



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**G_o PROTEİNİ ALFA ALT BİRİMİNİN ETKİLEŞTİĞİ
OLASI EFEKTÖR PROTEİNLERİN BİYOİNFORMATİK
ARAÇLARLA BELİRLENMESİ**

SİBEL DENİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYO FİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Cevdet NACAR

2.DANIŞMAN
Prof. Dr. Uğur SEZERMAN

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyofizik
Tez Sahibi : Sibel Deniz
Tez Başlığı : Go Proteini Alfa Alt Biriminin Etkileştiği Olası Efektör Proteinlerin Biyoinformatik Araçlarla Belirlenmesi
Sınav Yeri : Biyofizik Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 25.06.2013

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Yrd. Doç. Dr. Cevdet NACAR	Marmara Üniversitesi Tıp Fak.	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Uğur SEZERMAN	Sabancı Üniversitesi, Doğa Bilimleri ve Mühendislik Fakültesi	
Doç. Dr. Ayşe GARİP	Marmara Üniversitesi, Tıp Fak.	
Yard. Doç. Dr. Cevdet NACAR	Marmara Üniversitesi, Tıp Fak.	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 15.07.2013 tarih ve 38. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

V. Prof. Dr. İnci ALICAN


BEYAN

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

25/06/2013

Sibel DENİZ

I.ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

En zor zamanlarımda desteğini eksik etmeyen, sadece tezimde değil yüksek lisansım boyunca bilim alanında ve kendi alanında öğrendiğim her şeyi kendisine borçlu olduğum, sorduğum her soruda ufkumu daha da ilerilere taşıyan, kendisinin öğrencisi olduğum için her zaman sonsuz mutluluk duyduğum, değerli ve bilgisi engin olan hocam **Yar. Doç. Dr. Cevdet NACAR**'a;

Yanına her gittiğimde cesaret veren gülümsemesiyle karşılaştığım, biyoinformatik alanına olan ilgimi her konuşmasında katlandıran ve anlamlandıran, tanıştığım için her zaman kendimi şanslı hissedeceğim ikinci tez danışmanım **Prof. Dr. Uğur SEZERMAN**'a;

Tezimin başlangıcında değil bu bölüme başladığım ilk günden itibaren beni cesaretlendiren, zorlandığım her anda desteğiyle yanımda olan, iyi hissettiren ve gülümsettiren sevgili hocam **Arş. Gör. Banu AYDIN**'a;

Güler yüzleriyle yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen, değerli hocalarım **Doç. Dr. Ayşe GARİP İNHAN**'a, **Doç. Dr. Hulya CABADAK**'a , **Doç. Dr. Oya ORUN**'a, **Yard. Doç. Dr. Pınar Mega TİBER**'e; aynı sıkıntıları, sevinçleri paylaştığım sevgili arkadaşlarım **Esra CÜCE**'ye ve **Hakan Albayrak**'a, desteğini ve sevgisini eksik etmeyen **Selma BOZKURT**'a;

Suratsızlığıma, karamsarlığıma rağmen her zaman bana katlanıp destek olan sevgili arkadaşlarım **Perinur BOZAYKUT**'a ve **Tarık TANYELİ**'ye;

Bu günlere gelmemi sağlayan, her konuda beni destekleyen canım **Aileme**;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasında Marmara Üniversitesi GEMHAM biriminin bilgisayar olanaklarında kullanılmıştır.

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR.....	III
II. İÇİNDEKİLER.....	IV
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. G Proteinleri.....	6
4.1.1. Efektörler ile Etkileşim	7
4.1.2. Alfa Alt Birimi	8
4.1.3. Gi/o Ailesi	10
5. YÖNTEM	13
5.1 Çoklu Hizalama (Multiple Alignment).....	13
5.2 Benzeşim Modellemesi	14
5.3 Moleküler Dinamik Simülasyon.....	14
5.4 Docking Simülasyonu	15
6. BULGULAR.....	16
6.1 Çoklu Hizalama (Multiple Alignment).....	16
6.2 Benzeşim Modellemesi	21
6.3 Moleküler Dinamik Simülasyonu.....	22
6.4 Docking Simülasyonu	24
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
8.KAYNAKLAR	31
9. ÖZGEÇMİŞ	34

1.ÖZET

Bu çalışmada, hücre sinyal ileti sisteminin en önemli bileşenlerinden biri olan, insandaki sinyal ileti proteinlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan G proteinlerin efektörleri ile olan etkileşimleri üzerine çalışılmıştır.

Birçok biyolojik işlevde görev alan G protenleri birçok hastalığın doğrudan nedeni veya etkenlerinden biridir. Go proteini büyük oranda merkezi sinir sisteminde bulunmakta ve işlevi henüz bilinmemektedir. Ancak Go'nun beyin dokusunda yoğun olarak bulunması, birçok fizyolojik ve patolojik nörolojik süreçte görevi olabileceğini düşündürmektedir. Go'nun etkileştiği bazı efektörler bildirilmiş olmasına karşın bulgular yetersiz ve eksiktir. Yapılan bu çalışma ile Go'nun etkileştiği düşünülen bu efektörler ile etkileşime geçip geçemeyeceğinin teorik olarak incelemesi yapılmış ve daha sonra da bunlar dışında etkileşime geçebileceği diğer efektörler araştırılmıştır.

Çalışma kapsamında öncelikle Go ve efektör proteinlerin amino asit dizilerinden hareketle olası efektörler belirlenmiştir. Sonraki aşamada Go proteininin ve efektör proteinlerin üçüncül yapılarından hareketle etkileşimin topografik olarak olası olup olmadığı docking algoritmaları ile test edilmiştir. Ardından moleküler dinamik ve kinetik simülasyonlar kullanılarak etkileşimin karakteristiği belirlenmiştir. Böylece, belirlenen olası efektör proteinlerin Go'nun işlevi hakkında önemli bilgiler sunması, G proteini ve efektör etkileşiminin daha net olarak anlaşılmasına katkıda bulunması amaçlanmış ve çalışma bu yönde gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: AUTODOCK, docking, G proteini, moleküler dinamik simülasyon, protein-protein etkileşimi.

2. SUMMARY

Determination of Possible Effectors of Go Protein Alpha Sub-Type by Bioinformatic Tools

In this study, the interactions of one of the most important components of the cell signal transduction system, the G proteins' - that constitute one third of the human signal transduction proteins- with its effectors is studied.

G proteins that are involved in many biological functions are the directly reason of many illnesses or one of the factors of illnesses. Go proteins are mostly in nervous system and their functions are not known yet. However Go is being in brain tissue densely, it is thought that it has many functions in physiological and pathological neurological process. Although some of the effectors that has interacted with Go are reported, findings are inadequate and incomplete. With this study it is theoretically researched if Go's possible effectors can be interacted with Go or not. And then It is researched that if there are any other effectors that can be interacted with.

In the study firstly potential effectors are determined from the Go and effector proteins amino acid sequences. In the next stage it is tested if the interactions are topographically potential or not with the help of tertiary structures of Go proteins and effector proteins. Then, characteristic of the interaction is determined by using the kinetic simulations and molecular dynamics. Thus, determined possible effector proteins offer important information about the function of Go proteins and increase understanding of G protein and effector interactions. And the study conducted in this direction.

Key words: AUTODOCK, docking, G protein, protein-protein interaction, molecular dynamic simulation.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Sinyal iletimi dünya üzerinde bulunan tüm canlıların yaşamsal faaliyetlerini yerine getirebilmesi için ihtiyaç duydukları bir haberleşme ve reaksiyon mekanizmasıdır. Tek hücreli canlılarda çevresel uyarıları alma ve çevresel uyarı oluşturma için gerçekleşen sinyal iletimi süreci çok hücreli canlılarda daha karmaşık olup hala tam anlaşılamayan, araştırılmaya devam edilen bir konudur. Hücre dışı yada içi ufak bir uyarı ile başlayan, zincirleme etkileşimlerle giderek güçlenen, anlam kazanan sinyal iletimi, belli hücrelerin işlevlerinin ve ihtiyaçlarının anlaşılması açısından önemlidir.

Sinyal iletiminin temelinde gerçekleşen mekanizma bir hücrenin bir tür sinyal veya uyarıyı reseptörleri vasıtasıyla alması ve bunu bir başka sinyale dönüştürmesidir. İlk sinyali sağlayan birinci haberci olarak adlandırılacak sinyal moleküllerinin alınmasından sonra oluşturulan bir diğer sinyal ikinci haberci moleküllerinin aracılığıyla iletilir. Böylece ikinci bir sinyal yolu açılır ve zincirleme şekilde uyarı iletilir. Sinyal iletimi ilerledikçe iletme katılan molekül ve protein sayısı gittikçe artar ve bu da küçük bir sinyalin çok daha büyük bir tepki yaratabilmesini sağlar.

Bu zincirleme mekanizmanın ilk basamağı olan gelen sinyalin tanınması çoğunluğu hücre yüzeyinde bulunan sinyal taşıyıcı reseptörler tarafından sağlanır. Bu reseptörler büyüme faktörü, hormon ve neurotransmitterler gibi hücre dışı moleküllerin bağlandığı membran proteinleridir. Bu hücre dışı moleküllerin reseptörlere bağlanmasıyla tanınan sinyal hücre içine transfer edilir ve uyarana özgü bir yanıt oluşturulur.

Membrana bağlı sinyal iletim reseptörler ailelerinden biri olan G-proteinleriyle-kenetli reseptörler birçok sinyal yolağında görev almaktadırlar. Başta görme ve koklama uyarılarının algılanması, nöral etkinlik, hormonal düzenleme, hücre büyümesi, farklılaşması gibi bir çok metabolik mekanizmada aracılık eden G-proteinleriyle-kenetli reseptör ailesinin iki önemli özelliği vardır. Bunlardan birincisi

reseptörlerin membran üzerinde bulunan kısmı plazma membranını yedi kez geçmesidir. İkinci önemli özelliği ise hücre dışından alınan sinyal , G protein olarak adlandırılan ve homolog amino asit dizilerine sahip proteinlerden oluşan yaygın bir protein ailesinin iletiye katılmasıyla daha da kuvvetlenerek ve yeni yollar açılarak hücre içine iletilir.

Guanin nükleotidleri (GTP veya GDP) bağladıklarından dolayı G proteini olarak adlandırılan bu proteinler üç farklı alt birimden oluşan heterotrimetik bir yapıya sahiptirler. α , β ve γ olarak bilinen bu altbirimler sırasıyla 39-46 kDA, 37 kDa ve 8 kDA molekül ağırlığına sahiptirler (Hepler and Gilman 1992). GDP bağlı halde iken inaktif olan heterotrimetik G proteini GDP'nin GTP ile yer değiştirmesi ile aktiflenir ve α -altbirimi ve $\beta\gamma$ dimeri olarak ayrılarak farklı sinyal yollarını etkinleştirir.

G-proteinleriyle-kenetli reseptörlerin ve G proteinlerinin birçok sinyal yolağında görev alması nedeniyle bunların etkileştiği ligandların belirlenmesi ve etkileşimin yapısal olarak çözümlenmesi ilaç tasarımında ve sinyal ileti yollarının tam olarak belirlenmesinde oldukça önemlidir. Reseptörler ile ligandların yada G proteinler ile etkileşen efektörlerin arasındaki yapıya özgü etkileşimlerin açığa çıkarılmasında bu proteinlerin üçüncül yapısı ve bağlanma sonucu oluşan konformasyonel değişikliklerin belirlenmesi anahtar role sahiptir.

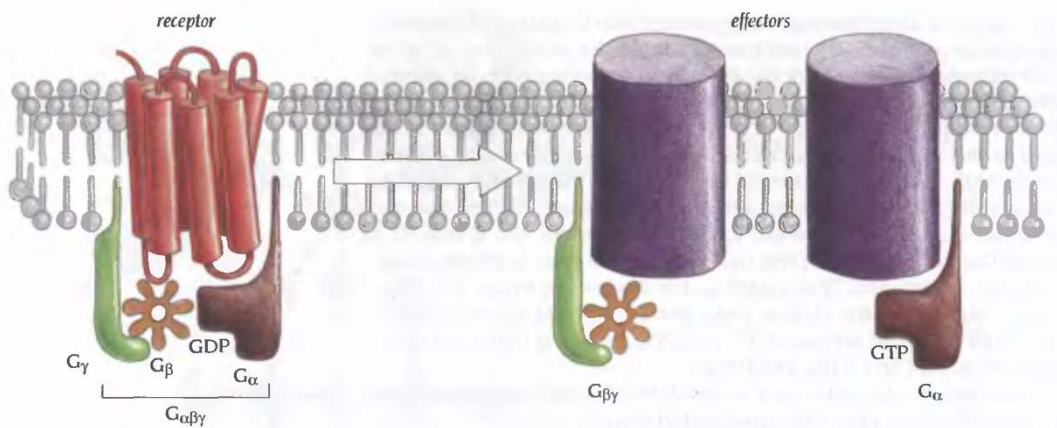
Proteinlerin üçüncül yapılarının üç boyutlu yapısı deneysel olarak X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleriyle belirlenmektedir. Ancak bu yöntemlerin uygulanması proteinlerin büyüklükleri ve birçok proteinin çözünür olmaması nedeniyle bu çalışmaları sınırlandırmaktadır. Bunun yanında bu çalışmaların gerçekleştirilmesi için yapılan deneyler yüksek bütçe ve yoğun iş gücü gerektirmektedir. Buna karşın teknolojinin bilgisayar donanımı ve yazılımı yönündeki gelişimiyle biyolojide yeni bir alan oluşmuştur. Bilgisayar destekli araçların geliştirilmesi uzun süreli hesaplamaların yapılmasında, simülasyon çalışmalarında, veri analizinde, gen dizisi analizinde ve buna benzer biyolojik alanlarda hızlı ve etkin çözümler üretilmesinde büyük destek olmuştur. Biyoinformatik olarak adlandırılan bu yeni alan moleküler etkileşimler konusunda da zaman ve maliyet koruyucu bir araçtır. Deneye başvurulmadan önce biyoinformatik

araçlar kullanılarak oluşabilecek etkileşimler araştırılıp daha fazla olasılığı olan yapılar belirlenebilmekte diğerleri elenebilmektedir. Bu şekilde deneysel araştırmalar için yol gösterici özellikte teorik olarak bir ön çalışma sağlanmış olur. Söz konusu çalışmada, deneysel araştırmalara belli bir öngörü sağlayabilmek için G Proteini α alt biriminin bir türü olan Go proteinin üçüncül yapısı baz alınarak olası efektörleri ile etkileşime girip giremeyeceğinin biyoinformatik araçlarla araştırılması amaçlanmıştır. Dizi benzerliği araştırılarak belirli efektörlerden başka yeni efektörlerin ve yolakların varlığı araştırılacaktır. Bu şekilde G proteinlerinin işlevleri, sinyal iletim mekanizması, ilaç tasarımı konularına veri sağlanması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. G Proteinleri

