TÜBİTAK

Alosterik Proteinlerin Fonksiyonunda Kritik Rol Oynayan Bölgelerin Belirlenmesine Yönelik, Mod Etkileşimlerinin Dinamik Analizine Dayalı Yeni Bir Yöntem

Program Kodu: 1001

Proje No: 113F092

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Alkan KABAKÇIOĞLU

Araştırmacı:

Doç. Dr. Deniz Yuret

Danışman:

Prof. Dr. Burak Erman

Bursiyerler:

Fatemeh Aghapourasl

Neşe Aral

Armin Hodaei

Murat Öztürk

KASIM 2016

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Proteinlerde fonksiyonel bölgelerin saptanması modern tıbbın hızla gelişen alanlarından biri olan moleküler ilaç tasarımı sürecinin ilk ve temel aşamalarından biridir. Doğanın belli işlevler için evrimin süzgecinden geçirerek seçtiği bu çok özel moleküllerin yapıları ile işlevsel dinamikleri arasındaki köprüyü kurmak, moleküler tıp alanındaki protein odaklı pratik uygulamalara ışık tutacak bir yol haritası oluşturmamızı sağlar. Bu nedenle, yakın dönemde proteinlerde yapı-dinamik-işlev ilişkisinin temel fizik kanunları çerçevesinde incelenmesi yönünde çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmaktadır. TÜBİTAK-MFAG'nun desteğiyle ve Koç Üniversitesi bünyesinde üç yıl içinde tamamlanmış olan 113F092 No'lu bu araştırma projesinde, yukarıdaki literatüre özgün katkılar sağlayan ve proteinlerde işlevsel açıdan aktif bölgelerin belirlenmesine yönelik yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Suda çözünen proteinlere özgü ve girdi olarak sadece PDB veri tabanından ulaşılabilen yapı bilgisini kullanan bu yöntem, GPU tabanlı benzetim teknikleri ve bunların üzerine eklemlediğimiz yeni bir analiz yardımıyla proteinin yüzeyindeki ve içindeki her bölgeye bir işlevsel önem derecesi atayabilmektedir. Geliştirdiğimiz bu özgün metodun etkinliği farklı proteinler üzerinde sınanmış ve elde edilen olumlu sonuçlar -bu raporun yanı sıra- uluslararası makaleler ve sunumlar aracılığıyla diğer araştırmacılarla paylaşılmıştır. Yakın gelecekte bu ürünü çevrimiçi bir biyo-bilişimsel araç olarak tüm araştırmacıların kullanımına açık bir platformda erişilebilir kılmayı hedefliyoruz.

Proje çalışmalarına değişik dönemlerdeki katkıları nedeniyle bütün proje ekibine, ayrıca proje ekibinde görünmese de (başka kaynaklardan desteklendiği için) GR proteinleri üzerine hesaplamaların büyük kısmını tek başına yürütmüş olan yüksek lisans öğrencim Batuhan Kav'a çok teşekkür ederim.

Doç. Dr. Alkan Kabakçıoğlu
Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

1 GİRİŞ **1**

2 LİTERATÜR ÖZETİ **2**

3 YÖNTEM **6**

3.1 Moleküler dinamik benzetim çalışmaları *7*

3.1.1 Hesaplama altyapısının oluşturulması 7

3.2 Mod etkileşimlerinin olasılık dağılımına katkısının hesaplanması *9*

3.3 Mod etkileşimlerinin öne çıkardığı aminoasitlerin belirlenmesi *12*

4 BULGULAR **13**

4.1 Myosin II *13*

4.1.1 Myosin II proteininde salınım modları 13

4.1.2 Myosin II proteini üzerinde mod etkileşim analizi sonuçları 14

4.2 Glükokortikoid reseptör ailesi *18*

4.2.1 GR proteinleri üzerinde mod etkileşim analizi sonuçları 18

4.3 ACK1 proteini üzerinde mod etkileşim analizi sonuçları *24*

4.4 Mod etkileşim analizinin alternatif bir metot ile karşılaştırılması *26*

5 SONUÇ ve TARTIŞMA **27**

5.1 Proje Çıktıları *27*

5.2 Tartışma *28*

6 KAYNAKLAR **29**

TABLOLAR

Tablo 1. Myosin II'nin literatürde bulunan ve işlev açısından önemli olduğu gözlenmiş olan amino asitleri ve ilgili referanslar.....4

ŞEKİLLER

Şekil 1. Farklı benzetim programlarının (Amber, Gromacs, NAMD) kullanılan CPU sayısına göre (GPU'lu ve GPU'suz olmak üzere) performans karşılaştırması. Amber14 (dikey eksen yakınındaki mavi nokta), tek GPU ve tek CPU ile diğerlerinden daha yüksek bir performans gösterdi.....8

Şekil 2. Düşey çizgiler ile gösterilen moleküler dinamik verisine en iyi uyan Gaussiyen dağılım kesikli çizgiyle gösterilmiştir. Veri ile uyumlu olan diğer (kesiksiz ve daireli) eğriler lineer olmayan etkileri dikkate alan modelden üretilmiştir.....10

Şekil 3. Maksimum Hermite polinom derecesinin 8, 16 ve 32 olarak seçildiği durumlarda düşey çizgiler ile gösterilen moleküler dinamik verisine en iyi uyan marjinal dağılımlar en yavaş salınım modu ekseni üzerinde gösterilmiştir.....13

Şekil 4. Myosin II (1VOM) proteini üzerinde moleküler dinamik benzetiminin dengeye ulaştıktan sonraki ilk 1, 2, 5 ve 10 ns'lik yörüngesi üzerinde gerçekleştirilen mod etkileşim analizinden elde edilen değişik amino asit skorlarının karşılaştırılması. Renkli bölgeler işlevsel önemi olan bölgelerdir ve sırayla "P-loop" (yeşil), "Switch-I" (kırmızı), "Myopathy loop" (gri), "Switch-II" (turkuaz), "relay helix" (sarı) ve "Loop-2" (mor) olarak adlandırılırlar.....14

Şekil 5. Myosin II'nin DNA ve ATP'ye bağlanmasında rol oynayan bölgelerin yapı üzerinde konumları.....15

Şekil 6. Kullandığımız üç farklı skor atama metodunun deneysel olarak işlevsel önemi olduğu gösterilmiş 43 amino asit ile tutarlılığı. Köşegen çizgisinin altındaki eğriler daha tutarlı skor atama yöntemlerine işaret etmektedir. Karşılaştırma için, burada kullandığımız yöntemlere amino asitlerin farklı türler arasında hangi oranda değişiklik gösterdiğini ölçen korunum skoru (conservation score) da eklenmiştir.....16

Şekil 7. İşlevsel önemi deneysel olarak gösterilmiş olan 46 amino asit (sol) ve mod etkileşimi skoru en yüksek olan %10'un görsel karşılaştırması. Yüksek skorlar sıcak renklerle ifade edilmiştir.....17

Şekil 8. AncGR2 proteininde seçilmiş bazı mod çiftleri için yörüngeler üzerinden elde edilmiş olasılık dağılımı.....19

Şekil 9. AncGR1 proteinin en yavaş 25 salınım modu çifleri arasındaki etkileşimin konfigürasyonel entropiye etkisi. Sıcak renkler yüksek etkiyi ifade eder.....20
Şekil 10. AncCR, AncGR1 ve AncGR2 için Δmn değerinin "Zipf" eğrisi. Siyah düz çizginin eğimi -0.8'dir.....21
Şekil 11. (a) AncCR, (b) AncGR1, (c) AncGR2, ve (d) İnsan GR proteinleri için X+Y+Z mutasyon kümesi üzerinde hesaplanmış "recall" analizi sonuçları. Pembe noktalar proteinin bir sonraki aşamaya evrimindeki bütün mutasyonların hedef küme olarak alındığı durum, köşegen altında kalan diğer eğriler ise sadece X, Y, Z mutasyonları içindir. Mod etkileşim skorları (JS ve JS Norm ile ifade edilmiştir). Std ile gösterilen B-faktörü ile elde edilmiş eğrilerin de köşegen altında kalması X, Y, Z mutasyonlarının çoğunlukla gevşek "loop" bölgelerinde olmasıyla ilgilidir.....22
Şekil 12. Mod etkileşim skorlarının benzetimler arası tutarlılığı ve tutarlılığın artan yörünge süresi ile değişimi.....23
Şekil 13. ACK1 proteininin PDB'den alınan yapısının moleküler dinamik benzetimleri altında dengeye erişimi.....24
Şekil 14. ACK1 proteininin dizilimi boyunca mod etkileşim skorları (Jensen-Shannon uzaklığı kullanılarak hesaplanmıştır).....25
Şekil 15. (a) ACK1 proteininde bütün tirozin aminoasitleri ile mod etkileşim skoru arasındaki tutarlılığı gösteren "recall" eğrisi. (b) sadece proteinin fonksiyonu sırasında forforilasyondan sorumlu tirozin aminoasitleri için aynı eğri.....25
Şekil 16. CAP proteininde alosterik etkileşimler için elde edilen (Rogers vd., 2013) amino asit önem skorları ile mod etkileşim skorlarının görsel karşılaştırması.....26

ÖZET

Proteinlerde yapı-dinamik-işlev arasındaki ilişki son birkaç on yıldır incelenmekte olan ve kanser, Alzheimer gibi hayati ve tedavisi bilinmeyen hastalıklardan sıradan gribe kadar pek çok sağlık sorununun altında yatan biyofiziksel mekanizmaların belirlenmesinde önemi olan bir araştırma alanıdır. Bu projenin kapsamını tanımlayan ve özellikle, kinazlar ve değişik reseptör proteinlerde olduğu gibi, proteinin içsel dinamiğinin bir liganda (örneğin küçük bir molekül ya da DNA) bağlanma sonrasında uğradığı değişikliğin ve bu değişim ile tetiklenen işlev artışı veya azalışının tanımlayıcı olduğu alosterik proteinler son zamanda aktif olarak araştırılmaya başlanmıştır. Bu proteinlerde iki bölge arasında bilgi transferinin molekülün iç dinamiğinin örneklediği yapıların dağılımı ve bu dağılımın liganda bağlanma sonrasında gösterdiği değişim ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bir başka paradigma ise, proteinin farklı noktaları arasındaki bilgi ve enerji transferinde salınım modları arasındaki etkileşimlerin önemli rol oynadığıdır. Projenin temel amacı, bu son paradigmadan yola çıkarak protein yapısında (özellikle yüzeyinde) işlev açısından kritik önemi olan bölgeleri belirleyen istatistiksel fizik temelli bir yöntem geliştirmek ve bu yöntemi farklı proteinler üzerinde sınamaktır.

Geliştirdiğimiz yöntem birkaç aşamadan oluşmaktadır:

1. Proteinin doğal yapısından başlayarak termal salınımlarla beslenen denge dinamiğini uzun süreli moleküler dinamik benzetimleri ile örneklemek;
2. Bu örnekleri istatistiksel fizik yöntemleri kullanılarak geliştirdiğimiz yeni bir kuramsal analiz ile inceleyerek mod etkileşimlerinin sistem üzerindeki etkisini izole etmek;
3. Analiz sonuçlarını yine özgün bir projeksiyon yöntemi ile mod uzayından gerçek uzaya taşıyarak proteinin yapısında fonksiyonel açıdan kritik öneme sahip bölgeleri belirlemek.

Metot, miyosin II, glükokortikoid reseptör protein ailesinden dört protein, insan serum albümin proteini ve prostat kanserinde önemli rol oynadığı bilinen kinaz ACK1 üzerinde sınanmış, hepsinde olumlu sonuçlar vermiştir. Elde edilen bulguların bir kısmı iki uluslararası makale ile rapor edilmiş olup diğerlerinin de ayrı bir yayına dönüştürülmesi süreci devam etmektedir. Son olarak, projede geliştirilen analiz metodu işlevsel bölgelerin tayini için geliştirilmiş başka bir metot ile karşılaştırılmıştır.

Anahtar sözcükler: alosterik protein, moleküler dinamik, mod etkileşimi, anharmonik etkiler.

ABSTRACT

Structure-dynamics-function relation in proteins is an important research area that has been actively pursued in the last few decades, thanks to its relevance to understanding the biophysical mechanisms underlying various diseases from life-threatening ones, such as various forms of cancer and Alzheimer's disease, to common cold. Allosteric proteins, which constitute the context of this project and have been the subject of much attention recently, are defined through the modulation of their activity upon binding a ligand (e.g., a small molecule or the DNA) which is believed to be mediated by a shift in the near-native configurational landscape sampled by the dynamics, as for example in kinases and various receptor proteins. In these proteins, the information transfer (upon binding) between two distinct sites is suggested to be releated to the structural distribution sampled by the internal dynamics and how this distribution is altered by the binding event. An alternative paradigm, however, suggests that it is the coupling between vibrational modes that governs the energy/information transfer across the structure. The main goal of this project is to develop a novel method based on the aforementioned last paradigm and on principles of statistical physics, which points at locations on the protein structure (particularly on the surface) that are of critical importance to function, and then to test the method on various proteins.

The method we developed is composed of the the following steps:

1. Sampling the long-time, thermal, near-native dynamics by using state-of-the-art molecular dynamics tools;
2. Isolating the contribution of mode-coupling to the dynamics by analyzing the molecular dynamics data using a novel method incorporating tools of statistical physics;
3. Identifying functionally critical sites on the protein by projecting the outcome of the above analysis from the mode (Fourier) space to the real space, again using an original approach.

The method has been tested on myosin II, four proteins from the glucocorticoid receptor family tree, human serum albümin, and the kinese ACK1 which plays a critical role in the development of prostate cancer. Positive results were obtained in all cases. Some of our findings are reported in two published papers, while a third article on ACK1 is currently in preparation. Finally, the analysis method has been compared with an alternative approach to functional site prediction.

