi amino asitler için yüksek değerler içermektedir (Şekil 6.2.4.5). Ancak nükleotid bağlama bölgesi yabani tipe göre G3 ve G4 bölgeleri bağlamında daha kararlı görünmektedir. Diğer bölgeler benzer bir profile sahiptir (Şekil 6.2.4.6). GoR178GTP'nin GoWildGTP'ye göre daha kararlı olması bölgelerin hidrojen bağı yapılarına bakıldığında paradoksal bir durumdur. GoWildGTP modelinde R178 ile GTP arasında 3 hidrojen bağı bulunurken (Şekil 6.2.5.1), GoR178GTP modelinde R178A ile GTP arasında hidrojen bağı bulunmamaktadır (Şekil 6.2.5.3). Hidrojen bağlarını kaybetmesine rağmen GoR178GTP modelinde bağlanma bölgesi daha kararlı bir yapıya ulaşmış görünmektedir. Bu paradoksal durum da dikkate alınarak GDP bağlı modellerde de olduğu gibi, 2 noktayı göz önünde tutmak gerekmektedir. Birinci nokta, GTP bağlı aktif proteinin RGS proteini ile etkileşimidir. Aktif $G\alpha_o$ 'da içsel GTPaz etkinliği hemen devreye girerek GTP'yi GDP'ye hidrolizlemeye çalışacaktır. Ancak bu etkinlik çok yavaş gerçekleştiğinden $G\alpha_o$ proteini RGS proteinine gereksinim duymakta, enzimatik etkinlik bu protein aracılığı ile düzenlenmektedir. Oysa simülasyon süreci RGS proteinin içermemekte, RGS'nin $G\alpha_o$ üzerine olan etkisi simülasyon tarafından göz ardı edilmektedir. İkinci nokta da, daha önceki tartışmada da olduğu gibi, simülasyon süresi ile ilgilidir. Daha uzun simülasyon süreleri simülasyon süresinin sonlarında ortaya ortaya çıkan kararlılıkla ilgili eğilimleri açığa kavuşturabilir, proteinlerin daha farklı davrandıklarını gösterebilir.

Simülasyon süreci ile ilgili kısıtlılıklara karşın, elde edilen simülasyon sonuçları R178A mutasyonunun GDP bağlı inaktif haldeki proteini kararsız hale getirirken GTP

bağlı aktif haldeki proteini daha kararlı hale getirdiğini göstermektedir. İnaktif formun artan kararlılığı hidrojen bağlarının azalması ile açıklanabilirken aktif formun artan kararlılığı, hidrojen bağlarının sayısı bağlamında, çelişkili görünmektedir.



8. KAYNAKLAR

- Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C., & Hamodrakas, S. J. (2013). Interactions of the alpha-subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol*, 182(3), 209-218. doi:10.1016/j.jsb.2013.03.004
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., & Hamm, H. E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*, 24(6), 765-781. doi:10.1210/er.2000-0026
- Calebiro, D., & Godbole, A. (2018). Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 32(2), 83-91. doi:10.1016/j.beem.2018.01.004
- Copenhaver, P. F., & Kogel, D. (2017). Role of APP Interactions with Heterotrimeric G Proteins: Physiological Functions and Pathological Consequences. *Front Mol Neurosci*, 10, 3. doi:10.3389/fnmol.2017.00003
- Demeure, M. J., Doffek, K. M., Komorowski, R. A., & Gorski, J. (1996). Gip-2 codon 179 oncogene mutations: absent in adrenal cortical tumors. *World J Surg*, 20(7), 928-931; discussion 931-922. doi:10.1007/s002689900141
- Gao, Y., Eskici, G., Ramachandran, S., Poitevin, F., Seven, A. B., Panova, O., . . . Cerione, R. A. (2020). Structure of the Visual Signaling Complex between Transducin and Phosphodiesterase 6. *Mol Cell*, 80(2), 237-245 e234. doi:10.1016/j.molcel.2020.09.013
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, 56, 615-649. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.003151
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-2723. doi:10.1002/elps.1150181505
- Hall, T. (1999). BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95-98. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10030689140/en/>
- Hart, K., Foloppe, N., Baker, C. M., Denning, E. J., Nilsson, L., & Mackerell, A. D., Jr. (2012). Optimization of the CHARMM additive force field for DNA: Improved treatment of the BI/BII conformational equilibrium. *J Chem Theory Comput*, 8(1), 348-362. doi:10.1021/ct200723y
- Hepler, J. R., & Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(10), 383-387. doi:10.1016/0968-0004(92)90005-t
- Higashijima, T., Ferguson, K. M., Smigel, M. D., & Gilman, A. G. (1987). The effect of GTP and Mg²⁺ on the GTPase activity and the fluorescent properties of Go. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2), 757-761. doi:10.1016/s0021-9258(19)75850-5

- Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., . . . MacKerell, A. D., Jr. (2017). CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods*, 14(1), 71-73. doi:10.1038/nmeth.4067
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
- Itoh, H., Kozasa, T., Nagata, S., Nakamura, S., Katada, T., Ui, M., . . . et al. (1986). Molecular cloning and sequence determination of cDNAs for alpha subunits of the guanine nucleotide-binding proteins Gs, Gi, and Go from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(11), 3776-3780. doi:10.1073/pnas.83.11.3776
- Johnston, C. A., & Siderovski, D. P. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol*, 72(2), 219-230. doi:10.1124/mol.107.034348
- Kan, B., Esapa, C., Sipahi, T., Nacar, C., Ozer, F., Sayhan, N. B., . . . Harris, P. E. (2003). G protein mutations in pituitary tumors: a study on Turkish patients. *Pituitary*, 6(2), 75-80. doi:10.1023/b:pitu.00000004797.89592.5e
- Kan, B., Mega Tiber, P., Orun, O., Nacar, C., Sezerman, O., Severcan, F., . . . Matagne, A. (2011). Structural characterization of recombinant bovine Go α by spectroscopy and homology modeling. *Spectroscopy-Biomedical Applications*, 26, 213-229. doi:10.3233/SPE-2011-0543
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 531-556. doi:10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923
- Marinissen, M. J., & Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, 22(7), 368-376. doi:10.1016/s0165-6147(00)01678-3
- Moreira, I. S. (2014). Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1840(1), 16-33. doi:10.1016/j.bbagen.2013.08.027
- Nakata, H., & Kozasa, T. (2005). Functional characterization of Galphao signaling through G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1. *Mol Pharmacol*, 67(3), 695-702. doi:10.1124/mol.104.003913
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 60-71. doi:10.1038/nrm2299
- 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. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., . . . Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26(16), 1781-1802. doi:10.1002/jcc.20289

- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., . . . Tajkhorshid, E. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys*, 153(4), 044130. doi:10.1063/5.0014475
- Ramaker, J. M., Swanson, T. L., & Copenhaver, P. F. (2013). Amyloid precursor proteins interact with the heterotrimeric G protein Go in the control of neuronal migration. *J Neurosci*, 33(24), 10165-10181. doi:10.1523/JNEUROSCI.1146-13.2013
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-363.
- Sali, A., & Blundell, T. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.(1993). *J. Mol. Biol*, 234, 779.
- Schwartz, T. W., & Sakmar, T. P. (2011). Structural biology: snapshot of a signalling complex. *Nature*, 477(7366), 540-541. doi:10.1038/477540a
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., & Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252(5007), 802-808. doi:10.1126/science.1902986
- Slep, K. C., Kercher, M. A., Wieland, T., Chen, C. K., Simon, M. I., & Sigler, P. B. (2008). Molecular architecture of Galphao and the structural basis for RGS16-mediated deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17), 6243-6248. doi:10.1073/pnas.0801569105
- Soundararajan, M., Willard, F. S., Kimple, A. J., Turnbull, A. P., Ball, L. J., Schoch, G. A., . . . Siderovski, D. P. (2008). Structural diversity in the RGS domain and its interaction with heterotrimeric G protein alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17), 6457-6462. doi:10.1073/pnas.0801508105
- Sprang, S. R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*, 66, 639-678. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.639
- Sprang, S. R., Chen, Z., & Du, X. (2007). Structural Basis of Effector Regulation and Signal Termination in Heterotrimeric Gα Proteins. In *Mechanisms and Pathways of Heterotrimeric G Protein Signaling* (pp. 1-65).
- Strittmatter, S. M., Fishman, M. C., & Zhu, X. P. (1994). Activated mutants of the alpha subunit of G(o) promote an increased number of neurites per cell. *The Journal of Neuroscience*, 14(4), 2327-2338. doi:10.1523/jneurosci.14-04-02327.1994
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol*, 428(19), 3850-3868. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.002
- Valenzuela, D., Han, X., Mende, U., Fankhauser, C., Mashimo, H., Huang, P., . . . Fishman, M. C. (1997). Gao Is Necessary for Muscarinic Regulation of Ca²⁺ Channels in Mouse Heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1727-1732. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/41527>

- Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494(7436), 185-194. doi:10.1038/nature11896
- Wang, J., & Miao, Y. (2019). Recent advances in computational studies of GPCR-G protein interactions. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 116, 397-419. doi:10.1016/bs.apcsb.2018.11.011
- Weinstein, L. S., & Shenker, A. (1993). G protein mutations in human disease. *Clin Biochem*, 26(5), 333-338. doi:10.1016/0009-9120(93)90109-j
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 85(4), 1159-1204. doi:10.1152/physrev.00003.2005
- Xie, R., Li, L., Goshima, Y., & Strittmatter, S. M. (1995). An activated mutant of the alpha subunit of G(o) increases neurite outgrowth via protein kinase C. *Brain Res Dev Brain Res*, 87(1), 77-86. doi:10.1016/0165-3806(95)00061-h