Hormon, neurotransmitter, glikoprotein gibi herhangi bir ligand membran yüzeyinde bulunan G-proteinleriyle-kenetli reseptörlerle etkileşime geçtiğinde bu etkileşim sonucu reseptörde stabilize edici yada indükleyici bir konformasyonel değişiklik oluşur. Bu konformasyonel değişiklik reseptöre kenetli olarak membranın iç yüzeyinde konumlanan ve α , β ve γ alt birimlerinden oluşan G proteinlerinin aktiflenmesine yol açar. (Hamm 1998) Heterotrimerik inaktif formda GDP $G\alpha$ alt birimine bağlı olarak bulunur. Aktivasyonla birlikte GDP'nin salınımı ve yerine GTP'nin $G\alpha$ 'ya bağlanmasıyla $G\alpha$ altbirimi $\beta\gamma$ dimerinden ve G-proteinleriyle-kenetli reseptörden ayrılır. $G\alpha$ -GTP de $G\beta\gamma$ dimeri de ayrı yollaklarda sinyal iletimini sağlamak üzere serbest kalırlar (Şekil1). $G\alpha$ -GTP'nin sinyali ne kadar devam ettireceği kendisinde bulunan GTPaz aktivitesine bağlıdır. Buna göre $G\alpha$ bu GTPaz etkinliği ile kendisine bağlı bulunan GTP'yi hidrolizleyerek GDP'ye dönüşmesine ve $G\beta\gamma$ dimeriyle tekrar birleşerek yeniden heterotrimetik yapıya geçmesine ve dolayısıyla inaktif forma geçmesine yol açar. Bu çevrimsel süreç ligand varlığında devam eder.



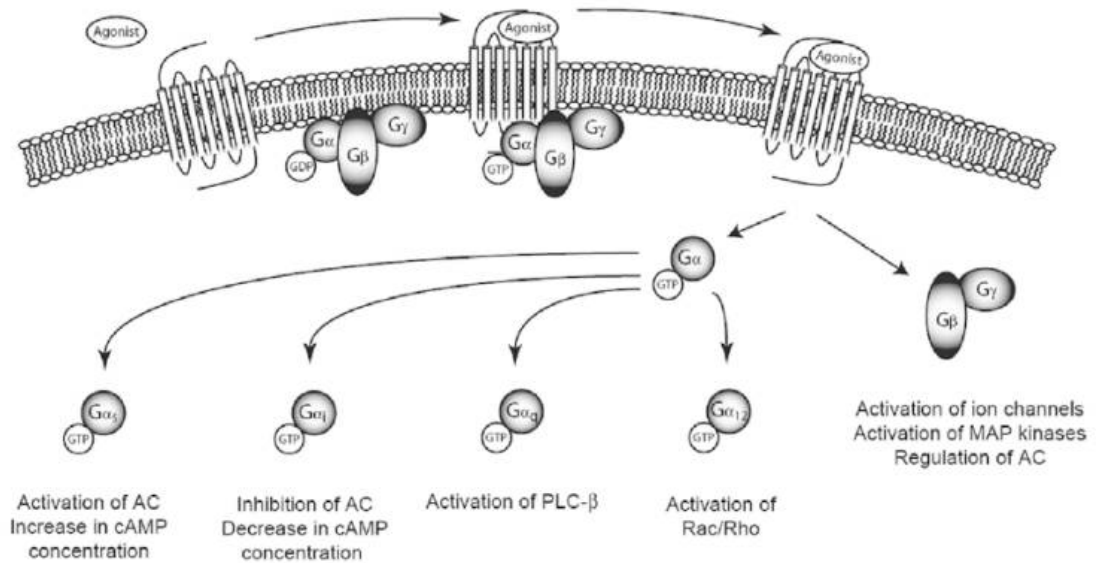
Şekil 1: Heterotrimer G Proteinlerin GDP bağlı iken G Protein-kenetli reseptörle bağlanmış hali ve GDP'nin GTP'ye dönüşmesiyle ayrılan $G\alpha$ -GTP de $G\beta\gamma$ 'nın farklı efektörler ile etkileşime girmesi (Branden and Tooze 1999)

Yapılan çalışmalara göre $G\alpha$ altbirimini kodlayan 16 gen bölgesi, $G\beta$ alt birimini kodlayan 5 gen bölgesi ve $G\gamma$ alt birimini kodlayan 12 gen bölgesi saptanmıştır (Downes and Gautam 1999).

4.1.1. Etkötörler ile Etkileşim

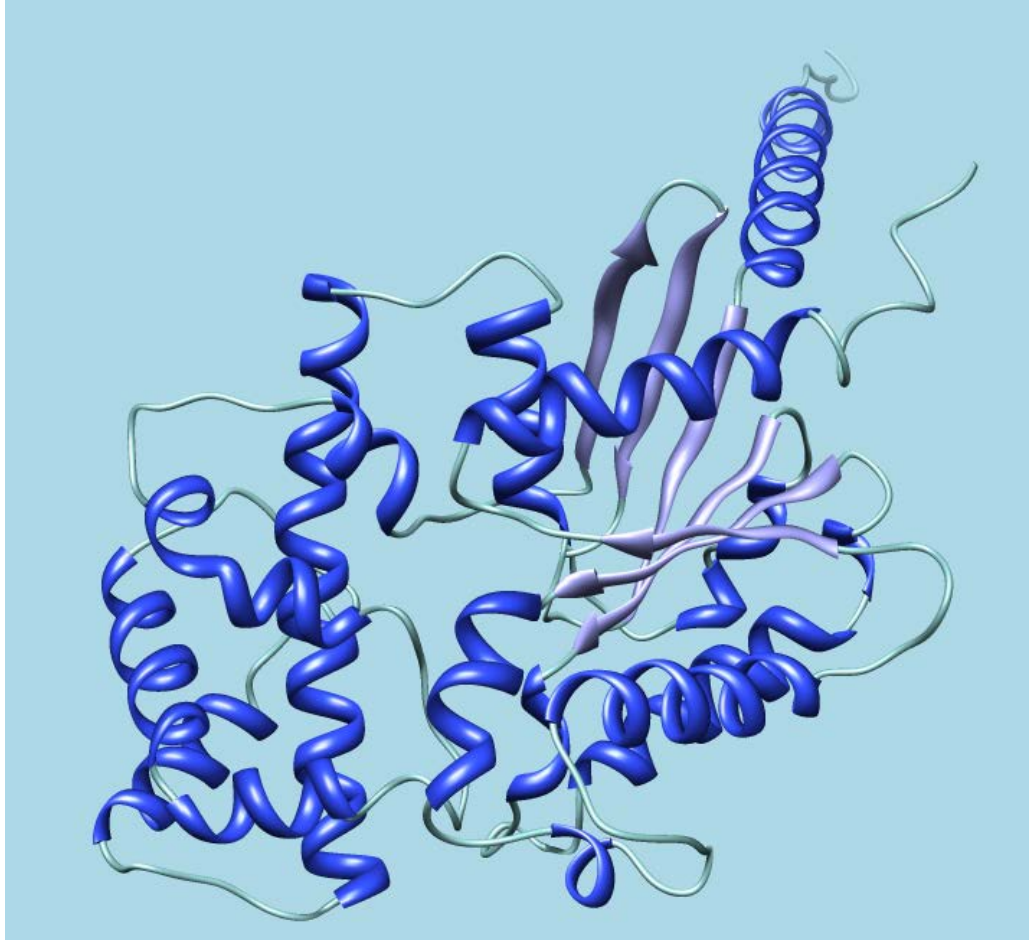
GTP bağlanmasıyla $G\beta\gamma$ ve $G\alpha$ -GTP altbirimleri birbirinden ayrılır. $G\alpha$ 'nın bu aktif konformasyona geçmesiyle yeni formda, etkötörler ile etkileşime geçebileceği yeni bir yüzey oluşur. Bu yeni konformasyon sayesinde etkötörler ile etkileşimde GDP-bağlı halden 20-100 kat daha yüksek oranda bağlanma gerçekleşir (Skiba, Bae ve Hamm 1996).

Yapılan çalışmalarda adenilat siklaz (AC) fosfolipaz C (PLC) gibi pek çok etkötörün $G\alpha$ ile etkileşimi hem yapısal hem de deneysel olarak incelenmiştir (Knall and Johnson 1998, Taussig and Zimmermann 1998)(Şekil 2). Kimi $G\alpha$ ailelerinin tek bir etkötörle etkileşimi görülürken kimi ailelerin bir çok etkötörle ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. Kimi etkötörlerin de farklı ailelerden proteinlerle etkileştiği ancak farklı mekanizmaları etkilediği gözlenmiştir. Örneğin $G\alpha_s$ adenilat siklazı aktive ederken, $G\alpha_i$ adenilat siklazı inaktive etmektedir.



Şekil 2 : G Proteinlerinin aktivasyonun genel sinyal iletim mekanizması (Madamanchi 2007)

4.1.2. Alfa Alt Birimi



Şekil 3: G Protein α altbiriminin genel görüntüsü

Bu güne kadar 17 memeli G proteini tanımlanmıştır. Klasik olarak G proteinleri $G\alpha$ altbirimlerinin dizisel benzerlik farklarına göre 4 ana aileye ayrılmaktadır: G_s , G_i/o , G_q , G_{12} . Her bir aile oldukça spesifik ifade motiflerinden meydana gelmektedirler (Tablo 1). Aynı aileye ait üyeler yapısal olarak oldukça benzerdir ve fonksiyonel olarak da çoğunlukla aynı fonksiyon özelliklerini paylaşmaktadırlar (Wettschureck and Offermanns 2005).

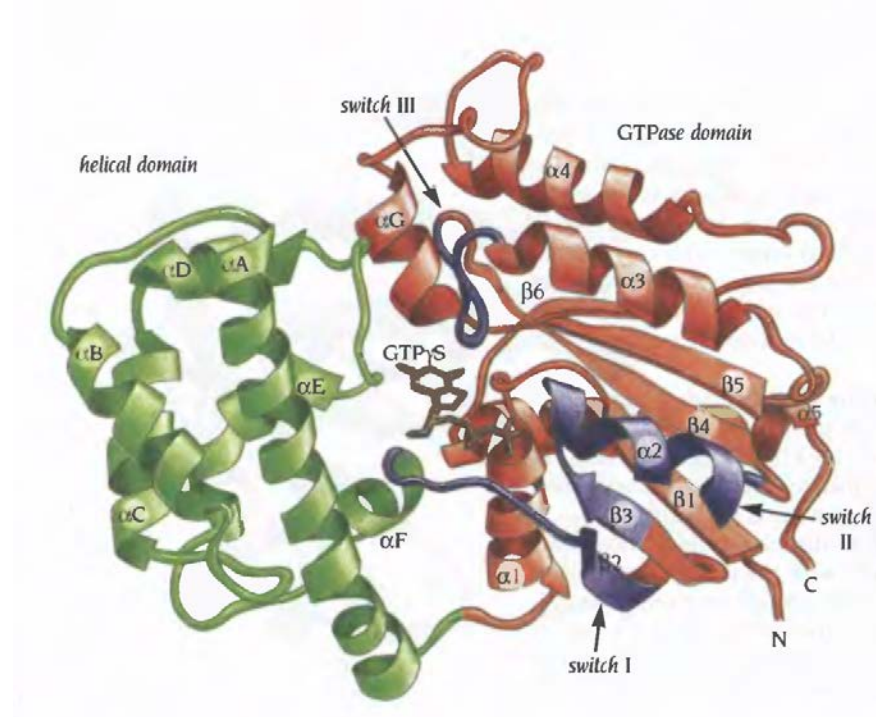
Tablo 1 : G proteinleri $G\alpha$ altbirimlerinin dizisel benzerliklerine göre ayrıldıkları protein aileleri (Wettschureck and Offermanns 2005).