Keywords: Allosteric protein, molecular dynamics, mode coupling, anharmonicity.

1 GİRİŞ

Geçtiğimiz son birkaç on yılda, protein araştırmalarında odak katlanma (dizilim-yapı ilişkisi) probleminden yapı-fonksiyon ilişkisinin anlaşılmasına doğru kaymıştır. Bu kaymanın itici gücü, moleküler tıp alanındaki ilerlemeler ve son yaklaşımın ilaç geliştirme teknolojilerine katkı potansiyelidir. Yapı-fonksiyon ilişkisi elbette dinamik üzerinden tanımlanır. Bu nedenle, son zamanda GPU tabanlı bilişim teknolojilerinin ortaya çıkması ile benzetim tekniklerinde yaşanan yaklaşık on kat hız artışı da bu çalışmalara ivme sağlamıştır.

Hemoglobin, myosin, çoğu reseptör protein gibi alosteri özelliği gösteren proteinlerin fonksiyonel dinamiği bu bağlamda ön plana çıkmış alanlardan biridir. Aloserik bir proteinin yüzeyindeki fonksiyonel bölgenin aktivitesi, yüzeydeki farklı bir noktaya genellikle zayıf kimyasal bağlarla tutunan ikinci bir (ligand) molekülün varlığı ile düzenlenir. Bu durum, özellikle ilaç tasarımında alternatif stratejilerin geliştirilmesine olanak verebilir. Alosterik proteinler her ne kadar proteinlerin bir alt sınıfı olarak düşünülse de, son zamanlarda alosterinin istisnadan çok kural olduğu fikri kabul görmeye başlamıştır. Bu projede, temel fizik prensiplerinden yola çıkılarak alosterik davranışı modellemeye ve bu sayede protein yüzeyinde işlevsel açıdan aktif bölgeleri belirlemeye yönelik yeni bir metot geliştirilmiştir.

Geliştirdiğimiz analizin odağı proteinin doğal yapısı civarındaki salınımlarıdır. Denge yakınındaki salınımların, özellikle dinamiğin en yavaş olduğu salınım eksenlerine izdüşümü genellikle Gaussiyen'den çok farklıdır. Bu harmonik ötesi etkilerin matematiksel anlamda eksiksiz bir ifadesinden yola çıkarak ürettiğimiz analiz, salınım modları arasındaki etkileşimleri nicelendirerek bu bilgiyi verilen bir proteinin yüzeyinde alosterik aktivite gösteren bölgelerle ilişkilendirmektedir. Mod-etkileşimi analizinin detayları raporun "Yöntem" bölümünde sunulmuştur.

Geliştirilen metot proje süresinde yedi protein üzerinde sınanmıştır. Bunlardan birincisi myosin II (PDB:1VOM) DNA'ya bağlanan ve işlevsel dinamiği bu bağlanma ile tetiklenen bir motor proteindir. Bu proteinin yapay mutasyonlar altında gösterdiği fonsiyon değişiklikleri üzerine literatürden elde edilen veriler ile geliştirdiğimizi metottan elde edilen sonuçların uyumlu olduğu gözlenmiştir. Daha sonra incelediğimiz dört protein, insan glükorkortikoid reseptörü (HGR) ve bu proteinin evrimindeki alt basamaklarda yer alan ata proteinler AncCR, AncCR1 ve AncGR'dir. Bu proteinler arasındaki evrimsel geçişlerde gözlenen

mutasyonlardan işlev açısından kritik olanları üzerine literatürde bulunan deneysel çalışmalar ile mod-etkileşim analizi sonuçları arasında yine tutarlılık olduğu gözlenmiştir. İncelediğimiz altıncı protein insan serum albümin (HSA) oldu. Kan plazmasında bulunan bu proteinin işlev bozuklukları analbüminemia ve benzeri hastalıkların nedenidir. Analiz sonuçlarımız bu hastalıktan sorumlu mutasyonların gerçekleştiği bölgelerin daha yüksek işlevsel önemi olduğuna işaret etmektedir. Son olarak prostat kanserinin gelişiminde kritik rol oynayan tirosin kinaz (ACK1) proteini analiz edilmiştir. Bu proteinin temel işlevi olan başka proteinlerin fosforilasyonunda aktif olan tirosin residülerinin lokasyonları ile mod-etkileşim analizimizin sonuçları da istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon göstermiştir. Yukarıdaki bulgulara ek olarak, mod-etkileşim analizi literatürde proteinlerin işlevsel bölgelerinin tahmini için McLeish ve ark. tarafından geliştirilmiş olan başka bir yöntem ile de karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar “Bulgular” bölümünde detayları ile sunulmuş ve son bölümde irdelenmiştir.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

Proteinlerin dinamik davranışı ile fonksiyonları arasındaki ilişki yaygın ve halen son derece aktif bir araştırma alanıdır (yakın zamanlı ve kapsamlı bir inceleme için bkz.: Bahar vd., 2010). Dinamiğin detayları deneysel olarak NMR spektroskopisi, ışıma bazlı teknikler (örneğin FRET) ve spin etiketleme (spin labeling) gibi metotlar yardımıyla incelenebilmektedir (Henzler-Wildman ve Kern, 2007; Mittermaier ve Kay, 2006; Columbus ve Hubbell, 2002). Bu deneyler sonucunda, proteinlerin zaman içinde hareketinin doğal yapı ve civarındaki erişilebilir alternatif yapılar arasında gidiş-gelişlerle resmedildiği statik bir denge yapısıdan ziyade birçok olası yapıdan oluşan bir “denge topluluğu” paradigması ortaya çıktmıştır. Alosterik proteinlerde yüzeyin farklı noktaları arasında bilgi akışının bu topluluğun iç dinamiğinin detaylarında saklı olduğu görüşü hakimdir (Monod vd., 1965; Kern ve Zuiderweg, 2003).

Yukarıdaki bakış açısının bütün proteinlere genelleştirebilirliği, son yıllarda alosterik davranışın sanıldığından çok daha yaygın bir fiziksel mekanizma olduğu düşüncesinin kabul görmesine yol açmıştır (Luque vd., 2002; Gunasekaran vd., 2004; Boehr vd., 2009). Böylece proteinlerde alosterik mekanizmaların ayrı ayrı incelendiği çalışmalar yanında (çeşitli örnekler için, bkz.: Laskowski, 2009) , genel bir fiziksel anlayış oluşturma yönünde girişimler de hız kazanmıştır (Hawkins ve McLeish, 2004; Xing 2007). Alosterik mekanizmaların bilinmesinin önemli bir getirisi de protein hedefli ilaç tasarımında alternatif stratejilere imkan tanımasıdır (Gunasekaran vd., 2004; Christopoulos, 2002). Bu bilgilerin ışığında, denge yapısı civarında

moleküler dinamik benzetim verilerinin analizi ile alosterik etkileşimlerde önemli rol oynayan bölgelerin belirlenmesini hedefleyen bir metodun olumlu sonuç vermesi gerçekçi bir beklentidir (Friere, 2000). Nitekim, proteinin X-ışını kristalografisi veya NMR ile elde edilmiş üç boyutlu yapısından alosterik etkileşimleri tahmin etmeye yönelik farklı yaklaşımlara literatürde rastlanmaktadır (Demerdash, 2009).

Proje kapsamında yaptığımız çalışmalarla genelleştirdiğimiz bir formülasyon çerçevesinde kullandığımız salınım modları analizi (normal mode analysis) tekniği (Case, 1994; Bahar ve Rader, 2005; Ma, 2005), proteinin doğal durumundaki salınımlarını uygun bir koordinat sisteminde incelemeye olanak verir. Örneğin, bu sayede dinamiğin örneklenmesiyle elde edilen ve konformasyonlar uzayında tanımlanan Gaussiyen fonksiyonu düşük boyutlu bir uzaya indirgenebilir ve proteinin büyük ölçekli hareket serbestileri karakterize edilebilir. Bu çizgide sayısız araştırma (örn. Levit vd., 1986; Cui vd., 2004) Case (1994) ile Bahar ve Rader (2005)'in kaynakçalarında bulunabillr. Bu araştırmaların çoğunda protein dinamiği ideal yay ve toplardan oluşan basit bir fiziksel sisteme indirgenir. Ancak, bu analiz sonucunda elde edilen ve dinamiğin kollektif karakterini betimleyen, fiziksel ve biyolojik açıdan en önemli denebilecek 'yavaş' modların özellikle fizyolojik sıcaklıklarda harmonik (Gaussiyen, lineer) olmadığı bilinmektedir (Hayward vd., 1994; Pontiggia vd., 2007; Yogurtcu vd., 2009). Yavaş salınım modlarının salınım soğurma spektroskopisi (Roitberg vd.,1995), boyut düşürme (Harward vd., 1994; Kitao ve Go, 1999) ve hidrasyon etkilerinin protein dinamiğine etkisi (Nakagawa vd., 2008) bağlamında önemi tartışılmıştır. Daha önemlisi, alosterik etkileşimlerde rol oynadığı tahmin edilen molekül içi enerji transferinin gerçekleşebilmesi açısından modların arasında etkileşimlerin varlığının önemi bilinmektedir (Piazza ve Sanejouand, 2009; Leitner, 2008; Moritsugu, 2000).

Bu projede yukarıdaki savın geçerliliği gerçek proteinler üzerinde sistematik olarak sınanmıştır. Bu amaçla kullandığımız yöntemin kuramsal temeli, salınım modlarının harmonik olmayan davranışı ve değişik modlar arasındaki etkileşimlerinin serbest enerjiye katkılarını ayrı ayrı ortaya koyan bir makalede bir süre önce detaylandırılmıştır (Kabakçıoğlu vd., 2010). Yöntem, proteinin doğal yapısı civarındaki salınımlarının (örneğin bir moleküler dinamik benzetim çalışması boyunca) örneklenmesi ile elde edlien olasılık yoğunluk dağılımının analizine dayanır. Proje dahilinde yapılan çalışmalarla yukarıdaki metot daha ileriye taşınmış ve alosterik özellik gösteren değişik proteinlere uygulanmıştır. Bu proteinlerle ilgili literatür aşağıda ayrıca verilmiştir.

Myosin II

Aktine bağlanan ve alosterik davranış gösteren bu motor proteini, hücre hareketi, kas aktivitesi, hücre zarından materyal transferi ve değişik sinyal yollarında aktiftir. Bilinen 35 myosin cinsinden 13'üne insanda rastlanmaktadır (Sweeney ve Houdusse, 2010). Myosin II'nin motor bölgesi proteinin 4 aşamalı katalitik döngüsünün her aşamasında yapısal değişikliğe uğrar. Bu döngü tamamlandığında ATP hidrolizinden elde edilen kimyasal enerji mekanik enerjiye dönüştürülür. Burada yapısına ADP'nin bağlı olduğu 1VOM yapısı (Smith ve Rayment, 1996) baz alınmıştır.

Elde edilen bulguların karşılaştırılmasında kullanılmak üzere, protein yapısı üzerinde bilinen işlevsel bölgeler literatürden derlenmiştir. Bu bölgelerden 'Switch II' ve 'P-Loop' diye bilinenlerinin MgADP bırakma mekanizmasında görev aldığı bilinmektedir (Smith ve Rayment, 1996). Ayrıca motor bölgesinin karakteristik kapanma hareketinde 'Switch I' bölgesinin rol oynadığı ve aktin bağlanma bölgesinin açılmasını tetiklediği bilinmektedir (Reubold vd., 2003). Aktin bağlayan cep 'Myopathy loop' ve 'Loop-2' bölgeleridir. 'Loop-2' bölgesinin negative yüklü aktin bölgeleriyle etkileştiği tahmin edilmektedir (Spudich, 1994). Ayrıca, 411-440 numaralı rezidülerin yer aldığı ve uzun helix yapısının sonundaki kıvrım bölgesinin Myopathy loop ile aktin arasındaki bağlanmada rol oynadığı saptanmıştır (Malnasi-Csizmadia vd., 2005). Ek olarak, aşağıda listelediğimiz çalışmalarda bazı amino asitlerin mutasyonu sonrasında fonksiyonel değişikliklerin gözlendiği rapor edilmiştir:

Tablo 1. Myosin II'nin literatürde bulunan ve işlev açısından önemli olduğu gözlenmiş olan amino asitleri ve ilgili referanslar.

N483, F487, I499, F506, L508, I687, F692, F745	Tsiavaliaris vd. (2002)	D403, V405	Onishi ve Morales (2002)
N464, C470,N472,Y473, N475, F481, E746	Ruppel ve Spudich (1996)	Y494, W501	Tsiavaliaris vd., (2002); Patterson ve Spudich (1996)
D590, P591, L592, Q593	Sasaki vd. (2000)	S181	Tang vd. (2007)
E467, E586,G624, G740	Patterson ve Spudich (1996)	S236	Frye (2010)
N233, S237, R238	Shimada (1997)	E459	Ruppel ve Spudich (1996); Sasaki vd. (1998)
I499, F692, R738	Sasaki vd. (2003)	F482	Ito vd. (2007); Tang vd. (2007)
D454, G457, F458	Sasaki vd. (1998)	G680	Ito vd. (2007); Tang vd. (2007); Patterson vd. (1997,1998)
E531, P536, R562	Giese ve Spudich (1997)	G691	Patterson vd. (1997,1998)

Glükokortikoid reseptörler

Glukokortioid reseptörler, neredeyse bütün hücreler tarafından üretilen ve canlı iç dengesinden metabolik aktivitelere pek çok biyolojik olayı düzenleyen proteinlerdir. Bu steroid hormonu ailesi vücutta enflemasyon, strese yanıt, büyüme ve hücre ölümü süreçlerinin düzenlenmesinde rol alır (Kino vd., 2009; Nicolaides vd., 2010; Chrousos, 2004; O'Malley vd., 1992; Zhou ve Cidlowski, 2005; Barnes, 1998; Sapolsky vd., 2000). GR ayrıca ligand bağlı haliyle sitoplazmadan hücre çekirdeğine transfer olarak transkripsyonu da aktive edebilir (Carson vd., 2014).

2001 yılı itibariyle yapılan bir dizi çalışma, glukokortikoid reseptörlerin (GR) evrimsel gelişimine moleküler açıdan açıklama getirmiştir. Biyobilişimsel, biyofiziksel ve biyokimyasal incelemeler sonucunda, GR ve mineralkortikoid reseptör (MR) proteinlerinin 450 milyon yıl önceki ortak atası olan AncCR proteinin amino asit dizilimi ve üç boyutlu kristal yapısı belirlenmiş, ligand bağlanma işlevi incelenmiştir. Aynı çalışmalar sonucunda, AncCR'nin yanısıra GR proteinlerinin kıkırdaklı balıklardaki atası olan AncGR1 ile insanın da dahil olduğu dört uzuvlular sınıfında bulunan GR proteinin atasal formu AncGR2 proteinlerinin de amino asit dizilimleri belirlenmiş, ligand bağlanma işlevleri üzerine çalışılmıştır (Bridgham vd., 2009; Ortlund vd., 2007; Harms ve Thornton, 2014; Glembo vd., 2012).

GR sadece kortizol ile bağ yaparken (Bentley, 1998), yakın analoğu olan mineralokortikoid reseptör (MR) ek olarak aldosteron ve 11-deoksikortikosteron (DOC) ile de bağ yapar (Yang ve Young, 2009). Aynı fark insan GR proteinin evrimsel ataları olan AncGR1 (bazı balıklar) ve AncGR2 (omurgalılar) için de geçerlidir (Bridgham vd., 2009; Ortlund vd., 2007). AncGR1 ve AncGR2 arasında 36 mutasyona uğramış amino asit bulunmasına rağmen yapısal farkın 1 ̊A RMSD'den küçük olması bu durumu daha da ilginç kılmaktadır (Glembo vd., 2012). Bu 36 mutasyon arasından farklı türler arasında hiç farklılık göstermeyen S106P ve L111Q (X grubu) mutasyonlarının (conserved mutations) kortizol seçiciliğinin artışınını sağlamakta yeterli olduğu deneysel olarak gözlenmiştir. S106P mutasyonu ligand bağlayan cebin mimarisini değiştirerek L111'in liganda daha yakın konuşlanmasını sağlar. Öte yandan, L111Q mutasyonunun işlevi mekanikten çok biyokimyasaldır, zira 111Q ve kortizol arasında fazladan bir hidrojen bağı oluşmasına neden olur. Bu bağ diğer liganlar olan DOC ve aldosteronda oluşmaz. Ek mutasyonlar, L29M, F98I and S212ð (Y grubu) DOC ve aldosterona bağlanma yatkınlığını azaltırlar, ancak tek başlarına proteinin etrafındaki hidrojen bağı ağını bozdukları için proteinin bir baska işlevi olan DNA transkripsiyonunu destabilize ederler. Yapının stabilize olması ve transkripsiyon işlevinin varlığı için iki ek mutasyon daha, N26T and Q105L (Z grubu) gerekir. Sonuç olarak AncGR1+X+Y+Z fenotip olarak AncGR2'ye denktir. Bu altı mutasyonun toplam 36 mutasyon arasından deneysel olarak işlevsel

önemleri açısından öne çıkması, adı geçen glükokortikoid reseptör proteinlerin geliştirdiğimiz yöntemi sınamak için uygunluklarına işaret etmiştir.

Tirozin Kinaz (ACK1) proteini

ACK1 reseptör olmayan bir tirozin kinazdır var farklı tirozin kinaz reseptörlere bağlanır. ACK1'in üyesi olduğu nRTK kinaz ailesi sitoplazmik enzimlerdir. Görevleri ATP'den tirozine fosfat grubunun aktarılmasını katalize etmektir. Bu enzimler başka enzimleri fosforilasyon yoluyla aktivite veya pasifize ederek hücrenin büyümesi, bölünmesi, farklılaşması, tutunması ve ölümü gibi pek çok süreci düzenler (Neet ve Hunter, 1996; Manning vd., 2002).

İnsanlarda 3q29 kromozomu üzerinde bulunan ACK1'ın pek çok kanser türünde üretiminin arttığı, aktive edildiği veya mutasyona uğradığı gözlenmiştir. Regülasyonu bozulan kinazın onkojenik olduğu, aktivasyonunun kanserin metastaz aşamasıyla korelayson gösterdiği, bastırılmasının ise hücre bölünmesini durdurarak hücre ölümünü tetiklediği bilinmektedir. Özellikle prostat kanserinde ACK1 aktivasyonunun tümör bastırıcı protein Wwox degredasyonuna neden olduğu, pankreas kanserinde ise AKT proteinin fosforile ederek kanserli hücrenin dayanıklılığını arttırdığı gözlenmiştir (Mahajan ve Mahajan, 2013).

3 YÖNTEM

Bu araştırmada alosterik proteinlerin işlevsel açıdan önemli rol oynayan bölgelerini belirlemek amacıyla geliştirip kullandığımız yöntem üç aşamalıdır. Birinci aşamada, proteinin PDB veri tabanından elde edilen olan üç boyutlu yapısı temel alınarak NAMD (Myosin II proteini için) ve Amber (diğer proteinler için) benzetim ortamında molekülün su içinde standart moleküler dinamik (MD) benzetimleri gerçekleştirilmiştir. Projenin başlangıç aşamasının hemen sonrasında Amber paketinde karar kılmamızı sağlayan ön karşılaştırma çalışmaları aşağıda detaylandırılmıştır. Benzetim boyunca proteinin yapısı toplam yörüngenin uzunluğuna göre 0.5 ps ile 10 ps arasında değişen aralıklarla örneklenmiş ve çok boyutlu konfigürasyon uzayındaki denge civarı olasılık yoğunluğu fonksiyonu elde edilmiştir. İkinci aşama, elde ettiğimiz bu dağılım fonksiyonundan mod-etkileşimlerine dair bilgi elde edilmesidir. Proje başlangıcı öncesinde ortaya attığımız (Kabakçıoğlu vd., 2010) ve bu projede son haline getirdiğimiz, aşağıda ana hatları verilen kuramsal alt yapı yardımıyla gerçekleştirdik. İkinci aşamadaki analizlerin sonucunda proteinin salınım modlarının bütün olası ikili etkileşimleri için bu modlar arasındaki enerji veya bilgi iletiminin bir ölçütü elde

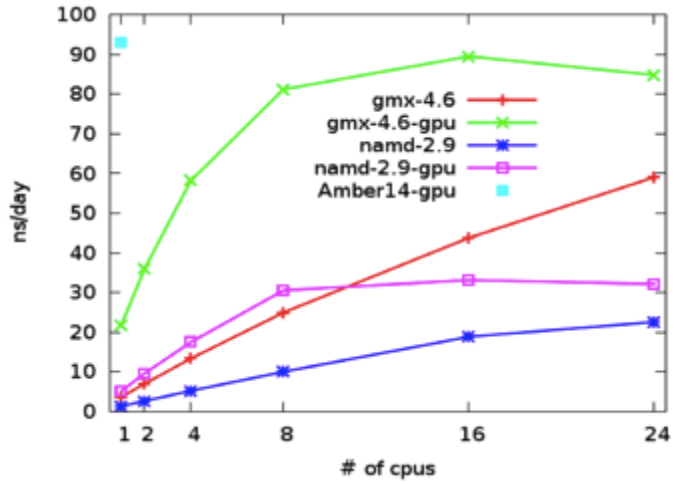
edilmiştir. Pratik olarak bu bilgi bize birbirleriyle kuvvetle etkişen salınım modlarının hangileri olduğu hakkında bilgi verir. Üçüncü aşama ise mod etkileşimlerinde önemli rol oynayan amino asitlerin belirlenmesi ve bu amino asitlerin proteinin işlevine dair literatürde var olan verilerle karşılaştırılmasıdır. Bu kritik aşamada, kullandığımız metodun literatürdeki deneysel verilerle tutarlılığı sınanmış ve elde edilen pozitif sonuçlar uluslararası makalelerde yayımlanmıştır.

3.1 Moleküler dinamik benzetim çalışmaları

3.1.1 Hesaplama altyapısının oluşturulması

İlk olarak benzetim çalışmaları için gerekli hesaplama alt yapısı oluşturulmuştur. Bu amaçla proje bütçesiyle Nvidia K20 GPU işlemcileri içeren HP SL250s sunucular satın alındı. Satın alma ve makinelerin kuruma ulaştırılması işlemleri dolar kurunda o sırada yaşanan hızlı artış nedeniyle gecikmeli olarak gerçekleştiği için ilk aşamada grubumuzda var olan hesaplama alt yapısını kullanarak NAMD paket programı yardımıyla benzetim çalışmalarımıza başladık. İlk makalemizde kullandığımız verileri NAMD bu şekilde elde ettik. Yeni sunucuların elimize ulaşması ve kurulumunun hemen sonrasında, deneme ve performans belirleme amaçlı benzetimler koşturuldu. Yaptığımız başarım ölçümleri ile önde gelen moleküler dinamik benzetim programları olan NAMD, GROMACS ve Amber'i elimizdeki bilgisayarlar üzerinde sınadık. Bunlar arasından grafik işlemcilerin (GPU) işlem güçlerini en verimli kullanabilenin Amber olduğunu gözlemledik (Şekil 1). Sadece bir merkezi işlemci (CPU) ve bir GPU kullanarak en yakın rakibinin 24 CPU ve 1 GPU kullanarak eriştiği başarımı yakalayabilen Amber14, grafik işlemciler ile benzetimleri çalıştırmaya devam ederken geriye kalan CPU işlem gücünü analiz işleri için kullanabilmemize olanak sağladı. Böylece protein simülasyonlarını bu amaçla uluslararası pek çok grup tarafından da protein çalışmalarında sıklıkla kullanılan Amber programının GPU destekli uygulaması olan pmemd.cuda ile yapmakta karar kıldık.

Seçtiğimiz proteinlerin moleküler dinamik benzetimleri su içerisinde çözünmüş halde ve fizyolojik iyon konsantrasyonlarında yapılmıştır. Benzetimlerimizde özellikle protein simülasyonları için geliştirilmiş ve uluslararası bilimsel araştırmacılar arasında kabul görmüş olan kuvvet parametreleri kullanılmış (NAMD benzetimlerinde Charmm27, Amber paketinde ise paketin kendi güncel Amber99 kuvvet parametreleri), sıcaklık Langevin hareket denklemi ile 310 Kelvin'de ve basınç da Monte Carlo hamleleri ile 1 bar değerinde kontrol edilerek sabit basınç-sıcaklık (NPT) toplulukları örneklenmiştir.



Şekil 1. Farklı benzetim programlarının (Amber, Gromacs, NAMD) kullanılan CPU sayısına göre (GPU'lu ve GPU'suz olmak üzere) performans karşılaştırması. Amber14 (dikey eksen yakınındaki mavi nokta), tek GPU ve tek CPU ile diğerlerinden daha yüksek bir performans gösterdi.

Benzetimler esnasında su atomları ve iyonların pozisyonları (yerden tasarruf etmek için) kaydedilmemiş, ancak protein ve varsa ligandlara ait olan bütün parçacıkların yörüngeleri 1 veya 10 pikosaniyede bir (ilk NAMD benzetimlerinde ise 50 fs aralıkla) kaydedilmiştir. Elimizdeki işlem gücü ile, proteinin boyutuna göre değişmek ile beraber, orta boyutta proteinler için günde 10 nanosaniye mertebesinde benzetimler yapılabilmiştir. Benzetimlerde sistemin denge noktasına gelip gelmediği monitor edilerek başlangıçtaki uygun bir zaman aralığından (tipik olarak birkaç nanosaniye) alınmış örnekler sonraki analizlerde dikkate alınmamıştır.

Yörüngelerin işlenmesi :

İkili kütük (binary) formatta kaydettiğimiz yörüngeler VMD adlı programla görsel olarak incelenip gerekli ön işlemlerden geçirilerek projede kullandığımız mod analizi metodunun yapılmasını kolaylaştıracak formatta kaydedilmiştir. Bu aşamada yapılan işlemler özetle şunlardır :

1. Benzetim verisinin içinden sadece alpha karbonlarının pozisyonları kullanılmaktadır. Protein dinamiklerini temsil etmek üzere kullandığımız veri bu durumda sadece alfa karbonlarından ibaret bir zincirin yörüngesidir.

2. Bu zincirler öncelikle VMD programının içerisinde bulunan 'RMSD Trajectory Analysis Tool' yardımıyla hizalanmıştır. Bu hizalanma sistemden öteleme (translation) ve dönme (rotation)

bileşenlerini çıkarır. Hizalı sistemin kovaryans matrisi karakteristik olarak 0 olan 6 adet özdeğere sahiptir.

3. Hizalanmış olan alfa karbonlarının yörüngeleri, analizin geri kalanında kullanılmak üzere saltmetin (plaintext) olarak kaydedilmiştir.