İsim	Doku	Efektör
<u>α-Altbirimleri</u>		
$G\alpha_s$ ailesi		
$G\alpha_s$	Her yerde	AC (tüm tipleri) ↑
$G\alpha_{sXL}$	Nöroendokrin	AC ↑
$G\alpha_{olf}$	Koku epitelyumu, beyin	AC ↑
$G\alpha_{16}$ ailesi		
$G\alpha_{11}$	Oldukça yaygın	AC (tip I,III,V,VI,VIII,IV) ↓ (Direkt düzenlenme)
$G\alpha_{12}$	Her yerde	$G\beta\gamma$ aracılığı ile diğer bazı efektörler düzenlenir.
$G\alpha_{13}$	Oldukça yaygın	Uyarılmış $G\alpha_{11,3}$ 'den serbestlenir.
$G\alpha_o$	Nöronal, nöroendokrin	VDCC ↓, GIRK ↑ ($\beta\gamma$ aracılığı ile)
$G\alpha_z$	Nöronal, trombositler	AC (e.g., V,VI) ↓ (direkt düzenlenir); Rap1GAP
$G\alpha_{gust}$	Tat hücreleri, saç hücreleri	PDE ↑ ? ; ($G\beta\gamma$ aracılığı ile diğer efektörler ?)
$G\alpha_{1-r}$	Retinal çubuklar, tat hücreleri	PDE 6 (γ altbirim çubuk) ↑
$G\alpha_{1-c}$	Retinal koniler	PDE 6 (γ altbirim çubuk) ↑
$G\alpha_{q/11}$ ailesi		
$G\alpha_q$	Her yerde	PLC- β 1-4 ↑
$G\alpha_{11}$	Hemen hemen her yerde	PLC- β 1-4 ↑
$G\alpha_{14}$	Böbrek, karaciğer,	PLC- β 1-4 ↑
$G\alpha_{15/16}$	Hematopoietik hücreler	PLC- β 1-4 ↑
$G\alpha_{12/13}$ ailesi		
$G\alpha_{12}$	Her yerde	PDZ-RhoGEF/LARG, Btk, Gap1m, cadherin
$G\alpha_{13}$	Her yerde	p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF/LARG, radixin

$G\alpha$ altbirimi iki ana domenden oluşmaktadır: GTP'nin bağlandığı ve hidrolizlendiği bir GTPaz domeni ve GTP'nin proteinin merkez bölümüne gömüldüğü bir heliks domen. Heliks domen tüm $G\alpha$ aileleri arasında en farklı özellikteki domendir ve bu da bu domenin reseptör-G protein ve efektör-G protein etkileşimlerindeki özgünlüğü doğrudan yönlendirebileceği düşünülmektedir. (Cabrera-Vera et al 2003)

G proteinlerinin aktif ve inaktif formları üzerinde karşılaştırmalı olarak yapılan kristal yapı çalışmaları göstermiştir ki GTP'nin bağlı olduğu aktif konformasyonda daha sabit ve daha kararlı forma geçen üç esnek switch bölgesi bulunmaktadır (Noel et al 1993, Lambright et al 1994)(Şekil 4). $G\alpha$ altbiriminin amino (N-) ve karboksil (C-) sonlarıyla ilgili yapısal olarak çok fazla bilgi bulunmaktadır. Bunun nedeni bu

uçların kristal yapıda çıkarılmış olmalarıdır (Noel et al 1993, Lambright et al 1994, Sondek et al 1994, Coleman et al 1994).



Şekil 4 :GTP bağlı α 'nın genel görünümü ve switch bölgeleri. (Branden and Tooze 1999)

4.1.3. Gi/o Ailesi

Go ailesi merkezi sinir sisteminde en bol bulunan G proteindir. Memeli beyni membran proteinlerinin %1 ini oluşturur. Boğmaca ve kolera toksini etkilerini Gi/o ailesi üzerinden gösterir Go proteini de bu ailenin bir üyesidir.

Adenilat siklaz inhibitörü G proteinleri yani Gi ailesi ilk defa Gilman ve Birnbaumer'in grupları tarafından saflaştırılmış ve tanımlanmıştır (Codina et al 1983, Bokoch, Katada, Northup, Hewlett and Gilman 1983). Go proteiniyle de sığır beyninden Gi proteinin saflaştırılması çalışmaları sırasında karşılaşılmıştır (Neer, Lok and Wolf 1984, Sternweis and Robishaw 1984, Milligan and Klee 1985). Bunun devamında Go proteinini kodlayan ilk cDNA 1986 yılında fare beyninden

klonlanmıştır (Itoh et al 1986). Devamında yapılan çalışmalar Go proteininin beyinde en bol miktardaki G proteini olduğunu göstermiş ve fizyolojik rolünün belirlenmesi önem kazanmıştır (Jiang and Bajpayee 2009).

Go proteini amino asit dizisi bir çok türde korunmuştur. Örneğin meyve sinekleri ve *Caenorhabditis elegans* Go proteini ile insan Go proteini %80 benzerlik göstermektedir (Tablo2). Diziler arası bu denli yüksek benzerlik görülmesi türler arası korunan Go'nun rol oynadığı sinyal ileti yollarının hücre dışı sinyallerin alınması, iletilmesi açısından büyük öneme sahip olduğunu düşündürmektedir.

Tablo 2 : Go proteininin türler arası temsilcilerinin protein dizi hizalaması. Verilen yüzdeler benzerlik/homology değerleridir. (Jiang and Bajpayee 2009)

Go1 Homo sapien	MGCTLSAEERAALERSKAIEKNLKEDGISAAKDVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGFSGEDVKQYKPVVYSNTIQSLAAIVRAMDTLG	92
Go1 M musculus	-----	92
Go1 Rattus norv	-----	92
Go Bos taurus	-----	92
Go Xenopus trop	-----Q-----	92
Go Danio rerio	-----D-----T-----D-----	92
Go 47A Drosophila	---AQ---AA---RL---R---Q---I---S---TA---F---R---V---L---P---S	92
Go C. elegans	---M-Q---RM---MQ---I---S---TA---Y---V---V---L---SN---	92
Go Bombyx mori	---AQ---AA---L-D---N---Q-S---I---S---TN---F---R---V---L---PN---	92
Go1 Homo sapien	IEYGDKERKADAKMVCDDVSRMEDTEPFSAELLSAMRLWGDGSGIQECFNRSREYQLNDSAKYYLDSLDRIGAADYQPTQDILRTRVKTG	184
Go1 M musculus	V-----T-S-----G-----	184
Go1 Rattus norv	V-----S-----	184
Go Bos taurus	-----R-----P-----A-----	184
Go Xenopus trop	-----R-----P-----A-----	184
Go Danio rerio	L-----Y-P-----I---S---S-A-----Q-----	184
Go 47A Drosophila	-Q-SNN--ES---F--CQ--H---E---A--K--Q-A-V---S--N---F--D---L--K-----	184
Go C. elegans	VSF-SAD-EV---L-M---A---E---S-K---A-V-D--S--N---F--D-E-L-E-I-----	184
Go Bombyx mori	-I--NRD-ES-G--F--IQ-----E--A--K--A--V---G--N---F--D--L--K-----	184
Go1 Homo sapien	IVETHFTFKNLHFLRFDVGGQRSEKKNWICFEDVTAIIFCVALSGYDQVLHEDETNRMHESLMFDSICNNKFFIDTISIILFLNKKDLFG	276
Go1 M musculus	-----	276
Go1 Rattus norv	-----	276
Go Bos taurus	-----I-----	276
Go Xenopus trop	-----A-----	276
Go Danio rerio	-----A-----	276
Go 47A Drosophila	--V--S---N-K-----M-E-----Q--K-----W-T-----E	276
Go C. elegans	--V--S---N-K-----M-E-----K-----W-T-----E	276
Go Bombyx mori	--V--S---N-K-----M-E-----Q--K-----W-T-----E	276
Go1 Homo sapien	EKIKKSPLTICFPEYTGPNTEYEDAAAYIAQAFESKNRSPNKEIYCHMTCATDTNNIQVVFDAVTDIIANNLRGCGLY	354
Go1 M musculus	-----P-S-----T-----	354
Go1 Rattus norv	-----P-S-----T-----	354
Go Bos taurus	-----S-----	354
Go Xenopus trop	-----S-----D-----G-----	354
Go Danio rerio	-----S-----D-----G-----	354
Go 47A Drosophila	---R---S---GQE-GE-----A--K-TS-----F---V-----	354
Go C. elegans	-----S-RQD-HE-S-----A--K-A-----T---F---V-----	354
Go Bombyx mori	---RR-----AQE-GE-----A--K-TT-----V-----	354
		98% / 98%
		98% / 99%
		99% / 99%
		98% / 98%
		95% / 98%
		83% / 90%
		82% / 90%
		81% / 89%

Gi/o ailesi 2 Go proteini, 3 Gi proteini, Gz proteini , 2 transdusin(rod ve cone) ve gustducin üyelerinden oluşmaktadır. Gi/o ailesinin özellikle Gi ve Go üyeleri başta olmak üzere üyelerinin oldukça yüksek oranda homolog oldukları görülmüştür(Tablo3). Gi ile Go proteinlerinin birincil yapılarının homolog oluşu, in

vitro fonksiyonlarının benzer oluşu ve sadece hücresel dağılımda farklılık göstermesi bu proteinlerin aynı sinyal yollarında aynı reseptör ve efektörlerle etkileşime geçiyor olabileceklerini düşündürmüştür. Ancak fareler üzerinde yapılan ve Gi/o ailesi α altbirimi genlerinin her biri için yapılan knockout çalışması bu proteinlerin her birinin ayrı biyolojik fonksiyonlarda görevli olduğunu göstermiştir (Jiang, Spicher, Boulay, Wang and Birnbaumer 2001).

Tablo 3 : Gi/o protein ailesinin dizi hizalama analizi ve alt aileler arasında değişmeyen motif bölgeleri. En alt satırda verilen yüzdeler benzerlik/homology değerleridir. (Jiang and Bajpayee 2009)

<i>Go1</i>	MGCTLSAEERAALERSKAIEKNLKEDGISAADVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHEDGFSGEDVKQYKPVVYSNTIQSLAAIVRAMDTLG	92
<i>Go2</i>	-----	92
<i>Gi1</i>	-----DK--V---M-DR--R---EK--RE-----A-Y-E-EC---A-----II--I---GR-K	92
<i>Gi2</i>	-----V---DK--A---M-D--R---EK--RE-----Y-E-ECR--RA-----IM---K--GN-Q	92
<i>Gi3</i>	-----DK--V---M-DR--R---EK--E-----Y-EDEC--V-----II--I---GR-K	92
<i>GZ</i>	---RQ-S--KE-AR--RR-DRH-RSESQRQRREI-----TSN-----SG--NL-AC-E---LIYY-A-D--TR-I--LAA-R	92
<i>Gt</i>	--SGA---DKELAK---EL--K-Q--ADKE--T-----Q--Y-P-ECLEF-AII-G-VL--IL--I---T---	92
<i>Ggust</i>	--SGI-S-SKESAK---EL--K-Q--AERD-RT-----KN-Y-EQECMEF-A-I---L--IL---K--T---	92
<i>Go1</i>	IEYGDKERKADAKMVCVDSRMEDETFPSAELLSAMMLWGDSGIQECFNRSREYQLNDSAKYYLDSDLRIGAADYQPTQDILRTRVKTG	184
<i>Go2</i>	-----	184
<i>Gi1</i>	-DF--SA-AD--RQLFVLGAA-EGFMTAELAGVI K--K--V-A-----A--ND--AQPN-I--Q--V-----	183
<i>Gi2</i>	-DFA-PS-AD--RQLFALSCTA-EQGVLPDD-SGVIR--A-H-V-A--G-----A--ND-E-AQS--I--Q--V-----	184
<i>Gi3</i>	-DF-EAA-AD--RQLFVLGSA-E GVMTP--AGVIK--R-G-V-A--S-----S--ND--SQSN-I--Q--V-----	183
<i>GZ</i>	-DFHNP-AY--VQLFALTGPA-SKGEITP--GV-R--A-P-A-A--S--S--H-EDN-A--ND-E-A--I--VE---S-DM---	184
<i>Gt</i>	-D-AEPSCAD-GRQLNNLADSI-EGTMP P--VEVIR--K-G-V-A--E-AA-----S--NQ-E--TDPE-L-S---V-S-----	183
<i>Ggust</i>	-D-VNPRSAE-QRQLYAMANTL--GGMT PQ-AEVIK--R-P--A--E-AS-----A--ND--T-SG-V-N--V-HS-----	183
<i>Go1</i>	IVETHFTFKNLHFRLEFDVGGQRSEKRWIHCFFDVTAII FCVALSGYDQVLHEDETTNRMHESLMLFDSICNNKFFIDTSIILFLNKDLFG	276
<i>Go2</i>	-----	276
<i>Gi1</i>	-----D--KM-----G-----D-LV-A--EM-----MK-----W-T-----E	275
<i>Gi2</i>	-----D--KM-----G-----A-LV-A--EM-----MK-----W-T-----E	276
<i>Gi3</i>	-----D-Y-KM-----G-----D-LV-A--EM-----MK-----W-TE-----E	275
<i>GZ</i>	---NK---E-T-KMV-----G-----E---L-Y-NQ-S-A--R-----NW-N-L-----LA	276
<i>Gt</i>	-I--K-SV-D-N-M-----G-C--A--A-MV-V--DEV-----H--N--H--AA--V-----E	275
<i>Ggust</i>	-I--Q-S--D--M-----G-C--A--A-MV-V--EV-----H--N--H-Y-ST--V-----I-Q	275
<i>Go1</i>	EKIKKSPLTICFPEYTGPNYEDAAAYIQAFESKNRSPN KEIYCHMTCATDTNNIQVVFDAVTDIIIANLNRGCGLY	354
<i>Go2</i>	-----SAFTE-V-----Y---K-AH--S-V-----F-----V---K-----	354
<i>Gi1</i>	-----Y--A-S--E-----C---DL-KRKDT--T-F-----K-V-F-----V--K--KD--F	354
<i>Gi2</i>	---TH-----A-K-DE--S--SK--DL-KRKDT--T-F-----K-V-F-----V--K--KD--F	355
<i>Gi3</i>	---R-----Y-----S--E-----C---DL-RKDT--T-F-----K-V-F-----V--K--KE---	354
<i>GZ</i>	---RRI-----K-Q---E--V--R--DL--NKET--S-F-----S--F-----V--Q--KYI--C	355
<i>Gt</i>	---VH-S-----D-N-S-D--GN--KS--LDL-MRKDV--S-----Q-VKF-----KE--KD--F	354
<i>Ggust</i>	--VT-VH-S-----T---F--GN--KN--LDL-LKKED--S-----Q-VKF-----KE--KD--F	354
		94% / 97%
		72% / 83%
		69% / 81%
		70% / 83%
		59% / 72%
		60% / 76%
		61% / 77%

$G\alpha_o$ ailesinin canlılardaki sinyal yollarında düzenlediği birkaç hücre içi efektör belirlenmiştir. Bunlar; kalsiyum kanalları, grin 1-2, adenilat siklaz, src tirozin kinaz ve tubulin.