3.2 Mod etkileşimlerinin olasılık dağılımına katkısının hesaplanması

Gaussiyen sistem:

En basit düzeyde, proteinin salınımları birbirlerine ideal yaylarla bağlı birimlerin, örneğin C-α atomlarının, hareketi şeklinde modellenebilir. Bu Gaussiyen model tamamen ikinci dereceden terimlerden oluşan bir Hamiltonyene sahip olduğu için, uygun bir lineer dönüşüm ile sistemin öz vektörlerine ulaşılabilir. Bu öz vektörler, sistemin birbiriyle etkileşmeyen doğal salınım modlarına (normal modes) karşılık gelirler. Her mod için verilen sıcaklıktaki genlik dağılımı Gaussiyen olmalıdır. C-α atom poziyonlarının olasılık yoğunluğu fonksiyonu, yukarıdaki genlik dağılımlarının çarpımından elde edilen birleşik (joint) dağılım fonksiyonunun ters dönüşüm altındaki görüntüsüdür:

C-α atom pozisyonlarının denge değerlerinden sapmalarını Δ**R** ile gösterirsek öz vektörleri veren koordinat dönüşümü

$$\Gamma = \langle \Delta\mathbf{R}\Delta\mathbf{R}^T \rangle$$

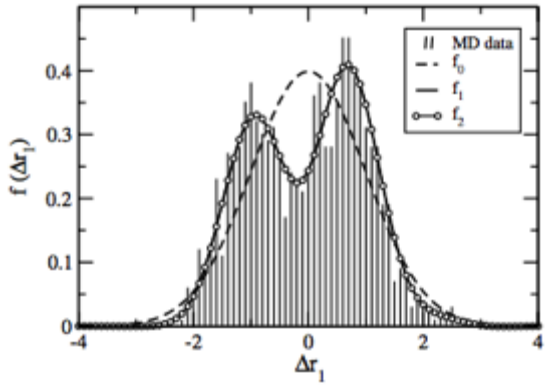
ile verilir. Karşılık gelen öz vektör genlikleri $\Delta\mathbf{r} = \Gamma^{-1/2}\Delta\mathbf{R}$, genlikler için olasılık yoğunluk fonksiyonu ise standart sapmaları transformasyon altında normalize edildiği için

$$f_0(\Delta\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{(2\pi)^{3N}}} \mathrm{e}^{-\sum_i \Delta r_i^2/2}$$

şekline yazılabilir. Burada N proteindeki aminoasit sayısıdır. Bu fonksiyon, transform uzayında küresel, Δ**R** uzayında ise eksenleri koordinat sistemi ile örtüşmeyen elipsoidal bir dağılım verir. Ancak gerçek proteinlerden elde edilen dağılımlarda, Γ ile ulaşılan modlardan özellikle en büyük öz değerlere karşılık gelen kollektif salınım modlarının Gaussiyen genlik dağılımına sahip olmadıkları eskiden beri biliniyor.

Gaussiyen ötesi sistem:

Aşağıda Crambin proteininin analizinden elde edilmiş olan en büyük öz değerli moda ait genlik dağılımı gösterilmiştir (Kabakçıoğlu vd., 2010):



Şekil 2. Düşey çizgiler ile gösterilen moleküler dinamik verisine en iyi uyan Gaussiyen dağılım kesikli çizgiyle gösterilmiştir. Veri ile uyumlu olan diğer (kesiksiz ve daireli) eğriler lineer olmayan etkileri dikkate alan modelden üretilmiştir.

Buradan da görüldüğü üzere, gerçek proteinlerdeki dinamik davranışı modellemek için basit yay modellerinden öteye gitmek gerekir. Alosterik davranışa ait bilgileri de burada saklıdır. Bu amaçla MD ile elde edilen dağılım fonksiyonunu transform ($\Delta\mathbf{r}$) uzayında daha iyi tanımlayan bir açılım kullanışmıştır. Genel olarak Hermite tensör polinomları ile ifade edebileceğimiz bu açılım, Kabakçıoğlu vd. (2010) tarafından yapılan bir gözlem yardımıyla basitleştirilerek aşağıdaki gibi sadece tek değişkenli Hermite polinomları cinsinden ifade edilebilir:

$$f(\Delta\mathbf{r}) = \frac{1}{\sqrt{(2\pi)^{3N}}} e^{-\sum_i \Delta r_i^2/2} \left[1 + \sum_i \sum_{v=3}^{\infty} \frac{1}{v!} \langle H_v(\Delta r_i) \rangle \times H_v(\Delta r_i) + \sum_{i \neq j} \sum_{v=3}^{\infty} \frac{1}{v!} \sum_{p=1}^{v-1} \binom{v}{p} \langle H_p(\Delta r_i) H_{v-p}(\Delta r_j) \rangle \right.$$
$$\left. \times H_p(\Delta r_i) H_{v-p}(\Delta r_j) + \sum_{i \neq j \neq k} \cdots \right]$$

Hermite polinomlarının baz fonksiyon kümesi olarak seçilmesinin nedeni, polinom çiftleri arasındaki diklik bağıntısının Gaussiyen kerneli içermesidir. Bunun faydası ise, yukarıdaki açılım herhangi bir MD verisi için kullanılmadan önce hesaplanması gereken katsayıların eldeki olasılık dağılımı üzerinde kolayca hesaplayabildiğimiz birer ortalama (yukarıda '<' ve '>' işaretleri arasında gösterilen değerler) ile verilmeleridir. Prensipte böyle sonsuz tane terim olmasına rağmen, pratik olarak bunlardan küçük dereceli ve az sayıda Hermite polinomunun çarpımına karşılık gelen birkaç katsayıyı hesaplamak yeterlidir. Proje çalışmamızda gerek görülen en yüksek Hermite derecesi $v_{\max} = 32$ oldu.

Yukarıdaki son denklemdeki açılımın ilk terimi, daha önce açıklanan ve yukarıda f_0 ile verilen Gaussiyen modele karşılık gelir. Kalan terimlerin hepsi genel olarak sistemin Gaussiyen ötesi karakteriyle ilgilidir, ancak tamamı mod etkileşimlerinden kaynaklı değildir. Bu ayrımı netleştirmek esasen projede geliştirilen metodun kuramsal temelini oluşturmaktadır. Bu amaçla önce Gaussiyen ötesi karakteri olan ancak mod etkileşimi içermeyen en genel dağılımını fonksiyonunu oluşturmamız gerekir. Bu dağılım aşağıda verilmiştir:

$$f_1(\mathbf{\Delta r}) = \frac{1}{\sqrt{(2\pi)^N}} e^{-\sum_i \Delta r_i^2/2} \prod_i \left[1 + \sum_i \sum_{\nu=3}^{\nu_{max}} c_\nu^i H_\nu(\Delta r_i)\right]$$

Dağılımın mod genliklerinde çarpımlara ayrılabilir bir fonksiyon olması her modun diğerlerinden bağımsız olduğunu ifade eder. Ancak her salınım modu hala Gaussiyen ötesi davranış gösterebilir. Örneğin aşağıdaki tür bir Hamiltonyen altında devinen bir sistemden yukarıdaki gibi bir dağılım fonksiyonu elde edilebilir:

$$\mathcal{H}_m = \frac{p_m^2}{2\mu_m} + \frac{1}{2}k_m(\delta r_m)^2 + \sum_{n>2} \alpha_{n,m}(\delta r_m)^n$$

Yukarıda tanımlanan c_ν^i katsayılarının hesaplanması Hermite polinomlarının diklik bağıntısının kullanılması ile mümkündür:

$$c_\nu^i = \frac{1}{\nu!} \int f(\Delta r_i) H_\nu(r_i)$$

Bu analizler ortalama boyda bir protein için oldukça hızlı gerçekleştirilebilmiştir. Ancak mod etkileşimlerini de içeren $f(\Delta r)$ için verilen genel ifadede daha ileri mertebeden terimlerin katsayılarının hızlı biçimde hesaplanabilmesi, optimize edilmiş algoritmalar ve kullandığımız yüksek erişimli makineler sayesinde mümkün olmuştur.

Mod etkileşimlerinin MD ile elde edilen dağılıma katkısını $f(\Delta r)$ ile $f_1(\Delta r)$ arasındaki fark ile ölçtük. Bu fark değişik biçimlerde hesaplanabilir. Örneğin sık kullanılan bir karşılaştırma ölçüsü Kullback-Leibler (KL) uzaklığıdır. İki olasılık yoğunluğu fonksiyonu p(x) ve q(x) arasındaki KL uzaklığı

$$d_{kl}(p,q) = \int_{-\infty}^{\infty} p(x) \ln\left[\frac{p(x)}{q(x)}\right] dx$$

ile verilir. Myosin üzerine çalışmamızda bu ölçütü kullandık. GR proteinleri ve ACK1 üzerindeki analizlerimizde ise $f(\Delta r)$ ile $f_1(\Delta r)$ arasındaki farkı nicelendirmek için KL uzaklığının iki dağılıma göre simetrik hale getirildiği Jensen-Shannon mesafesini (Manning

ve Shutz, 1999) kullanmayı daha uygun bulduk. Bunun nedeni, yetersiz örnekleme sonucu yukarıdaki q(x) fonksiyonunun sıfır olduğu ancak p(x)'in sıfır olmadığı durumlarda sorun yaşanmamasıdır. Yukarıdaki integralin sayısal olarak hesaplanabilmesi için elimizdeki süreksiz veriyi önce sürekli bir fonksiyon olarak ifade etmemiz gerektiğinden, aşağıda verilen KDE (Kernel Densiti Estimator) metodu ile veriyle en uyumlu fonksiyonu bulduk:

$$\hat{p}_h(x) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^{n} K\left(\frac{x - x_i}{h}\right)$$

Burada K Gaussiyen olarak seçtiğimiz kernel fonksiyonu, n moleküler dinamik benzetimlerinden elde ettiğimiz örnek sayısı, h ise bant genişliği parametresidir.

3.3 Mod etkileşimlerinin öne çıkardığı aminoasitlerin belirlenmesi

İlgilenilen proteinin zaman içinde gözlemlendiği konfigürasyonlar üzerinde tanımlanan dağılım fonksiyonuna mod etkileşimlerinin katkısını bir sayıya indirgemenin projedeki amacımıza katkısı da sınırlı olacaktır. Asıl ihtiyacımız olan, yukarıdaki dağılımların farkından yola çıkarak protein yüzeyindeki fonksiyonel bölgeler veya enerji transferinde kritik rol oynayan amino asitler (hot spots) gibi biyolojik açıdan anlamlı bilgilere ulaşabilmektir. Bu amaçla seçilen bir amino asitin mod etkileşimlerine etkisini tanımlamak için önce ikinci aşamada elde ettiğimiz dağılım fonksiyonlarında değişken değiştirerek dağılımı C-α carbon atomlarının koordinatları cinsinden ifade ettik. Daha sonra bu dağılımların seçilen bir amino asitin C-α atomunun koordinat eksenlerindeki izdüşümlerini karşılaştırarak üç eksen üzerinden elde edilen değerleri topladık:

$$S_i^{mc} = \sum_{\alpha=x,y,z} d_{KL}[p(\mathbf{\Delta R_{i,\alpha}}) \| p_1(\mathbf{\Delta R_{i,\alpha}})]$$

$$S_i^{ma} = \sum_{\alpha=x,y,z} d_{KL}[p_1(\mathbf{\Delta R_{i,\alpha}}) \| p_0(\mathbf{\Delta R_{i,\alpha}})]$$

Yukarıdaki ifadede 'mc' mod etkileşimine, 'ma' ise mod etkileşimi ile ilgili olmayan harmonik ötesi etkilere (marginal anharmonicity) karşılık gelmektedir. S_i^{mc} (mod etkilişimi skoru) analizin son çıktısıdır ve i'nci amino asitin mod etkileşimlerinde rolünün bir ölçütüdür. Bu projede farklı proteinlerin her aminoasiti için bu değer hesaplanmış ve işlevsel açıdan önemli olduğu deneysel olarak kanıtlanmış bölgelerin tutarlı biçimde yüksek mod etkileşimi skoruna sahip olduğu gösterilmiştir.

Yukarıda detaylandırdığımız mod etkileşimi analizini Julia programlama dilinde yazılan bilgisayar kodları ile gerçekleştirdik. Proje süresince çalışılan proteinlerin (Myosin II: 1VOM, AncCR: 2Q3Y, AncGR1: 3RY9, AncGR2:3GN8, İnsan GR: 1M2Z, Tirozin Kinaz: ACK1) yapısal bilgileri PDB veri tabanından alınmıştır. Yöntemlerin proteinden proteine değişen ve bulgularla şekillenen detaylarını bir sonraki bölümde yeri geldikçe vermek daha uygun olacaktır.

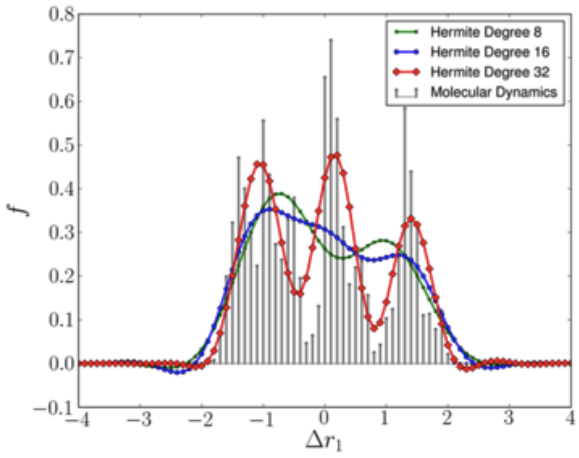
4 BULGULAR

Proje kapsamında altı farklı protein üzerinde mod etkileşim analizi uygulanmıştır. Analiz sonuçları, literatürde ilgili proteinin işlevi açısından önem arz ettiği deneysel olarak gösterilmiş olan bölgelerle karşılaştırılmıştır. Aşağıda verilen bulgularımız karşılaştırma sonuçlarının genellikle olumlu olduğuna işaret etmektedir.