5. YÖNTEM

Bu tez çalışmasında protein-efektör etkileşimini belirlemek amacıyla moleküler dinamik simülasyonu (NAMD) (Phillips et al 2005), çoklu hizalama (CLUSTAL-X2) (Larkin et al 2007) ve docking simülasyon (AUTODOCK) (Morris et al 2009) yöntemleri kullanılmıştır. Bunun yanı sıra internet üzerinden hizmet sunan sunucular üzerinden dizisel ve yapısal benzerliklere ilişkin arama yapılmıştır.

<http://biophysics.biol.uoa.gr/gpDB/> (Elefsinioti et al 2004 , Theodoropoulou et al 2008) adresinde Go proteininin olası efektörleri elde edilmiştir. Bu efektör proteinlere dizisel benzerlik gösteren proteinler <http://workbench.sdsc.edu/> (Subramaniam 1998) adresinden BLAST algoritmasıyla belirlenmiştir. Bu efektör proteinler ve benzer efektör proteinler beraber ve ayrı olarak CLUSTAL-X2 (Larkin et al 2007) yazılımı kullanılarak çoklu hizalanmıştır. Böylece, efektör-protein etkileşiminde görev alması olası ortak bir motif belirlenmeye çalışılmıştır. Olası efektör proteinlerle Go-alfa proteinin etkileşimi AUTODOCK (Morris et al 2009) yazılımına belirlenmeye çalışılmıştır.

5.1 Çoklu Hizalama (Multiple Alignment)

Ortak motifleri belirlemek için bilinen ve olası efektör proteinlerin amino asit dizileri <http://biophysics.biol.uoa.gr/gpDB/> internet sitesinde elde edildi. Elde edilen diziler *homo sapiens* içindi. Diziler homolojilerine göre

- Adenylate cyclase
- G-protein-regulated inducer of neurite outgrowth (GRIN)
- Src tyrosine kinase
- Tubulin
- Voltage dependent N, P/Q, R type calcium channel

adı altında 5 gruba ayrılmıştı. Her grup kendi içinde CLUSTAL-X2 (Larkin et al 2007) yazılımı kullanılarak hizalandı. Konsensüs dizilerler belirlendikten sonra BLAST yapılarak homolog diziler belirlendi. Elde edilen homolog diziler de daha sonra aynı gruba üye dizilerle birlikte hizalanarak ortak motifler belirlenmeye çalışıldı. Çoklu hizalama işlemi hem, bilinen ve olası efektör dizileri ayrı olarak hem de tümü beraber olarak gerçekleştirildi. Yazılımın 2.0.10 versiyonu kullanıldı. Çoklu hizalama parametre değerleri olarak şu değerler kullanıldı:

Gap Opening [0-100]	: 10
Gap Extension [0-100]	: 0.2
Delay Divergent Sequences (%)	: 30
Protein Weight Matrix	: BLOSUM
Clustering Algorithm	: UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sokal and Michener 1958, Murtagh 1984)

5.2 Benzeşim Modellemesi

Yapısı bilinmeyen efektör proteinlerin üçüncül yapıları MODELLER v.9.12 (Sali and Blundell 1993) yazılımı kullanılarak benzeşim modellemesi yöntemiyle belirlenmiştir. BLAST yazılımıyla elde edilen en uygun kalıp dizileri hedef dizileri ile hizalanarak yazılıma girdi olarak verilmiştir. Her efektör protein için 50 farklı model oluşturulmuştur. İçlerinden en düşük enerjili model moleküler dinamik simülasyonu için kullanılmıştır.

5.3 Moleküler Dinamik Simülasyon

Bu tez çalışmasında kullanılan Go-alfa proteinin üçüncül yapısı daha Biyofizik Anabilim Dalında yürütülen bir yüksek lisans tez çalışmasından elde edilmiştir

(Macit 2012). Proteini oluşturan atomların koordinatlarını daha kesin olarak elde etmek için protein sulu ortamda, NAMD (Phillips et al 2005) yazılımı kullanılarak moleküler dinamik simülasyona tutulmuştur. Moleküler dinamik simülasyonu, atom üzerinde etkili olan kuvvetlerin bileşkesi sonucu atomun her adımda belirli bir süre boyunca hareketini stimüle eder. Bu yer değiştirme nedeniyle atomların yeni koordinatları belirlendikten sonra simülasyon bir sonraki adıma geçer.

Moleküler dinamik simülasyonu sulu ortamda, 300 K'de 2 femtosaniyelik adım süresiyle 10.000.000 adımda, toplamda 20 nanosaniye için gerçekleştirilmiştir

5.4 Docking Simülasyonu

Efektör-protein etkileşimi AUTODOCK (Morris et al 2009) yazılımı kullanılarak Docking simülasyonu ile belirlenmeye çalışılmıştır. Olası efektör proteinleri oldukça büyük moleküller olduğundan simülasyona tüm protein değil, çoklu hizalama sonucunda elde edilen olası motif dizilerini içeren bölgeler dahil edilmiştir.

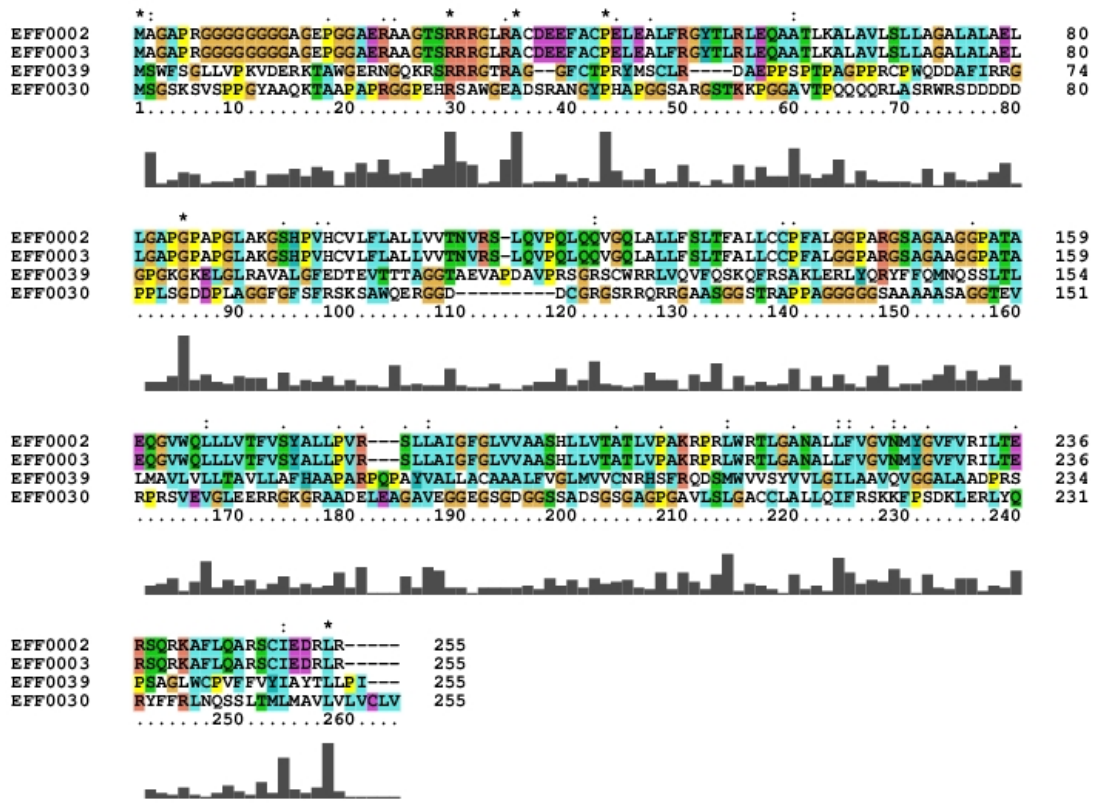
Docking simülasyonu önce moleküller üzerinde anahtar-kilit benzetmesindeki gibi topolojik olarak uygun bölgeler belirlendikten sonra etkileşimi atomlar seviyesinde belirlemeye çalışır.

Simülasyon öncesinde proteinlerdeki su molekülleri çıkarılmıştır. Üçüncül yapı dosyalarında genellikle hidrojen atomları bulunmadığından moleküllere hidrojen atomları eklenmiştir. Efektör ve Go-alfa proteini rigid moleküller olarak kabul edilmiştir. Search ve Docking parametreleri Genetic Algorithms ve Lamarckian olarak seçilmiştir. Her farklı efektör için 10 etkileşim araştırılmıştır.

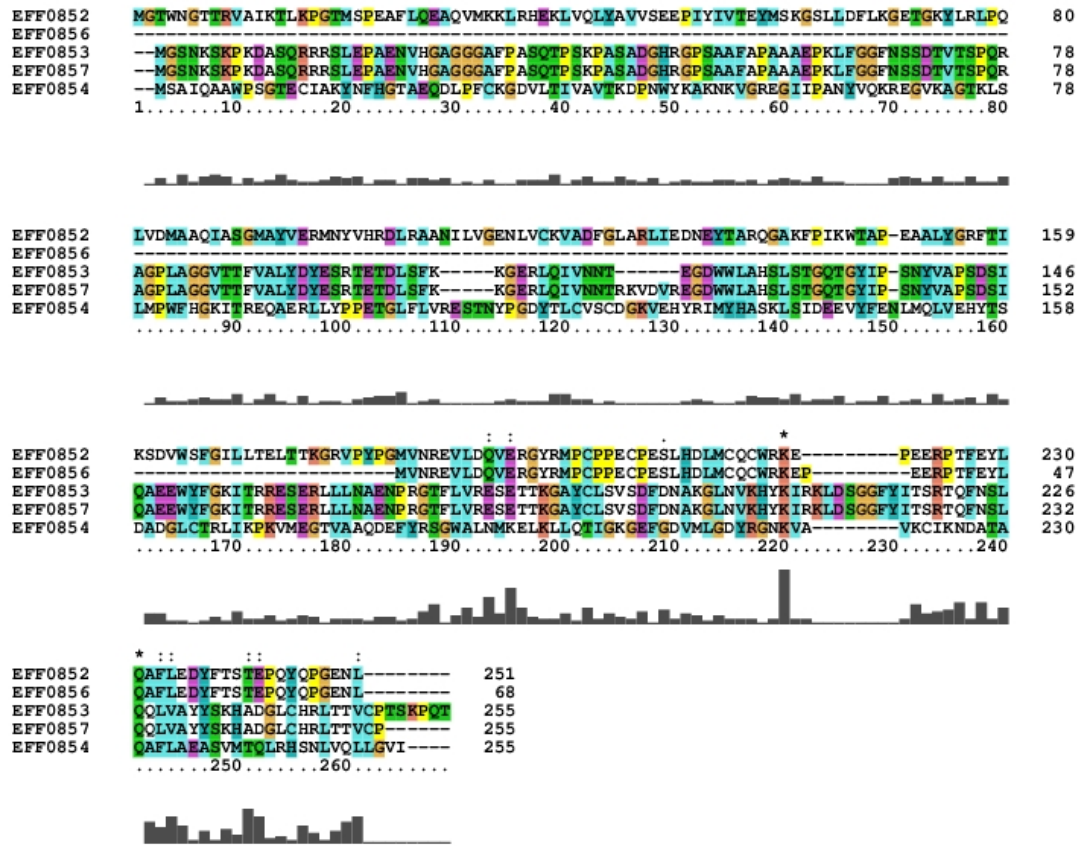
6. BULGULAR

6.1 Çoklu Hizalama (Multiple Alignment)

5 grup halinde ayrılan diziler çoklu hizalandı. Çoklu hizalama sonucu olası motif diziler (tüm dizilerde çok iyi korunmuş, ortak amino asitler) şekiller üzerinde “*”, “.” ve “:” simgeleriyle belirtilmişlerdir (Şekil 5-8).



Şekil 5. Efektör olan adenilat siklaz proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu.



Şekil 6. Efektör olan Src tirozin kinaz proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu.

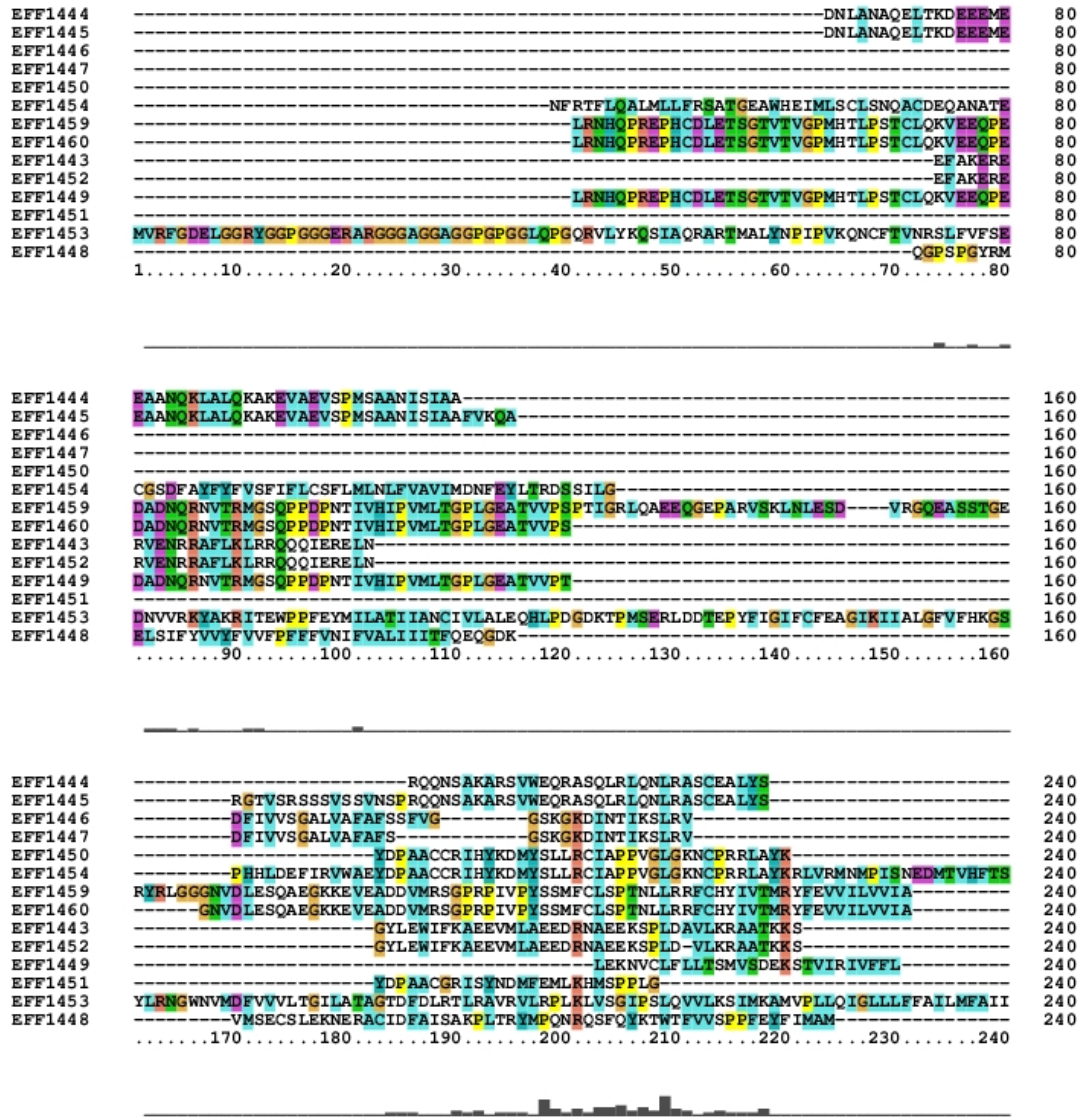
EFF1127 -MRECSIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPGSDK-----TIGGGDISENTFFSETGAGKHVPRAVFDLEP 80
 EFF1133 -MRECSIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPGSDK-----TIGGGDISENTFFSETGAGKHVPRAVFDLEP 80
 EFF1128 -MREIVHIOAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPSGNYVGDS-----DLQLEIRINVYNEAAGNKYVPRAILVDLEP 80
 EFF1132 -MREIVHIOAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPSGNYVGDS-----DLQLEIRISVYNEASSHKYVPRAILVDLEP 80
 EFF1135 -MTQSVVVVVGQCGNQIGCCFWDLALREHAAVNQKGIYDEAIISSFFR-NVDTRVVGDDGGSISKGKICSLKARAVLIDMEE 80
 EFF1136 -MTQSVVVVVGQCGNQIGCCFWDLALREHAAVNQKGIYDEAIISSFFR-NVDTRVVGDDGGSISKGKICSLKARAVLIDMEE 80
 EFF1129 -MREIVLTQIGQCGNQIGAKFWEVISDEHAIDSAGTYHGDS-----HLQLEIRINVYNEASGGRYVPRAVLDLEP 80
 EFF1130 -----ILVDLEP 80
 EFF1137 ----- 80
 EFF1131 -MRECLSIHQAGIGIGDQACWELYCLEHGIQPNGVVLDTQDDQLENAKMEHTNASFDTFCEI TRAGKHVPRAVFDLEP 80
 EFF1126 -----EGTD RKDVFYFQADDEHYIPRAVLLDLEP 80
 EFF1134 MPREIITLQCGCGNQIGGFEFWKQLCAEHGISPEIGVEEFAT-----EGTD RKDVFYFQADDEHYIPRAVLLDLEP 80
 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

EFF1127 TVVDEVRTGTIRQLFHPEQLITGKED--AANNYARGHYTIGKEIVDLVLDRIKRLADLCTGLOGFLIFHSFGGGTGSFGA 160
 EFF1133 TVIDEVRTGTIRQLFHPEQLITGKED--AANNYARGHYTIGKEIIDLVLDRIKRLADCTGLOGFLVHFSGGGTGSFGT 160
 EFF1128 GTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSG--AGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDCLOGFQLTHSLGGGTGSQMG 160
 EFF1132 GTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSG--AGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKECENCDCLOGFQLTHSLGGGTGSQMG 160
 EFF1135 GVVNEILQGFRLDVFDTKQLITDISG--SGNNWAVGHKVFGLYQDQILEKFRKSAEHCDCLQCFFIHSMGGGK--IFH 160
 EFF1136 GVVNEILQGFRLDVFDTKQLITDISG--SGNNWAVGHKVFGLYQDQILEKFRKSAEHCDCLQCFFIHSMGGGTSGLG 160
 EFF1129 GTMDSVRSRSGPFGQVFRPDNFIFGQCG--AGNNWAKGHYTEGAELMESVMDVVRKEAESCDCLOGFQLTHSLGGGTGSQMG 160
 EFF1130 GTMDSVRSRSGPFGQVFRPDNFIFGQCG--AGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKECENCDCLOGFQLTHSLGGGTGSQMG 160
 EFF1137 -----GHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDCLOGFQLTHSLGGGTGSQMG 160
 EFF1131 TVIDGITGQHRSLFHPEQLITGKED--AANNYARGHYTIGKEIVDLVLDRIKRLADLCTGLOGFLIFHSFGGGTGSFGT 160
 EFF1126 -----GLADQCTGLOGFLVHFSGGGTGSFGT 160
 EFF1134 RVHISILNSPYAKLYNPENIYLSHGGGAGNNWASG--FSGGEKIHEDIFDIIDREADGSDSLEGFVLCHSITAGTGSGLG 160
90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160

EFF1127 SLIMERLSVDYGGKSKLEFAIYF--APQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNR 240
 EFF1133 SLIMERLSVDYGGKSKLEFAIYF--APQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNR 240
 EFF1128 TLLISKIREEPDRIMNTFSVMP--SPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPPTYGDLNH 240
 EFF1132 TLLISKIREEPDRIMNTFSVMP--SPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPPTYGDLNH 240
 EFF1135 SFACNSVKG----- 240
 EFF1136 TLLISKIREEPDRIMNTFSVMP--SPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPPTYGDLNH 240
 EFF1129 TLLISKIREEPDRIMNTFSVMP--SPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPPTYGDLNH 240
 EFF1130 TLLISKIREEPDRIMNTFSVMP--SPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPPTYGDLNH 240
 EFF1137 TLLISKIREEPDRIMNTFSVMP--SPKVSdTVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPPTYGDLNH 240
 EFF1131 SLIMERLTGEYSRKTLEFSVYP--APRISTAVVEPYNSVLTTHSTTEHSDCAFMVDNEAVYDICRRNLDIERPTYTNLNR 240
 EFF1126 SLIMERLSVDYGGKSKLEFAIYF--APQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNR 240
 EFF1134 SYLLERLNDRYPKKLVQTYSVFPNQDEMSDVVVPYNSLLTLKRLTONADVVDLNTALNRIATDRLHICNPFSQINQ 240
170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240

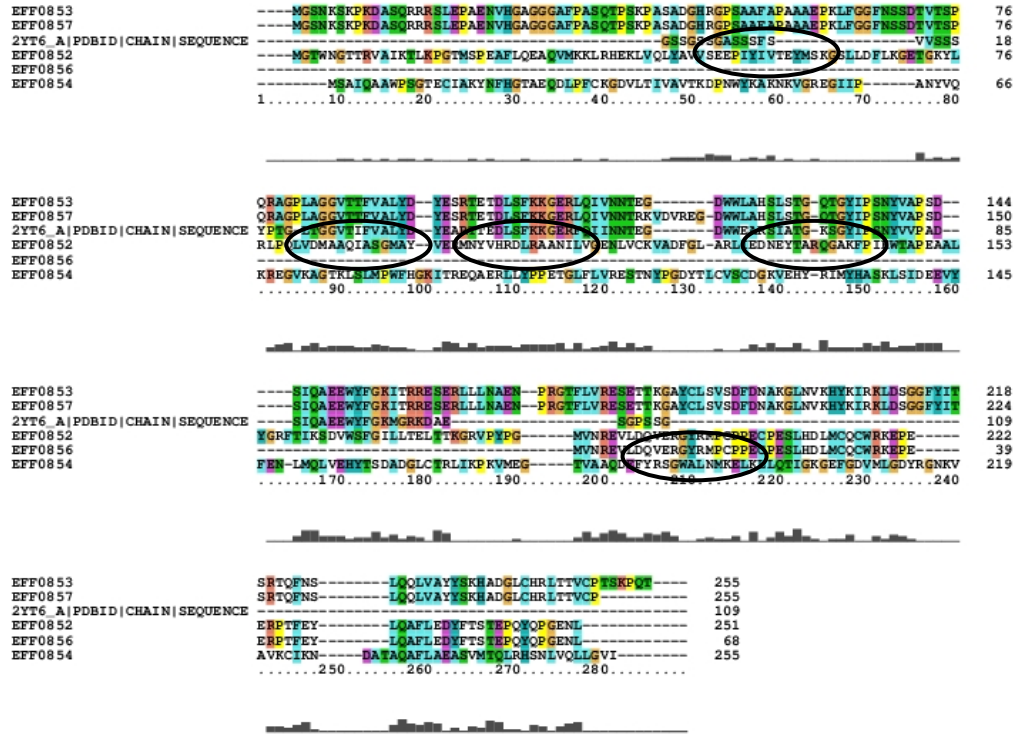
EFF1127 LIQIVSSITASLRFDGALNVDLTFE----- 320
 EFF1133 LIQIVSSITASLRFDGALNVDLTFE----- 320
 EFF1128 LVSATMSGVITCLRFPGQLNADLRKLAV----- 320
 EFF1132 LVSATMSGVITCLRFPGQLNADLRKLAV----- 320
 EFF1135 ----- 320
 EFF1136 KPKSLVTSSSGALKKQHKKPF----- 320
 EFF1129 LVSATMSGVITCLRFPGQLNADLRKLAV----- 320
 EFF1130 LVSATMSGVITCLRFPGQLNADLRKLAVMVFPFRLHFFMPGFAPLTARGSCQYRALVPELTQOMFQDAKNMMAACDPRH 320
 EFF1137 LVSATMSGVITCLRFPGQLNADLRKLAVMVFPFRLHFFMPGFAPLTARGSCQYRALVPELTQOMFQDAKNMMAACDPRH 320
 EFF1131 LVQVVSITASLRFEGL----- 320
 EFF1126 LIQIVSSITASLRFDGALNVDLTFEQTNLVVPYRIHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQVMKCDPRH 320
 EFF1134 LVSTIMASITTLRYPGYMNNDLIG----- 320
250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320

Şekil 7. Efektör olan tübilin proteinlerinin çoklu hizalanma sonucu.

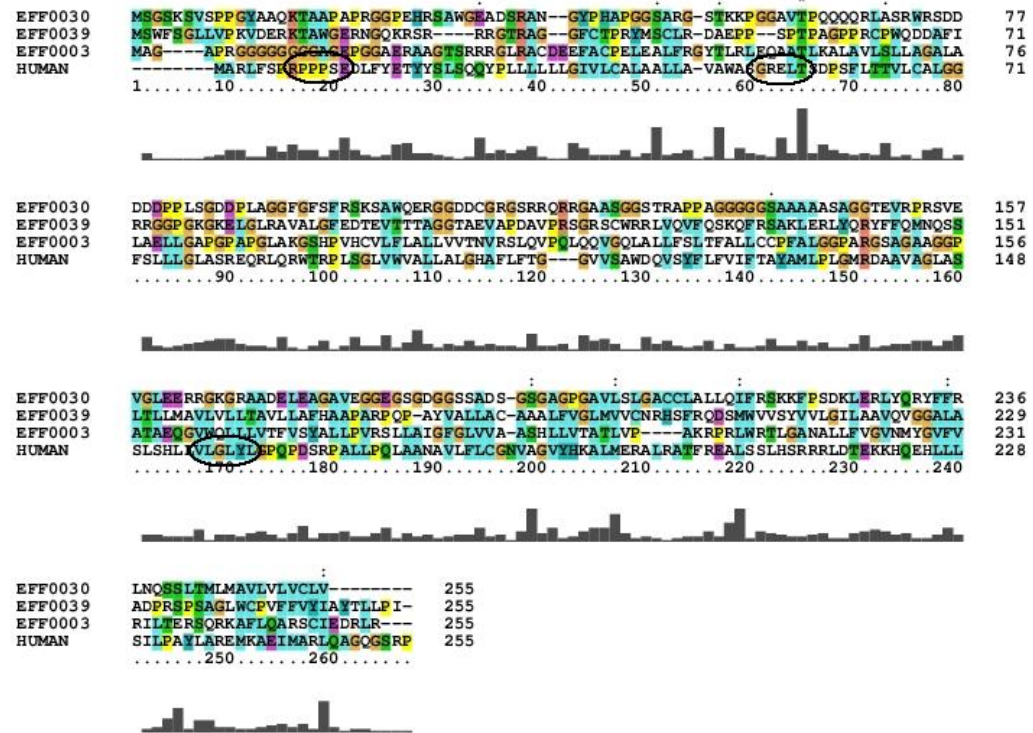


Şekil 8. Efektör olan voltaj bağımlı N-tipi sodyum kanal proteinlerinin çoklu hizalama sonucu

BLAST sonucu src tyrosine kinase ve adenilat siklaz ailesine benzer birer protein elde edildi. Bu proteinlerden Src tyrosine kinaz ailesine üye olan proteinin (olası efektör) üçüncül yapısı bilinmesinde karşın (www.pdb.org, PDI: 2YT6) adenilat siklaz ailesine ait üyenin (adenilat siklaz 4) yapısı bilinmemekteydi. Bu nedenle bu proteinin üçüncül yapısı benzeşim modellemesiyle elde edildi. Her iki protein dizisi de kendi aile üyeleriyle yeniden hizalandı (Şekil 9-10). Bu hizalama sonucu docking simülasyonu için src tirozin kinaz ailesi için 5, adenilat siklaz ailesi için 3 motif belirlendi.