4.1 Myosin II

4.1.1 Myosin II proteininde salınım modları

730 amino asit içeren bu proteinin ve incelediğimiz 1VOM isimli yapısına bağlanan ligandın (ATP) atomik koordinat bilgileri PDB veri tabanından alınmıştır. Toplam 10 ns süreli MD benzetiminin ilk 2 ns'lik kısmının dengeye ulaşma süreci olduğu gözlenerek analize katılmamıştır.



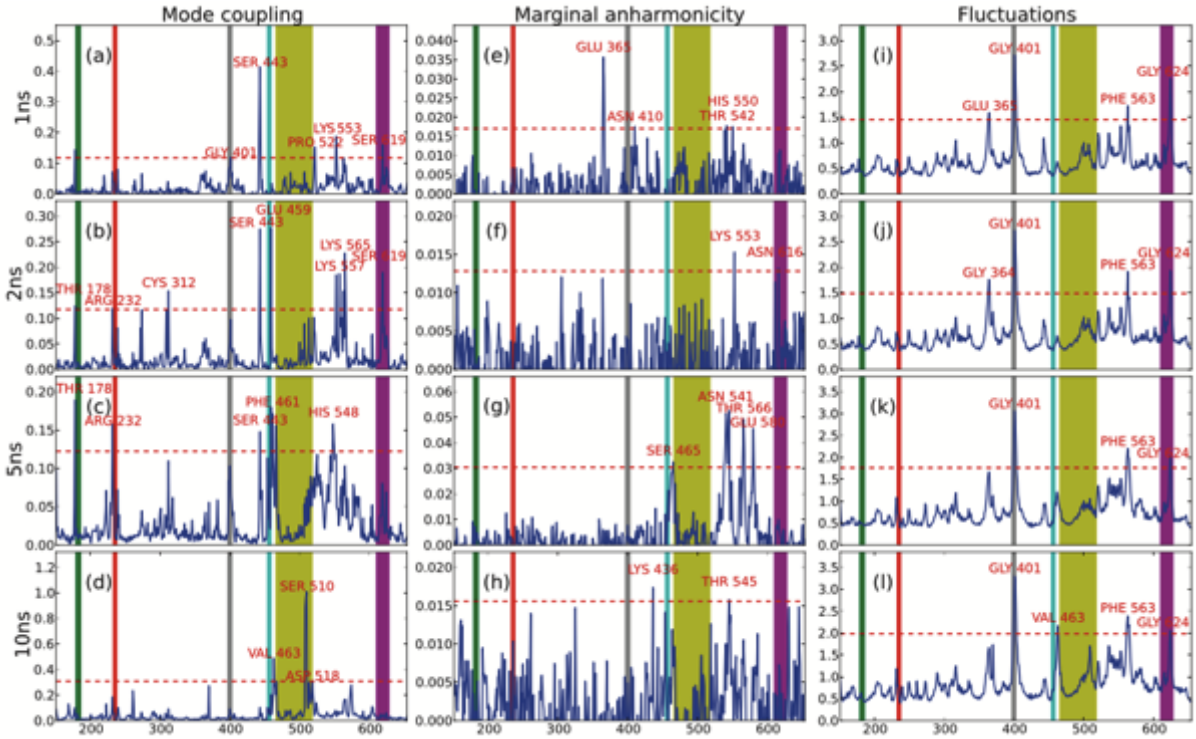
Şekil 3. Maksimum Hermite polinom derecesinin 8, 16 ve 32 olarak seçildiği durumlarda düşey çizgiler ile gösterilen moleküler dinamik verisine en iyi uyan marjinal dağılımlar en yavaş salınım modu ekseni üzerinde gösterilmiştir.

8 ns'lik yörünge üzerinde 4000 farklı örnekleme yapılmış ve bu örneklerden bir önceki bölümde verilen Λ kovaryans matrisi hesaplanmıştır. Bu matrisin özdeğer ve özvektörleri kullanılarak sistemin sıfırdan farklı özdeğeri olan 2184 salınım modu belirlenmiş ve mod

eksenleri boyunca örneklediğimiz dağılımın tek boyutlu izdüşümleri elde edilmiştir. Bu izdüşüm fonksiyonlarının çarpımı bize 'marjinal harmonik ötesi' etkileri içeren ve yukarıda f_1 olarak adlandırdığımız dağılımı verir. Şekil 3'te en yavaş mod eksenindeki marjinal dağılım verilmiştir.

4.1.2 Myosin II proteini üzerinde mod etkileşim analizi sonuçları

Yöntem bölümünde verilmiş olan analiz bu protein için 1, 2, 5 ve 10 ns zaman pencereleri içinde ayrı ayrı tekrarlanmış ve elde ettiğimiz sonuçlar Şekil 4'te özetlenmiştir. Şekil 4'ün her sütunu amino asitler üstünde hesaplanan farklı bir niceliği göstermektedir: (1) S_i^{mc}, mod etkileşim skoru; (2) S_i^{ma}, marjinal harmonik ötesi etki skoru; (3) ortalama C- α atom salınım skoru (B-faktörü diye de bilinir).



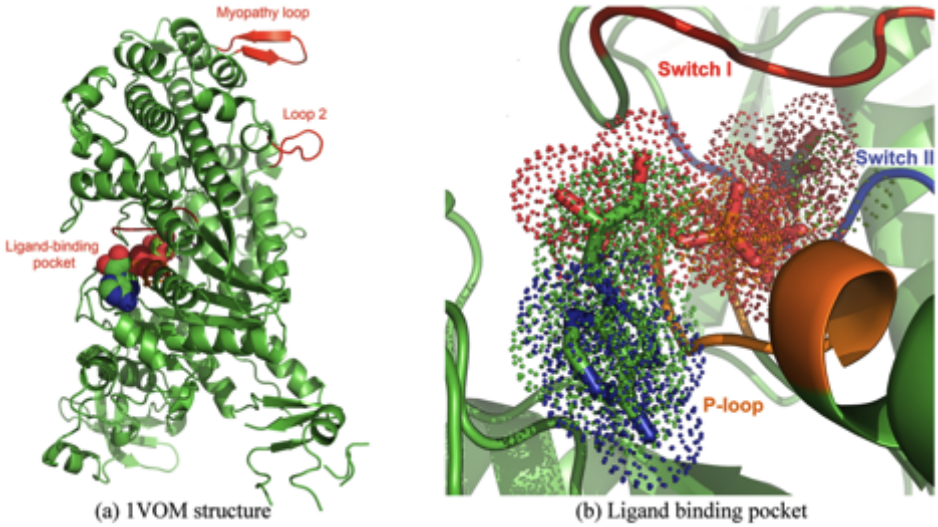
Şekil 4. Myosin II (1VOM) proteini üzerinde moleküler dinamik benzetiminin dengeye ulaştıktan sonraki ilk 1, 2, 5 ve 10 ns'lik yörüngesi üzerinde gerçekleştirilen mod etkileşim analizinden elde edilen değişik amino asit skorlarının karşılaştırılması. Renkli bölgeler işlevsel önemi olan bölgelerdir ve sırayla "P-loop" (yeşil), "Switch-I" (kırmızı), "Myopathy loop" (gri), "Switch-II" (turkuaz), "relay helix" (sarı) ve "Loop-2" (mor) olarak adlandırılırlar.

Aynı şekilde fonksiyonel açıdan önemli bölgeler farklı renkli sütunlarla işaretlenmiştir. Şekilden görülebileceği gibi, mod etkileşim skoru renklendirilmiş bölgelerde belirgin artış

gösterirken, B-faktörü ve marjinal harmonik ötesi etki skoru hem amino asitler arasında daha az seçicidir hem de renklendirilmiş işlevsel bölgeler ile daha az korelasyon göstermektedir.

Şekil 4'ün ilk iki satırındaki düşey eksenlerin sayısal değerlerini karşılaştırdığımızda, amino asitlerin salınımlarında mod etkileşimlerinden gelen etkilerin marjinal harmonik ötesi etkilere kıyasla çok daha baskın olduğu gözlenmektedir. Bir başka deyişle, sistemin dinamik davranışına harmonik ötesi bu iki farklı katkıdan mod etkileşimleri proteinin konfigürasyon uzayındaki olasılık dağılımını öncelikle biçimlendiren etkidir. Bu gözlemle tutarlı olarak, amino asitler üzerinde sadece mod etkileşimlerinden üretilen önem sıralaması mutasyon altında fonkisyon değişim verileri ile tutarlılık göstermiştir (sonraki bölüm).

Şekil 4'te renkli sütunlarla gösterilen işlevsel bölgelerin protein yapısı üzerindeki konumları Şekil 5'te verilmiştir.

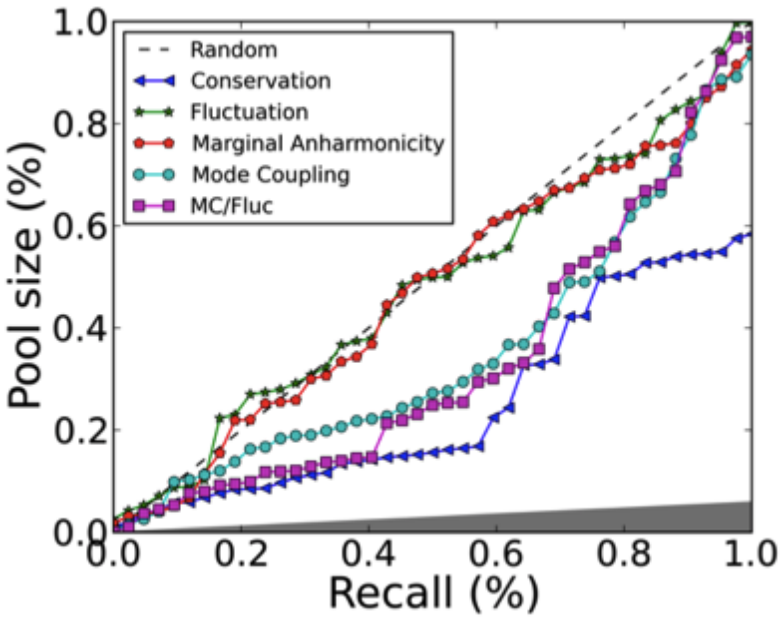


Şekil 5. Myosin II'nin DNA ve ATP'ye bağlanmasında rol oynayan bölgelerin yapı üzerinde konumları.

Şekil 4'te birinci sütun daha detaylı incelendiğinde, ligand bağlanma cebinde benzetimin sadece ilk yarısında artan bir aktivite profili görülmektedir. Buna karşılık, ikinci yarıda mod etkileşim etkilerinin yoğun olduğu bölgenin ligand bağlanma cebinin aktine tutunan bölgeyle mekanik iletişimini sağlanan "relay helix"in uçlarında olduğu gözlenebilir. Farklı zaman dilimlerinde mod etkileşim aktivitesinin protein içinde bu biçimde yer değiştirmesi, alosterik etkileşmeler için gerekli olan salınımlar-arası enerji transferi ile beslenen karmaşık bir bilgi aktarım mekanizmasına işaret ediyor olabilir.

Yine Şekil 4'teki bazı yüksek mod etkileşimi gösteren bölgeler (örn., Ser-443) işaretlenmiş bölgelerin dışına düşmektedir. Ancak bu amino asitin yer aldığı 411-440 numaralı amino asitlerin oluşturduğu uzun sarmal (helix) bölgesinin sonundaki kıvrımın "Myopathy loop" ile aktin arasındaki bağlanmayı tetiklediği bilinmektedir (Malnasi-Csizmadia vd., 2005).

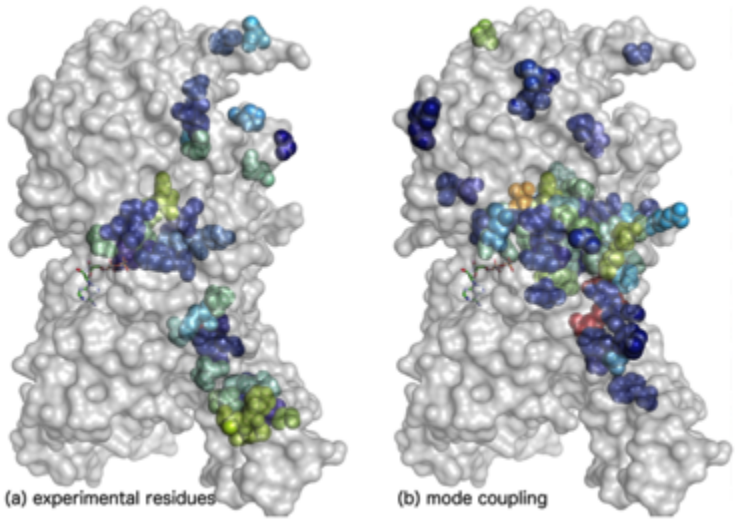
Benzer biçimde başka yüksek mod etkileşim skoruna sahip bölgelerin de buna benzer gözden kaçabilecek önemli bölgelerle örtüşebileceği olasılığını gözardı etmemek için detaylı bir literature taraması sonrasında daha yüksek çözünürlükte bir analiz gerçekleştirdik. Tablo 1'de verilen ve Myosin II'de hangi amino asitlerin işlevsel önemi olduğunu (çoğunlukla mutasyon sonunda fonksiyon yitimi yoluyla) inceleyen bulabildiğimiz çalışmalardan 43 amino asit içeren bir "hedef kümesi" oluşturduk. Daha sonra bu hedef kümesinin mod etkileşim skorlarının ortalamadan yukarıda olup olmadığını sorguladık. Bu amaçla kullandığımız yöntem "recall analysis" olarak adlandırır ve özetle, kullanılan skor ile sıralanmış amino asit listesinin tepedeki belli bir yüzdelik diliminde (y ekseni) hedef kümesinin hangi oranda temsil edildiğini (x ekseni) sorgular. Skor metodu ile hedef kümesi arasında bir ilişki yoksa, bu ilişkinin x=y doğrusu üzerinde olması beklenir. Bu doğrunun belirgin olarak altında kalan bir eğri, hedef kümesinin istatistiksel olarak yüksek skora sahip olduğunu, yani bu nicelendirme metodunun hedef kümesinin tahmininde kullanılabileceğin gösterir.