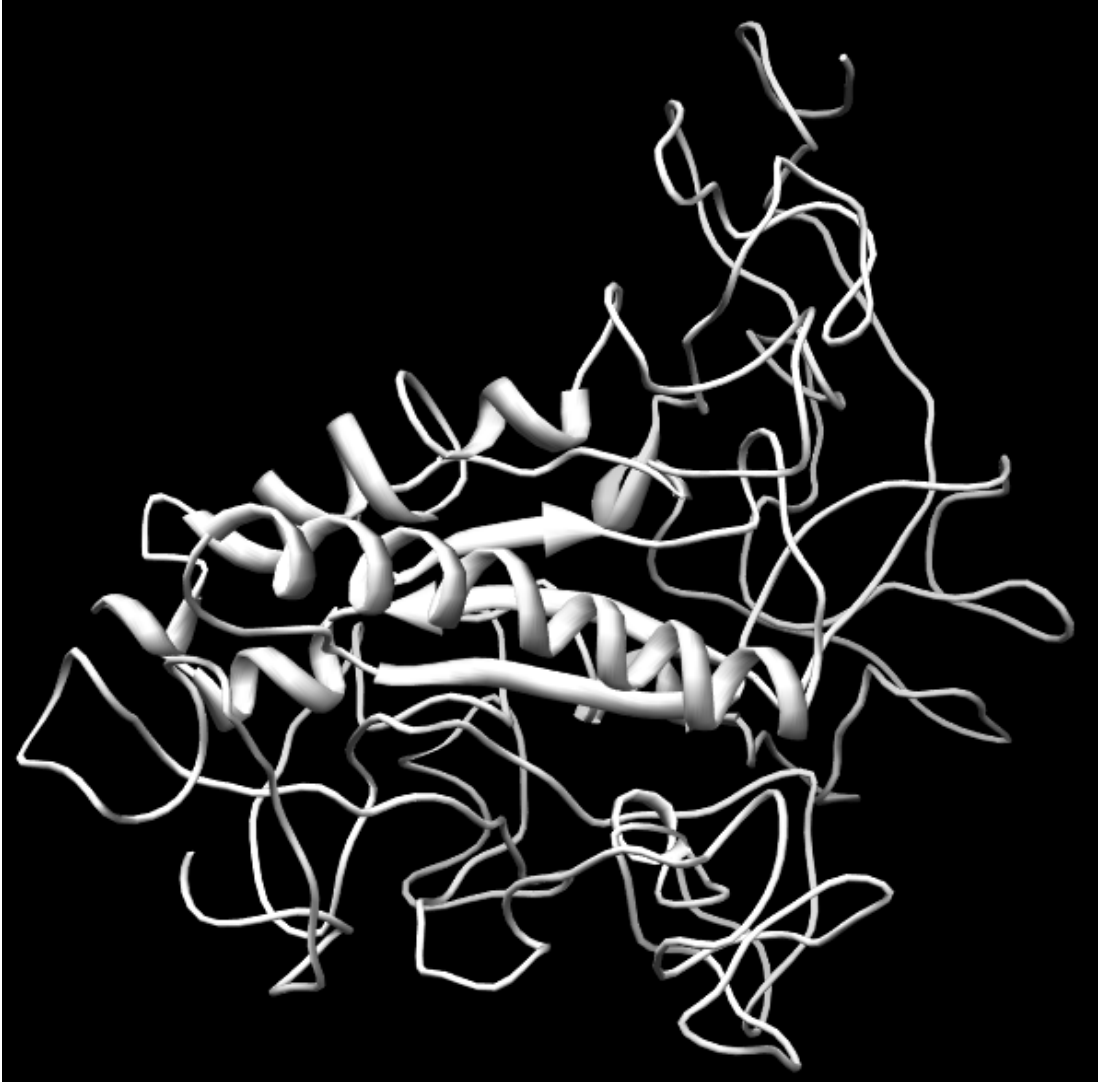
Şekil 9. Efektör olan src tyrosine kinaze proteinleri ile 2YT6 proteinin çoklu hizalama sonucu. Motifler elips içinde gösterilmektedir.



Şekil 10. Efektör olan adenilat siklaz proteinleri ile olası efektör (adenilat siklaz 4) proteinin çoklu hizalama sonucu. Motifler elips içinde gösterilmektedir

6.2 Benzeşim Modellemesi

Yapısı bilinmeyen olası efektör adenilat siklaz 4'ün üçüncül yapısının elde edilmesi için benzeşim modellemesi yapılmıştır. Yapısı bilinen protein yapıları arasından elde edilen 1azs.pdb kodlu proteinin amino asit dizisi modellemede kalıp olarak kullanılmıştır. 50 farklı model elde edilip en düşük enerjili model çalışma için seçilmiştir (şekil 11).



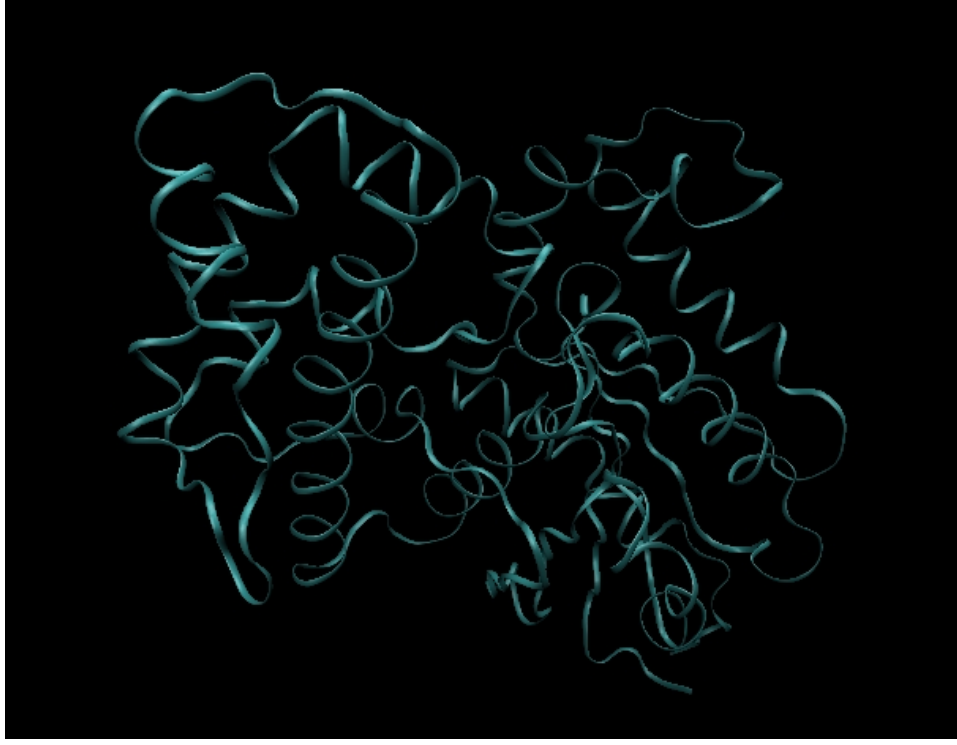
şekil 11. Benzeşim modellemesi sonucu elde edilen olası efektör (adenilat siklaz 4) modeli

6.3 Moleküler Dinamik Simülasyonu

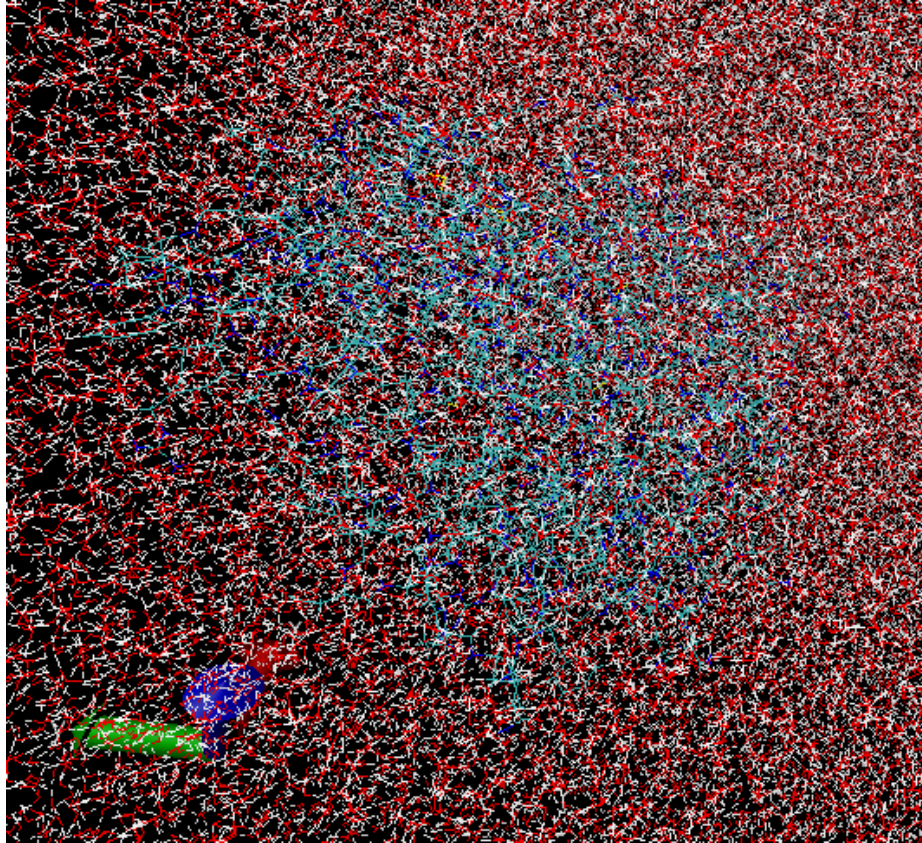
Go-alfa proteini sulu ortamda, 2 femto saniye adım aralığı ve 10.000.000.adımda toplamda 20 nano saniye moleküler dinamik simülasyonu tabi tutuldu. Simülasyon parametleri Tablo 4’de belirtilmiştir. Simülasyon sonucunda proteinin genel topolojisinin bozulmadığı görüldü (Şekil 12, 13). Olası efektör proteinin benzeşim modellemesinden elde edilen üçüncül yapısı da aynı şekilde moleküler dinamik simülasyonuna tabi tutulmuştur.

Tablo 4. Moleküler dinamik simülasyon parametreleri

cwd	/Desktop/NAMD/Go-alfa
structure	Go-alfa.psf
coordinates	Go-alfa.pdb
set temperature	300
set outputname	Go-alfa
binaryoutput	no
firsttimestep	0
paraTypeCharmm	on
parameters	par_all22_prot.inp
temperature	\$temperature
exclude	scaled1-4
1-4scaling	1.0
cutoff	12.
switching	on
switchdist	10.
pairlistdist	13.5
numsteps	5000
timestep	2
rigidBonds	all
nonbondedFreq	1
fullElectFrequency	2
stepspercycle	10
langevin	on
langevinDamping	5
langevinTemp	\$temperature
langevinHydrogen	off
outputName	\$outputname
outputEnergies	5000
outputPressure	0
restartname	Go-alfa-rst
restartfreq	5000
restartsave	yes
minimize	5000
run	10000000



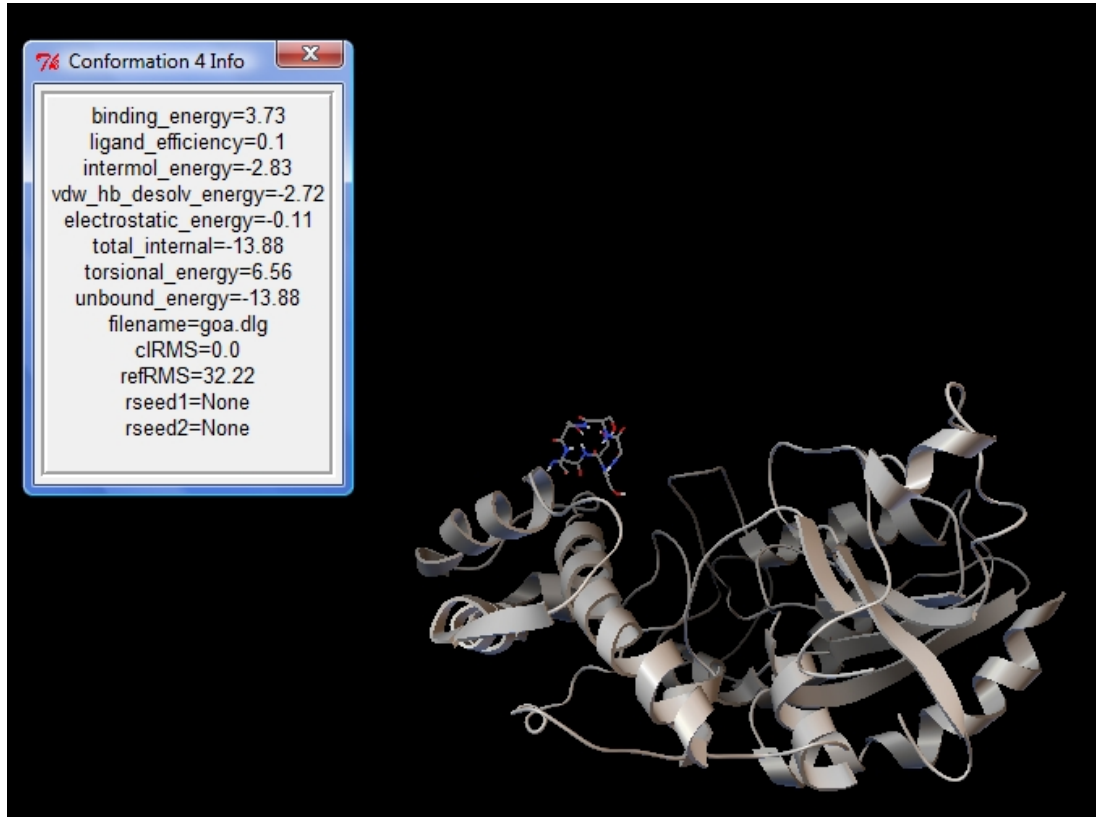
Şekil 12. Go-alfa proteini moleküler dinamik simülasyon sonrasında (su molekülleri çıkarılmıştır).



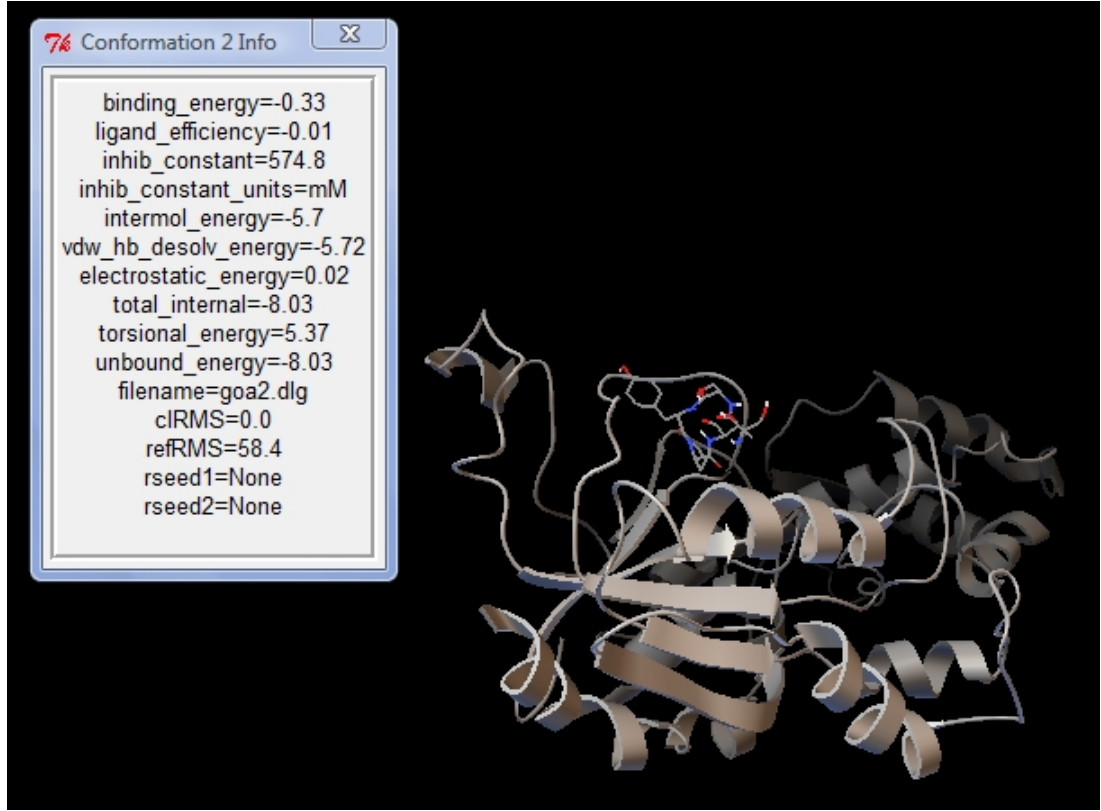
Şekil 13. Go-alfa proteini moleküler dinamik simülasyon sonrasında (sulu ortamda).

6.4 Docking Simülasyonu

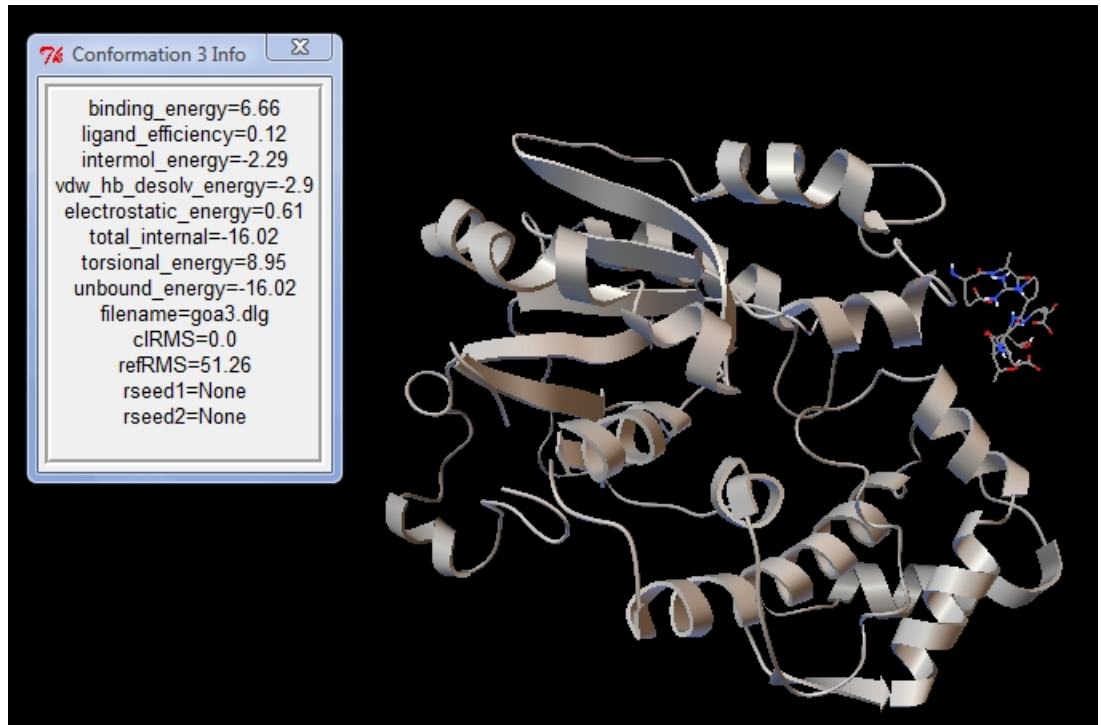
Src tyrosine kinaze enzimine yüksek benzerlik gösteren “*SH3_1 domain of Yamaguchi sarcoma viral (v-yes) oncogene homolog 1*” (PID: 2YT6) proteini scr tyrosine kinaze üyeleriyle birlikte hizalanarak ortak motifler belirlendi (Şekil 9). 2YT6 proteini docking simülasyonu için çok büyük olduğundan 5 motif bölgesi kesilip ligand olarak docking simülasyonuna tabi tutuldu. Docking simülasyonu sonucu her ligand için 10 adet olası protein-efektör etkileşimleri elde edilmiştir. Bu olası etkileşimlerden en düşük bağlanma enerjisine sahip etkileşimler seçilmiştir. Uygun görülen etkileşimler aşağıdaki şekillerde gösterilmiş olup bağlanma enerjileri şekil içindeki tabloda gösterilmiştir (Şekil 14-18).



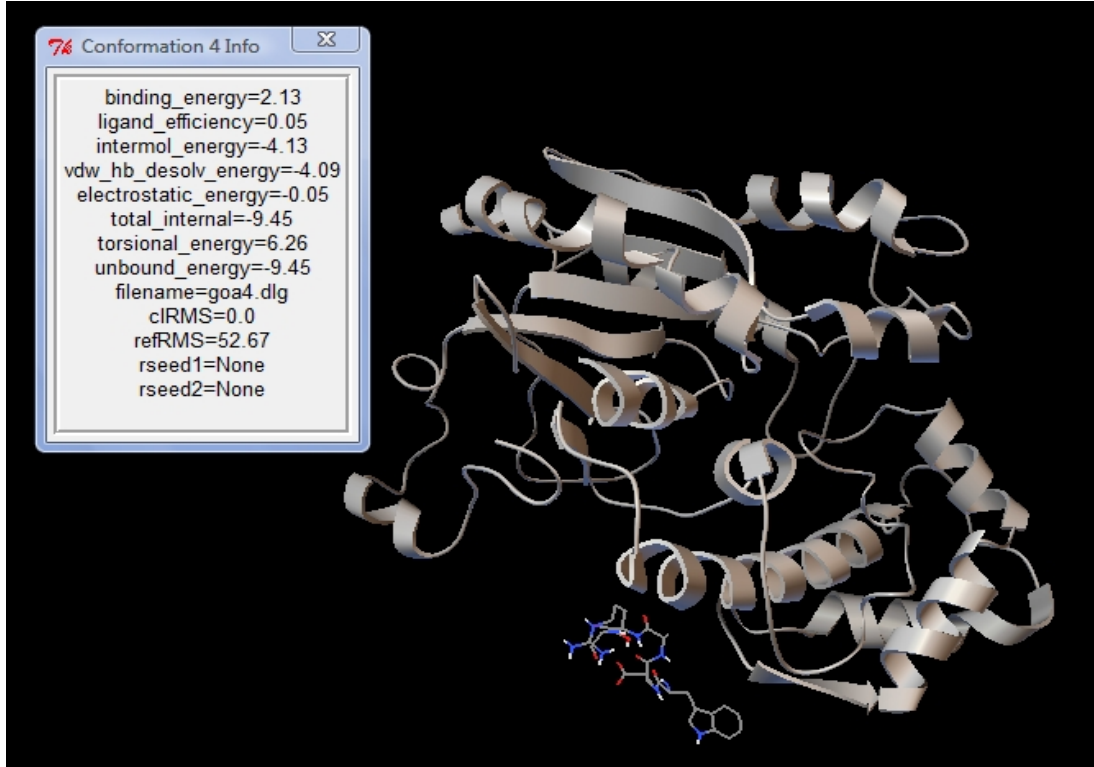
Şekil 14. Olası Go-alfa-efektör (2YT6) etkileşimi.



Şekil 15. Olası Go-alfa-efektör (2YT6) etkileşimi.



Şekil 16. Olası Go-alfa-efektör (2YT6) etkileşimi.

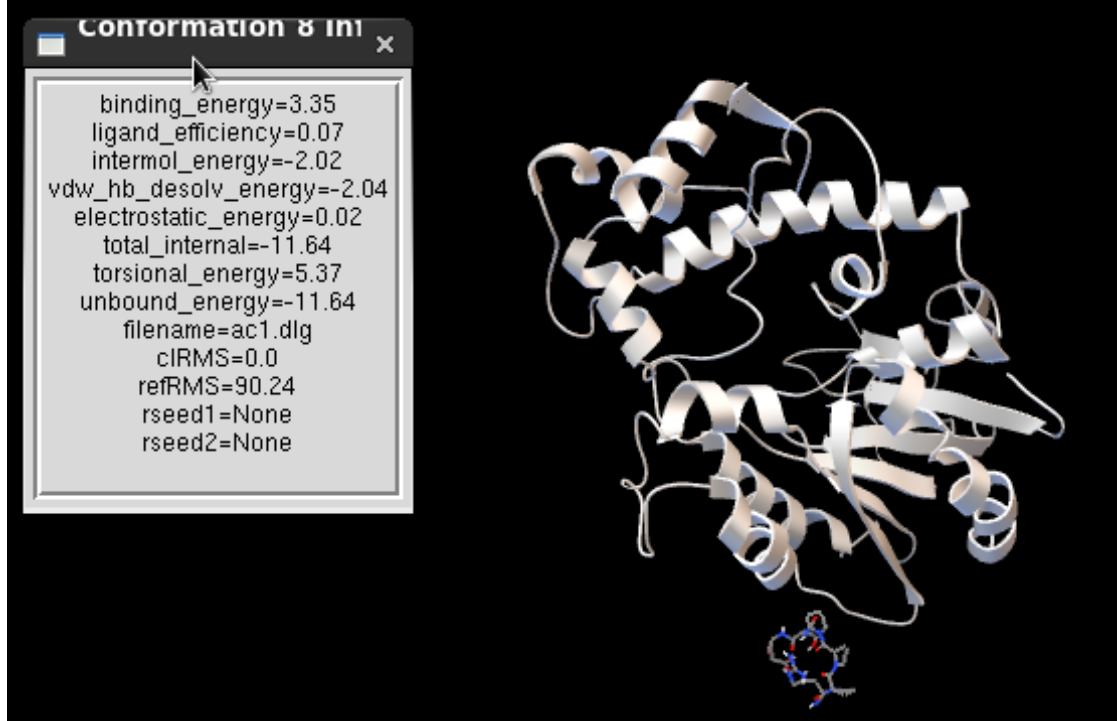


Şekil 17. Olası Go-alfa-efektör (2YT6) etkileşimi.