Şekil 6. Kullandığımız üç farklı skor atama metodunun deneysel olarak işlevsel önemi olduğu gösterilmiş 43 amino asit ile tutarlılığı. Köşegen çizgisinin altındaki eğriler daha tutarlı skor atama yöntemlerine işaret etmektedir. Karşılaştırma için, burada kullandığımız yöntemlere amino asitlerin farklı türler arasında hangi oranda değişiklik gösterdiğini ölçen korunum skoru (conservation score) da eklenmiştir.

Şekil 6, Şekil 4'ün sütunlarında verilen üç farklı skor için bu analizin sonucunu göstermektedir. Marjinal harmonik ötesi etkiler ve B-faktörleri ile 46 amino asitten oluşan hedef kümesi arasında bir korelasyon görülmemiş, mod etkileşim skorunun (iki farklı biçimde normalize edilmiştir) ise fonksiyonel önemi olan amino asitleri tahmin kapasitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Ek olarak amino asit korunum skoru da karşılaştırma amacıyla aynı şekle eklenmiştir ve hedef kümesi ile diğerlerinin hepsinden daha iyi korelasyona sahiptir. Ancak bu, kullandığımız metodun korunum skorundan daha az tahmin gücü olduğu şeklinde yorumlanmamalıdır. Zira söz konusu 46 amino asitin literatürde bulduğumuz deneyler için seçilmiş olmalarının öncelikli nedeni korunum skorlarının yüksekliğidir. Bir diğer gözlem, mod etkileşiminden ve korunum skorlarından elde edilen eğrilerin son kısımda ($x>0.75$) ayrışmalarıdır. Bu ayrışmanın olası bir nedeni, mod etkileşimlerinin işlevsel dinamik ile ilgili bilgi vermelerine rağmen, korunum skorlarının yüksekliğinin (ve mutasyon deneylerinde gözlenen işlev kaybının) sadece fonksiyonel dinamikteki değişim nedeniyle değil, örneğin, proteinin katlanmasında oynanan rol ile de önemli olabileceğidir.

Şekil 7'de hedef kümesindeki 46 amino asitin protein üzerindeki konumları ile mod etkileşimi skorları en yüksek olan %10'un konumları karşılaştırılmıştır.



Şekil 7. İşlevsel önemi deneysel olarak gösterilmiş olan 46 amino asit (sol) ve mod etkileşimi skoru en yüksek olan %10'un görsel karşılaştırması. Yüksek skorlar sıcak renklerle ifade edilmiştir.

Yüksek mod etkileşim skorlu bölgelerin protein yüzeyine rastgele yayılmadığı, aksine motor bölgesinin merkezinde ve ligand ve aktin bağlanma bölgeleri civarında, deneylerle önemi onaylanmış amino asitlerle benzer bölgelerde yoğunlaştıkları görülmektedir.

Projenin bu aşamada ulaşılan sonuçları Proteins: Structure, Function and Bioinformatics dergisinde yayımlanmıştır (Varol vd., 2014).

4.2 Glükokortikoid reseptör ailesi

Literatür özetinde detayları verilmiş olan AncCR, AncGR1, AncGR2 ve insan GR'nün kristal yapıları sırasıyla 2B3Y, 3RY9, 3GN8 ve 1M2Z erişim kodlarıyla PDB veritabanında bulunmaktadır. Her biri yaklaşık 250 amino asit içeren bu proteinler için MD benzetimleri, fla14sb kuvvet-alanı (Cornell vd., 1995) kullanılarak Tesla K20 GPU'larda Amber14 moleküler dinamik paketi (Case vd., 2014) üzerinde gerçekleştirildi. Ligand molekülleri de simülasyonlara dahil edildi ve parametrizasyonları, genelleştirilmiş Amber kuvvet alanı (generalized Amber force field) kullanılarak Antechamber ile yapıldı (Wang vd., 2004, 2006). Her bir protein için gerçekleştirilen 128 ns uzunluğunda ve 1 fs zaman adımıyla gerçekleştirilen benzetimler boyunca izlenen yörüngeler her 1000 adımda bir, yani 1 ps aralıkla kaydedildi. Her protein benzetimi, aynı başlangıç koşuluyla, ancak farklı rasgele sayı üreten tohumlarla dört kez tekrarlanarak sonuçların tutarlılığı kontrol edildi. Daha fazla analiz yapılmadan önce, yörüngeler omurga C-α atomlarının en iyi örtüşecekleri şeklde hizalandı. Her bir benzetimin denge durumuna geldiğinden emin olmak için ilk 7 ns dikkate alınmadı.

Bu protokol sonuç olarak her protein için doğal yapısı civarındaki konfigürasyon dağılımını toplamda yaklaşık 500ns uzunluğundaki yörüngelerden elde edilen 5×10^5 farklı noktada örneklememizi sağladı. Myosin üzerine çalışmalarımız GPU tabanlı sunucuların alımının döviz kurundaki artış nedeniyle gecikmesi sonrasında eldeki olanaklarla tamamlanmış ve sadece 10 ns'lik bir yörünge üzerinde analize imkan vermişti. TÜBİTAK'ın desteği ile altyapımıza kattığımız yeni sunucular sayesinde bu kapasiteyi en az 10 katına çıkararak, yurt içinde başka kaynaklardan bilgisayar zamanı satın alarak yapabileceğimizin çok ötesinde, daha esnek bir formatta ve geliştirdiğimiz yan analiz programlarıyla tam uyum içinde kullanabildiğimiz bir biyobilişim platform geliştirmiş olduk.

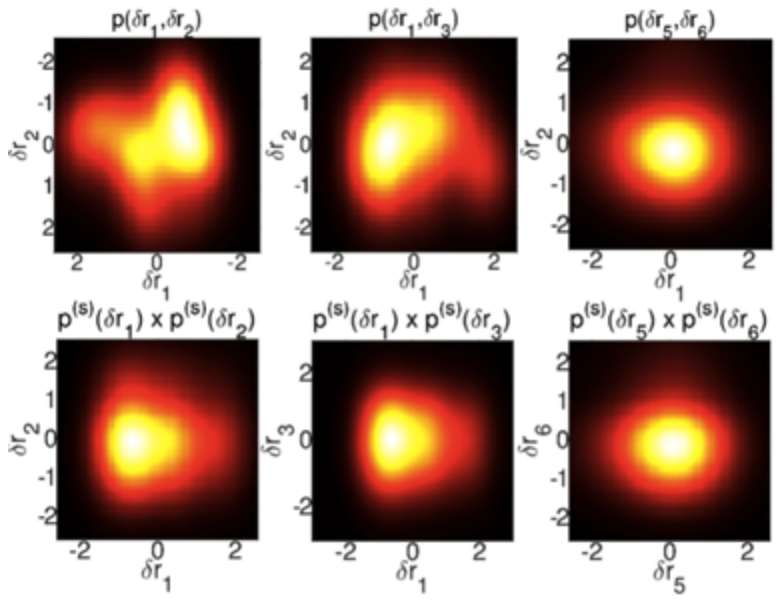
4.2.1 GR proteinleri üzerinde mod etkileşim analizi sonuçları

Myosin üzerindeki çalışmalarımıza benzer şekilde, burada incelediğimiz her protein için de C-α atom koordinatlarını yörünge örneklemleri üzerinden hesaplanan kovaryans matrisini (Λ) elde ettik ve eksenleri Λ matrisinin özvektörleriyle verilen mod uzayına değişken değişimi ile geçerek konfigürasyon dağılımını burada tarifledik. Düşük frekanslı yavaş ve global modların marjinal genlik dağılımlarının Gaussyen olmadığını bir kez daha onayladıktan sonra, önceki çalışmadan farklı olarak mod etkileşimlerini doğrudan gözlemleyebileceğimiz, mod çiftleri için

elde edilmiş kompozit genlik olasılık dağılımlarını elde ettik (Şekil 8). Bu şekillerde yatay veya düşeyde alınan iki farklı kesitin birbiriyle orantılı olması (yani aynı fonksiyonun farklı sabitlerle çarpılmış hali olmaları), iki modun etkileşmiyor olduğuna işarettir. Şekil 8'de yüksek endeksli modlar için durum böyle iken, örneğin (1,2) veya (1,3) çifti için durumun böyle olmadığı açıktır. Bu gözlemi sayısal olarak ifade edebilmek için belli bir mod çiftinin arasındaki etkileşmelerin sistemin toplam konfigürasyonel entropisi

$$F[f] = -\int f(\Delta r) \ln f(\Delta r)\, d\Delta r = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^{M} \ln f(\Delta r_i)$$

üzerindeki etkisini tanımladık. Yöntem bölümünde Hermite açılımı yardımıyla tanımladığımız f() dağılım fonksiyonunu ilgilendiğimiz iki modun endekslerini içeren Hermit polinom çiftlerini dışarıda bırakarak hesapladığımızda bu mod çiftinin etkileşimlerini dikkate almamış oluruz.



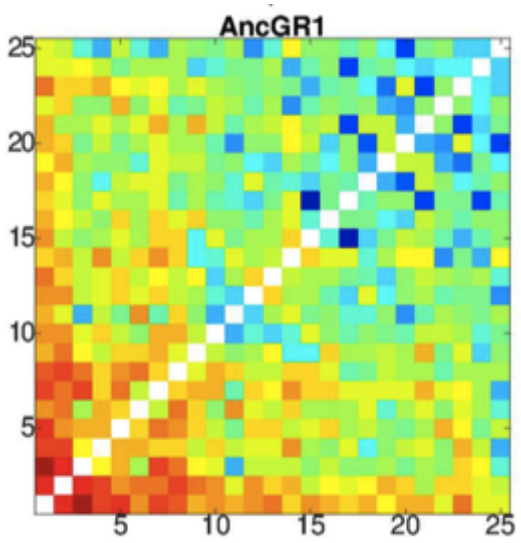
Şekil 8. AncGR2 proteininde seçilmiş bazı mod çiftleri için yörüngeler üzerinden elde edilmiş olasılık dağılımı.

(m,n) çifti için bu şekilde hesapladığımız dağılım fonksiyonuna $f_{\{-mn\}}$ dersek aradığımız ölçüt

$$\Delta_{mn} = F[f_{(-mn)}] - F[f]$$

olarak verilebilir. Geliştirdiğimiz kuramsal altyapının olanak sağladığı bu niceliğin hesaplanması literatüre orjinal bir katkı olmuştur. GR proteinlerindeki 747 modun olası bütün çift kombinasyonları için bu değeri hesaplamak çok uzun zaman gerektirdiği için en çok katkı beklediğimiz yavaş modlara odaklandık. İlk 25 modun kendi aralarındaki etkileşimlerin sistemin konfigürasyonel entropisine etkisi örnek olarak AncGR1 proteini için Şekil 9'da

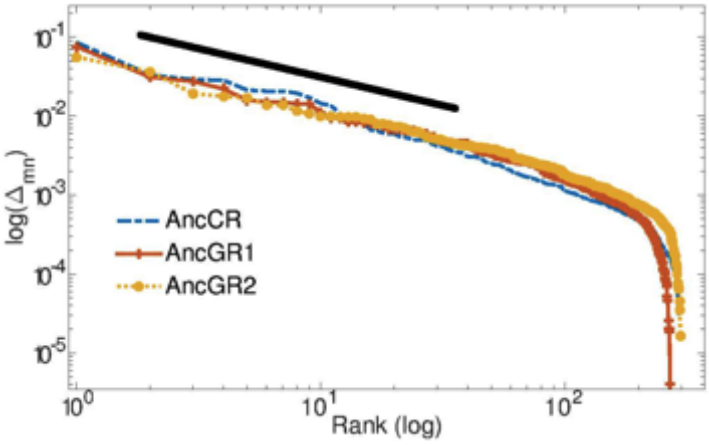
verilmiştir. Sonuç açık olarak mod etkileşimlerinden sistemin serbest enerjisine en büyük katkının yavaş mod çiftlerinden geldiğini göstermektedir.



Şekil 9. AncGR1 proteinin en yavaş 25 salınım modu çifleri arasındaki etkileşimin konfigürasyonel entropiye etkisi. Sıcak renkler yüksek etkiyi ifade eder.

Benzer sonuçlar diğer proteinler için de üretildi. Sonuç olarak, AncCR ve AncGR1'de en etkili mod çiftinin (1,3), AncGR2'de ise (1,7) ve (2,6) olduklarını bulduk. Bu mod çiftlerinin karşışık geldiği fiziksel salınımlarda en mobil bölgeler 7 ve 10 numaralı sarmallar (helix) sarmal-7'nin önündeki bağlantı (loop) bölgesidir. Yukarıdaki sarmalların ligand bağlanma cebini oluşturuyor olmaları, ayrıca sözkonusu bağlantı bölgesinin daha önce önemi açıklanmış olan iki X mutasyonunun bulunduğu yer olması cesaret vericidir.

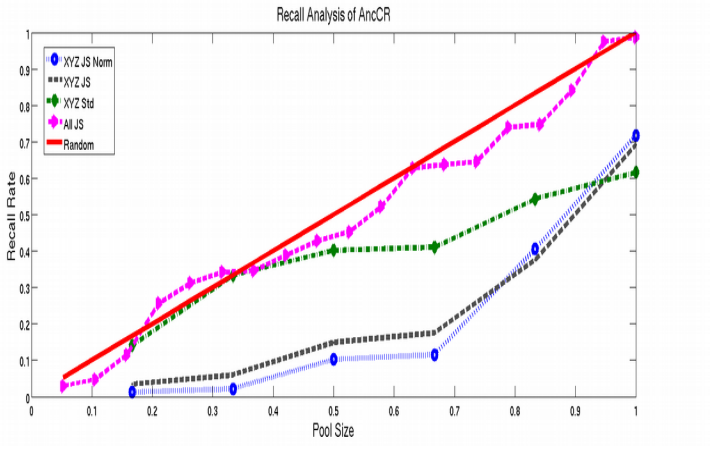
İlginç bir başka gözlem, yukarıda hesapladığımız Δ_{mn} değerinin (m,n) çiftinin bu değere göre sıralanmış çiftler arasındaki yerine göre gösterildiği "Zipf kanunu" eğrisidir. Şekil 10'da verilen bu eğri, henüz anlamadığımız bir nedenle doğadaki pek çok sistemde görülene benzer olarak üstel bir davranış (power law) ortaya koymaktadır.



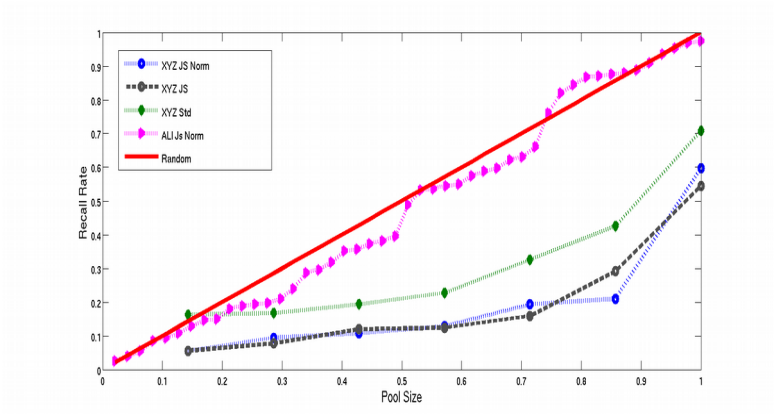
Şekil 10. AncCR, AncGR1 ve AncGR2 için Δ_{mn} değerinin "Zipf" eğrisi. Siyah düz çizginin eğimi -0.8'dir.

Projenin bu aşamasında incelediğimiz dört GR proteini üzerinde mod etkileşim skorlarını hesapladık. Sarmal-7'nin önündeki 100-110 aminoasit numaralı bağlantı bölgesinin (sarmal-7 ile birlikte) AncGR1 ve AncGR2 arasında en fazla yapısal fark gösteren bölge olmasına rağmen bütün proteinlerde yüksek bir skor verdiğini bulduk. Özellikle X mutasyonlarından biri olan S106P'ye karşılık gelen 106. amino asit tutarlı olarak tüm proteinlerde en yüksek skora sahiptir. Nitekim, bu mutasyonun tek başına ve liganddan bağımsız olarak AncCR'de aktivasyonu azalttığı bilinmektedir. Benzer şekilde, AncGR1'deki Q114L ve M197I sentetik mutasyonları ile kortizol seçiciliğinin kazanılabildiği ve kortizol bağlanması ile transkripsiyonel aktivite arasındaki komünikasyonun engellediği bilinmektedir. Bu iki bölge AncGR1'de güçlü mod etkileşimi sinyalleri vermektedir.

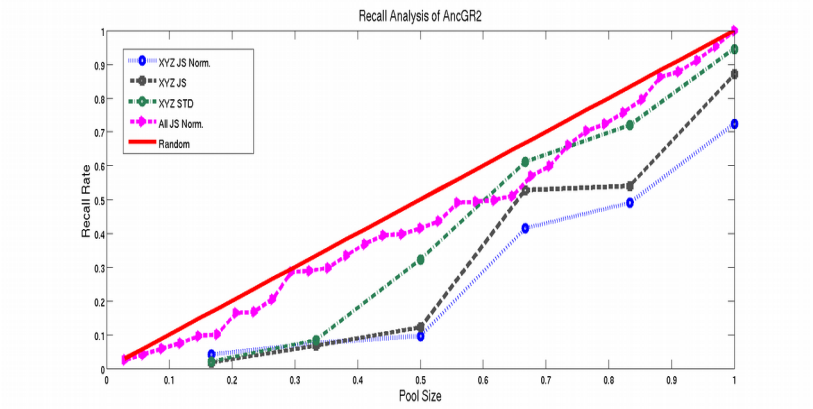
(a)



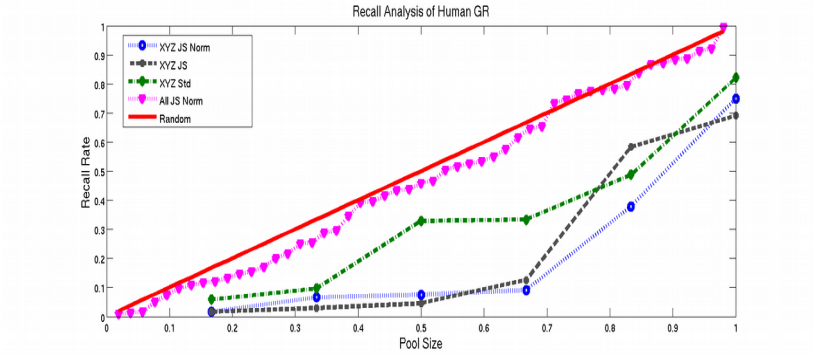
(b)



(c)



(d)

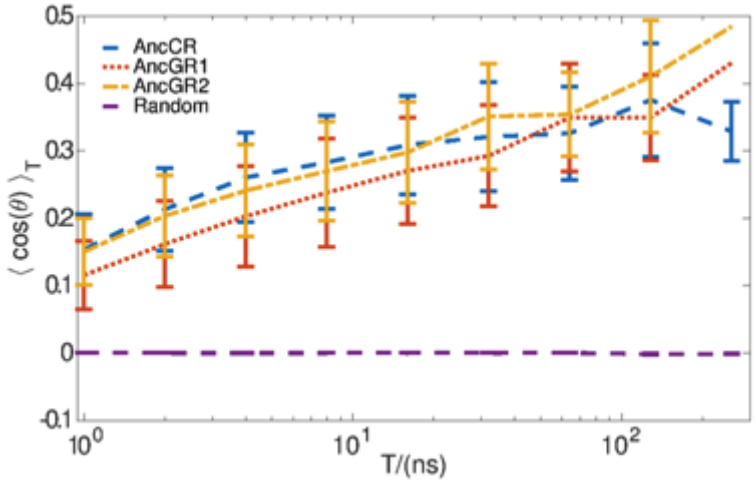


Şekil 11. (a) AncCR, (b) AncGR1, (c) AncGR2, ve (d) İnsan GR proteinleri için X+Y+Z mutasyon kümesi üzerinde hesaplanmış “recall” analizi sonuçları. Pembe noktalar proteinin bir sonraki aşamaya evrimindeki bütün mutasyonların hedef küme olarak alındığı durum, köşegen altında kalan diğer eğriler ise sadece X, Y, Z mutasyonları içindir. Mod etkileşim skorları (JS ve JS Norm ile ifade edilmiştir). Std ile gösterilen B-faktörü ile elde edilmiş eğrilerin de köşegen altında kalması X, Y, Z mutasyonlarının çoğunlukla gevşek “loop” bölgelerinde olmasıyla ilgilidir.

Yukarıdaki gözlemleri sayısal bir dayanağa oturtmak için literatür bölümünde açıklanan X, Y, Z fonksiyonel mutasyonlarının lokasyonlarını “hedef küme” olarak seçtik. Elde ettiğimiz mod etkileşimi skorlarının bu hedef küme üzerindeki seçiciliğini yine “recall” analizi ile inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlar her protein için ayrı ayrı aşağıdaki Şekil 11’de verilmiştir.

Sonuç olarak, bu dört protein arasındaki evrimsel geçişte yer alan bütün mutasyonlar dikkate alındığında mod etkileşim skorları ile bu hedef küme arasında bir korelasyon görülmemiştir. Ancak AncGR1-AncGR2 geçişinde fonksiyon değişiminin deneysel araştırmaları sırasında gözlenmiş olan önemli X, Y, Z mutasyonları ile mod etkileşim skorları arasında belirgin bir korelasyon vardır.

Son olarak elde ettiğimiz sonuçların tutarlılığını sınamak amacıyla bulgularımızın hem birbirinden bağımsız yörüngeler arasında hem de analiz edilen yörüngenin uzunluğu ile ne oranda değiştiğini sorguladık. Proteinlerin işlevlerini gerçekleştirme süreleri genellikle benzetim çalışmalarının karşılık geldiği gerçek zaman aralıklarının çok ötesinde olduğu için bu soru önemlidir. Bu amaçla elimizdeki yörüngeleri T ns aralıkli N_T zaman dilimine ayırdık (örneğin 128 ns’lik bir benzetim için T=16ns ise N_T=8’dir). T=1,2,4,8,...,128 için mod etkileşim skorlarını her zaman diliminde ayrı ayrı hesapladıktan sonra, aynı zaman diliminden elde edilen skor vektörü çiftleri arasındaki mesafeyi aralarındaki açının kosinüsü (yani normalize ettiğimiz iki vektörün iç çarpımı) ile ölçtük. Bu mesafenin her zaman dilimi için ortalama değeri bize farklı benzetimler arasındaki tutarlılığı, ortalamanın artan T ile davranışı ise artan benzetim süresi ile tutarlılığın nasıl değiştiğini gösterir. Elde ettiğimiz bulgular Şekil 12’de özetlenmiştir.



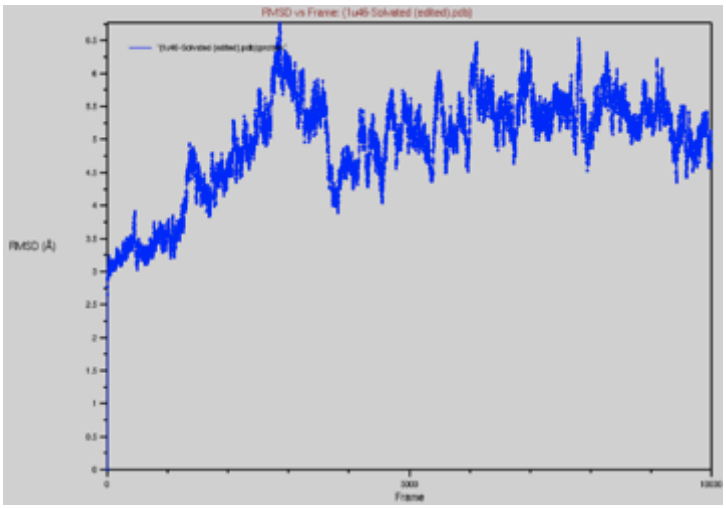
Şekil 12. *Mod etkileşim skorlarının benzetimler arası tutarlılığı ve tutarlılığın artan yörünge süresi ile değişimi.*

Şekil 12'de alttaki kesikli çizgi skorlar arasında tutarlılığın olmadığı durumda beklenen davranıştır. Skor vektörleri arasındaki açının kosinüs değerinin 1 ns'lik benzetimlerde 0.1-0.2 aralığından başlayıp 128 ns'lik yörüngeler için 0.4'e kadar yükseldiği görülmektedir. Bu sonuç iki açıdan olumludur. Birinci olarak, sonucun benzetim süresiyle artıyor olması kullandığımız metodun kendi içinde tutarlı ve kuramsal çatısının anlamlı olduğunu göstermektedir. Gelecekte işlem gücünün artmasıyla daha uzun benzetimler mümkün oldukça daha da güvenilir sonuçlar elde edilebilecektir. İkincisi, sayısal olarak 0.1 bile oldukça yüksek bir tutarlılığa işaret etmektedir. Zira kullandığımız vektörler 747 boyutudur ve bu boyutlu iki (normalize edilmiş) vektörün arasındaki açının tipik kosinüs değeri birkaç kat daha düşüktür.

Bu bölümde verilen sonuçlar Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics dergisinde yayımlanmıştır (Kav vd., 2016).