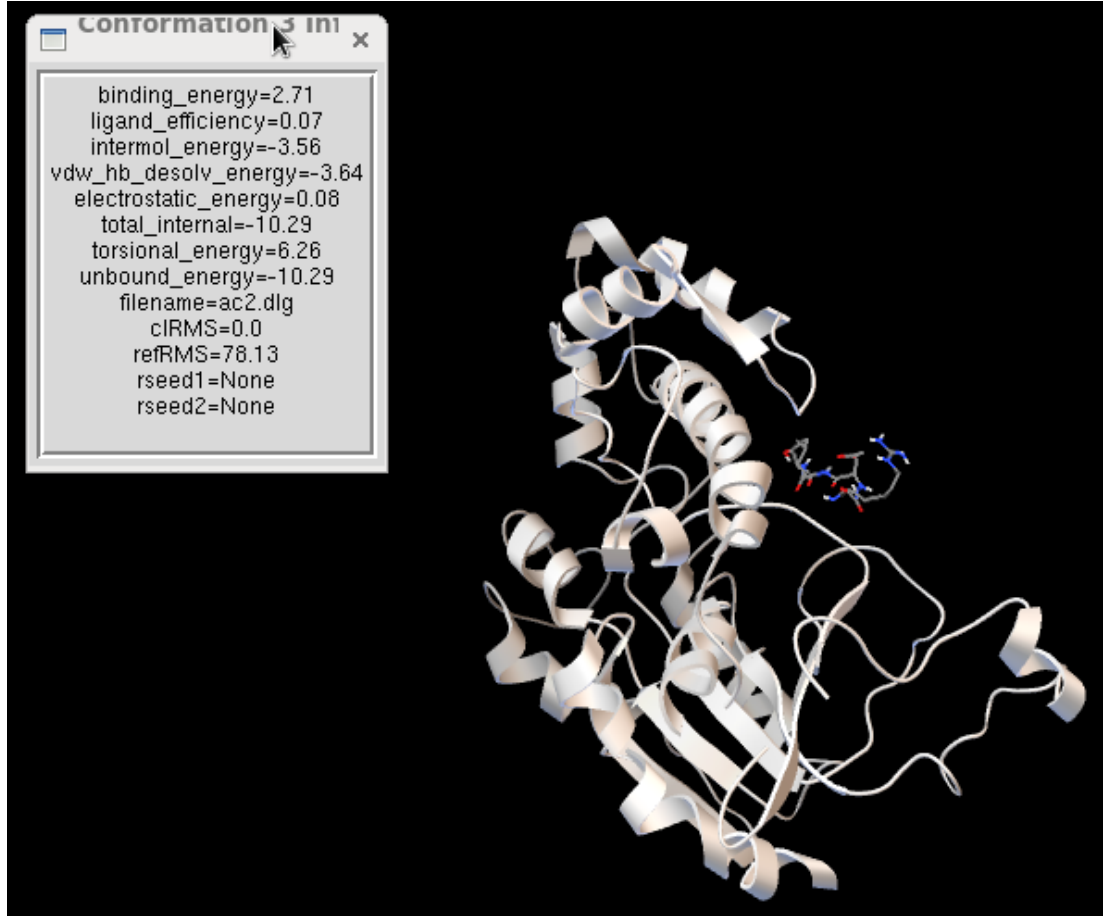


Şekil 18. Olası Go-alfa-efektör (2YT6) etkileşimi.

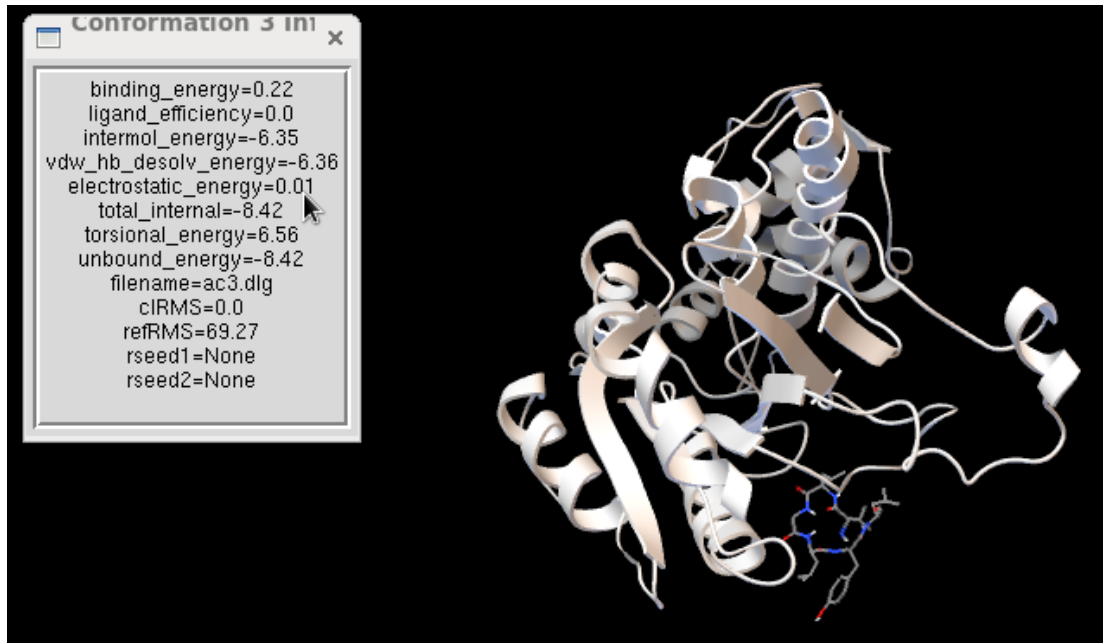
Adenilat siklaz protein ailesine üye olan olası efektör proteini için belirlenen 3 adet motif ligand olarak docking simülasyonuna tabi tutuldu. Docking simülasyonu sonucu her ligand için 10 adet olası protein-efektör etkileşimleri elde edilmiştir. Bu olası etkileşimlerden en düşük bağlanma enerjisine sahip etkileşimler seçilmiştir. Uygun görülen etkileşimler aşağıdaki şekillerde gösterilmiş olup bağlanma enerjileri şekil içindeki tabloda gösterilmiştir (Şekil 19-21)



Şekil 19. Olası Go-alfa-efektör (adenilat siklaz 4) etkileşimi.



Şekil 20. Olası Go-alfa-efektör (adenilat siklaz 4) etkileşimi.



Şekil 21. Olası Go-alfa-efektör (adenilat siklaz 4) etkileşimi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Protein-efektör etkileşimlerinin teorik yöntemlerle bilgisayar ortamında (*in silico* veya *in algorithmico*) belirlenmesi oldukça yaygınlaşmıştır. Bunun en önemli nedenleri olarak bilgisayar olanaklarının gerek donanım gerek yazılım olarak çok yetkinleşmesini, söz konusu çalışma alanındaki algoritma bilgisinin ve bilgi birikiminin ciddi bir sıçrama yapmasını sayabiliriz. Bu gelişmeler nedeniyle teorik yöntemlerden elde edilen veriler artık deneysel verilerle yarışabilir hale gelmiştir. Bunun da ötesinde teorik çalışmalar deneysel çalışmaları bütünlemekte, onlara yön vermektedir.

In silico çalışmaların yaygınlaşmasının bir diğer nedeni de deneysel çalışmalara göre zaman ve maddi kaynaktan açısından büyük ölçüde tasarrufa olanak sağlamasıdır. *In silico* çalışmalarından gelen veriler çok zaman alan ve oldukça maliyetli olan laboratuvar çalışmalarının bir kısmının yapılmasını gereksiz hale getirebilmektedir.

Tüm bunların ötesinde *in silico* çalışmalar, oldukça karmaşık olan biyolojik, biyokimyasal, fizyolojik, genetik gibi yaşamsal süreçlerin anlaşılmasında yeni araçlar, yeni perspektifler sunmakta, canlılığın bir bütün olarak anlaşılmasına olanak sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında Go-alfa proteinin etkileştiği efektör proteinler araştırılmıştır. Go-alfa proteini merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunmasına karşın işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Etkileştiği efektör proteinlerinin bir kısmı bilinse de bunlar dışında çok sayıda efektörle etkileştiği düşünülmektedir. Eğer etkileştiği efektör proteinler bilinirse, bu efektörlerin görev aldığı biyokimyasal süreçler belirlenip Go-alfa'nın işlevi hakkında bilgi edinilebilir.

Tez çalışmasında kullanılan Go-alfa proteininin üçüncül yapısı daha önce Biyofizik Anabilim Dalı'nda yürütülen bir yüksek lisans çalışmasından benzeşim modellemesi yöntemiyle elde edilmiştir (Macit 2012). Üçüncül yap molekül

dinamik simülasyonla iyileştirildikten sonra çalışmada kullanılmıştır. Hizalama ve BLAST çalışmaları sonucu 2 aday efektör proteini belirlenmiştir. Belirlenen bu iki aday, efektör protein dizileri çoklu hizalamaya sokularak 8 adet motif belirlenmiştir. Efektör proteinleri oldukça büyük moleküller olduğundan tamamının docking simülasyonlarına sokulması simülasyon süresini oldukça uzatmaktadır. Bu nedenle, sadece motifleri içeren bölgeler simülasyona dahil edilmiştir.

Docking simülasyonları sonucunda çok sayıda protein-efektör etkileşimi elde edilmiştir. Bunların büyük kısmı enerjetik ve topografik nedenlerle elenmiştir. Kalan etkileşimler enerjetik açıdan olası etkileşimlerdir. Ancak bu etkileşimlerin bağlama enerjileri oldukça yüksektir. Bu nedenle bu etkileşimlerin zayıf olduğu düşünülmektedir. Yine de deneysel çalışmalarla doğrulanması önemli olabilir.

Öngörülen bu etkileşimlerin deneysel olarak iki şekilde doğrulanması gerekmektedir. İlk olarak bu protein-efektör etkileşimlerinin pull-down assay, immün çöktürme, gibi deneysel yöntemlerle varlığının doğrulanması gerekmektedir.

İkinci olarak da varlığı ispatlanan protein-efektör etkileşiminin hangi atomlar arasında gerçekleştiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Docking simülasyonlarından etkileşimlerin hangi atomlar arasında olduğu öngörülmektedir. Bu atomları içeren amino asitler site-directed mutagenesis gibi yöntemlerle değiştirilerek bu etkileşimlerin bozulup bozulmadığı belirlenebilir.

Bu doğrulama yöntemleri de göstermektedir ki, *in silico* çalışmalar deneysel çalışmalara yol gösterici olmakta, deneysel çalışmaları belirli noktalara odaklaştırabilmektedir. Oysa diğer durumda, olası etkileşimler için gereğinden fazla proteinle çalışma zorunluluğu ortaya çıkmakta, belirlenen etkileşimin hangi atomlar arasında olduğunun belirlenmesi için çok sayıda amino asidin mutasyona uğratılmasına gerek duyulmaktadır. Böylece bu tez çalışmasında deneysel çalışmalarla doğrulanmaya gereksinimi olan Go-alfa proteini ile efektör protein etkileşimleri belirlenmiştir. Niteliği, kullanılan simülasyon yöntemlerinin niteliğine bağlı olan bu etkileşimlerin bilimsel anlamda önemli olduğu düşünülmektedir.

8.KAYNAKLAR

- Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, Gilman AG (1983). Identification of the predominant substrate for ADP ribosylation by islet-activating protein. *J Biol Chem*, 258: 2072–2075.
- Branden C, Tooze J. (1999). Introduction to Protein Structure. 2nd ed, *Garland Publishing*, USA.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*, 24(6):765-781.
- Codina J, Hildebrandt J, Iyengar R, Birnbaumer L, Sekura RD, Manclark CR (1983). Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an alpha beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc Natl Acad Sci*, 80: 4276–4280.
- Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, 265:1405–1412.
- Downes GB, Gautam N. (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics*, 62:544 -552 .
- Elefsinioti AL, Bagos PG, Spyropoulos IC, Hamodrakas SJ. (2004). A database for G proteins and their interaction with GPCRs. *BMC Bioinformatics*. 5:208.
- Hamm HE.(1998). The many face of G protein signalling. *The journal of biological chemistry*, 273(2): 669-672.
- Hepler JR, Gilman AG. (1992). G Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17: 383-387.
- Itoh H, Kozasa T, Nagata S, Nakamura S, Katada T, Ui M, Iwai S, Ohtsuka E, Kawasaki H, Suzuki K, 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*, 83: 3776–3780.
- Jiang M, Bajpayee NS. (2009). Molecular mechanisms of Go signaling. *Neurosignals*, 17(1):23-41.

- Jiang M, Spicher K, Boulay G, Wang Y, Birnbaumer L (2001). Most central nervous system D 2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 3577–3582.
- Knall C, Johnson GL. (1998). G-protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J Cell Biochem*, 31:137–146.
- Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. (1994). Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G-protein. *Nature*, 369:621–628.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Macit, R (2012). G Proteini Beta/Gama Alt Biriminin Üçüncül Yapısının Homoloji (Benzeşim) Modellemesi ile Belirlenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul (Danışman: Yard. Doç. Dr. Cevdet Nacar).
- Madamanchi A. (2007). Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *Mcgill J Med*. 10(2):99-104.
- Milligan G, Klee WA (1985). The inhibitory guanine nucleotide-binding protein (Ni) purified from bovine brain is a high affinity GTPase. *J Biol Chem*, 260: 2057–2063.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K.,Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, 16: 2785-2791.
- Murtagh F (1984). "Complexities of Hierarchic Clustering Algorithms: the state of the art". *Computational Statistics Quarterly* 1: 101–113.
- Neer EJ, Lok JM, Wolf LG (1984). Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 259: 14222–14229.
- Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature*, 366:654–663.

- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kale L, Schulten K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1781-1802.
- Sali A and Blundell TL.(1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 234: 779-815.
- Skiba NP, Bae H, Hamm HE. (1996). Mapping of effector binding sites of transducin alpha-subunit using G alpha t/G alpha i1 chimeras. *J Biol Chem*, 271(1):413-424.
- Sokal R and Michener C (1958). "A statistical method for evaluating systematic relationships". *University of Kansas Science Bulletin* 38: 1409–1438.
- Sondek J, Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. (1994). GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature*, 372:276–279.
- Sternweis PC, Robishaw JD (1984). Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem*, 259: 13806–13813.
- Subramaniam, S. (1998). The Biology Workbench - a seamless database and analysis environment for the biologist. *Proteins*, 32(1):1-2.
- Taussig R, Zimmermann G. (1998). Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways. *Adv Sec Mess Phosphoprot Res*, 32:81–98.
- Theodoropoulou MC, Bagos PG, Spyropoulos IC and Hamodrakas SJ. (2008). gpDB: A database of GPCRs, G-proteins, Effectors and their interactions. *Bioinformatics*, 24(12):1471-1472.
- Wettschureck N, Offermanns S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 85: 1159-1204.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sibel	Soyadı	Deniz
Doğum Yeri	Münih	Doğum Tarihi	28.12.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	34157398628
E-mail	sibeldeniz@gmail.com	Tel	(535) 285 33 01

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Haydarpaşa Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-

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

	Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS	YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	75	87,5							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75	77	67
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office Programları	Çok İyi
NAMD, Modeller	İyi
Python, C	Orta