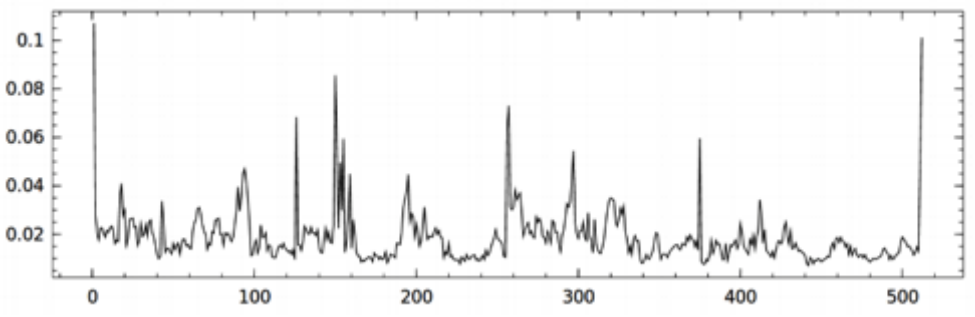
4.3 ACK1 proteini üzerinde mod etkileşim analizi sonuçları

1u4a PDB numaralı insan ACK1 proteininin dimer formu için güncellenmiş Amber15 moleküler dinamik paketinde koşturduğumuz 100 ns süreli benzetim sonunda elde ettiğimiz, başlangıç yapısından ortalama (rmsd) sapma davranışı Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13. *ACK1 proteininin PDB'den alınan yapısının moleküler dinamik benzetimleri altında dengeye erişimi.*

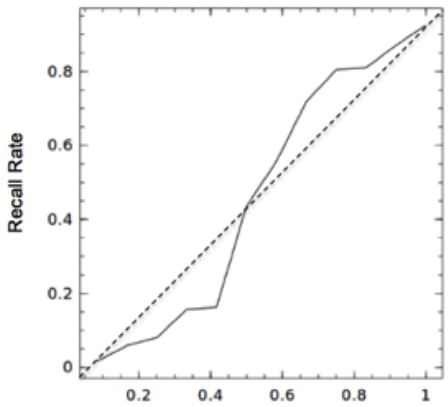
Diğer proteinlerden farklı olarak, benzetimin ilk 30 ns'lik oldukça uzun bir bölümü dengeye erişme sürecidir. Bu nedenle sadece son 70 ns'lik bölümü dikkate alınarak mod etkileşim analizlerimizi gerçekleştirdik. Daha önceki çalışmalarımızdan bu sürenin tutarlı sonuçlar elde etmek için yeterli olduğunu bilinmektedir. Yaklaşık 500 amino asit içeren dizilim üzerinde elde ettiğimiz mod etkileşim skorları aşağıdaki gibidir:



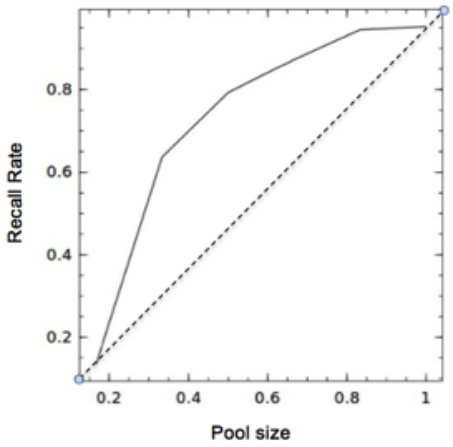
Şekil 14. *ACK1 proteininin dizilimi boyunca mod etkileşim skorları (Jensen-Shannon uzaklığı kullanılarak hesaplanmıştır).*

Bu skorları daha önceki örneklerde olduğu gibi proteinin fonksiyonel aktivitesinde rol oynayan amino asitlerin oluşturduğu hedef kümeyle karşılaştırdık. Bu küme ACK1'in regülasyonunda rol oynadığı proteinler olan Wwox, AKT ve AR'nin fosforilasyonunda etkin olan 176 (AKT), 287 (Wwox), 267 ve 363 (AR) pozisyonlarındaki tirozinlerdir.

(a)



(b)



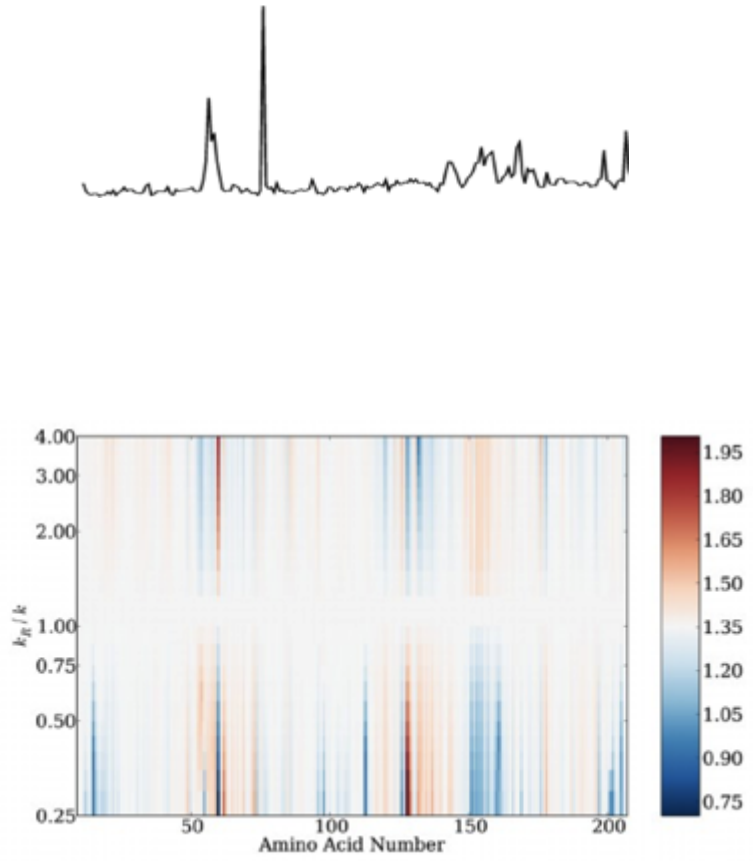
Şekil 15*. (a) ACK1 proteininde bütün tirozin aminoasitleri ile mod etkileşim skoru arasındaki tutarlılığı gösteren "recall" eğrisi. (b) sadece proteinin fonksiyonu sırasında forforilasyondan sorumlu tirozin aminoasitleri için aynı eğri.*

Elde ettiğimiz “recall” eğrileri aşağıdaki Şekil 15’te (a) bu hedef tirosinler için ve (b) proteindeki bütün tirosinler için hesaplanmıştır. Sonuçlar mod etkileşim skorlarının bütün tirosinler dikkate alındığında bir seçiciliği olmadığına (“recall” eğrisi köşegen üzerinde kaldığı için), öte yandan protein aktivitesinde rol oynanan tirosinlerle mod etkileşimleri arasında yine belirgin bir korelasyonun varlığına işaret etmektedir.

Önceki proteinler üzerindeki analizlerimizden farklı olarak burada yatay ve düşey eksenler yer değiştirdiği için köşegen üstünde kalan eğriler pozitif korelasyona karşılık gelmektedir. Ana sonuçların ümit verici olduğu bu son protein üzerinde de bulgularımızı detaylandırıp yakın zamanda yayınlamayı ümit ediyoruz.

4.4 Mod etkileşim analizinin alternatif bir metot ile karşılaştırılması

Projede son olarak, geliştirdiğimiz mod etkileşimi tabanlı alosterik fonksiyon tezine dayalı ve işlevsel bölgelerin tahminine imkan veren analizi literatürdeki benzer amaçlı bir model ile karşılaştırdık. Bu alternatif model (Rodgers TL, Townsend PD, Burnell D, Jones ML, Richards SA, McLeish TCB, et al. (2013) Modulation of Global Low-Frequency Motions Underlies Allosteric Regulation: Demonstration in CRP/FNR Family Transcription Factors. PLoS Biol 11(9): e1001651) protein dinamiğini sadece doğrusal (Gaussiyen) etkiler düzeyinde inceleyerek her amino asitin komşularına ideal yaylar ile bağlı olduğunu varsayar.



Şekil 16. *CAP proteininde alosterik etkileşimler için elde edilen (Rogers vd., 2013) amino asit önem skorları ile mod etkileşim skorlarının görsel karşılaştırması.*

Daha sonra, seçilen bir amino asite bağlı olan yayların yay sabitini değiştirerek bu değişkliğin sonucunda ligand bağlayan bölgeler arasındaki kooperatif davranışın nasıl etkilendiğini sorgular. Şekil 16'da verilen karşılaştırma, bu alternatif analizde kullanılan 4hzf PDB numaralı CAP proteinin (Catapolic gene Activator Protein) iki farkli yöntem ile elde edilmiş skorlarının görsel karşılaştırılmasıdır. Şekilde renk skalası ile verilen değerler Rodgers T.L. vd. tarafından hesaplanmıştır ve renginden bağımsız olarak, beyaz fondan her farklılık fonksiyonel açıdan önemli bir bölgeye işaret etmektedir (renk, kooperatif etkinin pozitif veya negatif olmasına göre değişmektedir). Renkli şeklin üst kısmına eklediğimiz mod etkileşim skorları aynı bölgeler üst üste gelecek biçimde hizalanmıştır. Karşılaştırıldığında, sıra numarası 50-60, 150 civarı ve 200 civarı olan amino asitlerin yüksek skor değerleri iki metot arasında benzerlik göstermektedir. Diğer yandan, mod etkileşim skorunun en yüsek olduğu 70. Amino asit komşuluğund alternatif metot belirgin ancak daha az dominant bir fonksiyonel önem atfetmiştir. Benzer şekilde, Rodgers T.L. vd.'nin ikinci en yüksek işlevsel önemde bulduğu 125. lokasyon komşuluğu bizim analizimizde öne çıkmamıştır. İki metodun farklı fiziksel mekanizmalar üzerine kurulmuş olmalarına gözlenen farklılıklara bir açıklama getirebilir. Öte yandan tutarlı olduklar bölgelerin daha güçlü bir olasılıkla fonksiyonel

bölgelere karşılık gelip gelmediklerinin deneysel olarak sınanması gerekecektir. Bu projenin gelecekte bu tür araştırmaları motive edeceğini umuyoruz.

5 SONUÇ ve TARTIŞMA

5.1 Proje Çıktıları

Proje süresince yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen çıktılar şunlardır:

1. Myosin üzerindeki bulgularımız Proteins dergisinde yayımlanmıştır (Varol vd., 2014).
2. GR proteinleri üzerine bulgularımız yine Proteins dergisinde yayımlanmıştır (Kav vd., 2016)
3. Batuhan Kav GR proteinleri üzerine bulgularıyla Koç Üniv. fizik bölümünden yüksek lisans tezini tamamlamıştır.
4. GR proteinleri üzerine bulgularımız Amerikan Fizik Derneği'nin yıllık toplantısıda (APS meeting), uluslararası 21. İstatistiksel Fizik Günleri'nde ve çeşitli üniversitelere yapılan ziyaretlerde sözlü olarak sunulmuştur.
5. Gelecekte farklı proteinlere kolayca uygulanabilecek ve fonksiyonel bölgelerin tahmininde kullanılabilecek bir yazılım geliştirilmiştir.

5.2 Tartışma

Proteinlerde doğrusal olmayan (Gaussiyen ötesi) etkilerin yapı içinde enerji transferinde etkili olması fiziksel açıdan doğal bir beklentidir. Ancak protein dinamiğinde gözlenen Guassiyen ötesi etkilerden yola çıkılarak biyolojik açıdan anlamlı bilgilere nasıl ulaşılabileceği açık değildir. Bu projede alosterik davranış gösteren değişik proteinler (bir motor protein, reseptör proteinler ve bir kinaz) için protein dinamiğinde gözlenen doğrusal olmayan etkilerle mod etkileşimleri arasındaki ilişkiyi su yüzüne çıkaran bir analiz kullanılarak, proteinlerde her amino asit için ayrı bir fonksiyonel önem skoru üretilmiştir. Bu skorlar ile gerek doğal gerekse sentetik evrim altında fonksiyon yitimine yol açan bölgeler (veya kinaz örneğinde doğrudan fosforilasyondan sorumlu bölgeler) arasındaki korelasonunun pozitif olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem, geliştirdiğimiz metodun işlevsel bölgelerin tahmininde kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer yandan, bulgularımız alosterik davranış ile Gaussiyen ötesi etkiler arasında organik bir ilişki olduğunu göstererek literature temel bilimsel bir katkı da sağlamaktadır. Bununla birlikte, proteinlerin evrimsel gelişimine katkıda bulunan çok sayıda faktör göz önüne alındığında, yaklaşımımızın (ya da herhangi bir diğer yöntemin) tek başına fonksiyonel bölgeleri tahmin etmekte yeterli olacağını düşünmek gerçek dışı olur. Geliştirdiğimiz bu biyobilişimsel aracın tamamlayıcı yaklaşımlar ile birlikte kullanılması ve farklı yaklaşımların fikir birliğine dayanan çok yönlü program içinde bir modül olarak işlev görmesi daha anlamlı olacaktır.

.

6 KAYNAKLAR

Bahar I. ve Rader A.J. 2005. "Coarse-grained normal mode analysis in structural biology", Current Opinion in Structural Biology, 15, 586.

Bahar I., Lezon T.R., Yang L.-W., Eyal E. 2010. "Global dynamics of proteins: Bridging between structure and function", Annu. Rev. Biophys., 39, 23.

Barnes P.J. 1998. "Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms", Clinical science, 94, 557–572.

Bentley P.J. 1998. Comparative vertebrate endocrinology, Cambridge University Press.

Boehr D.D., Nussinov R., Wright P.E. 2009. "The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition", Nature Chem. Biol., 5, 789.

Bridgham J.T., Ortlund E.A., Thornton J.W. 2009. "An epistatic ratchet constrains the direction of glucocorticoid receptor evolution", Nature, 461, 515–519.

Carson M.W., Luz J.G., Suen C., Montrose C., Zink R., Ruan X., Cheng C., Cole H., Adrian M.D., Kohlman D.T., vd. 2014. "Glucocorticoid receptor modulators informed by crystallography lead to a new rationale for receptor selectivity, function, and implications for structure-based design", Journal of medicinal chemistry, 57, 849–860.

Case D.A. 1994. "Normal mode analysis of protein dynamics", Current Opinion in Structural Biology, 4, 285.

Case D.A., Babin V., Berryman J., Betz R.M., Cai Q., Cerutti D.S., Cheatham T.E., Darden T.A., Duke R.E., Gohlke H., vd. Amber 14. 2014.

Christopoulos A. 2002. "Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery", Nature Reviews Drug Discovery, 1, 198.

Chrousos G.P. 2004. "The glucocorticoid receptor gene, longevity, and the complex disorders of western societies", The American journal of medicine, 117, 204–207.

Columbus L. ve Hubbell W.L. 2002. "A new spin on protein dynamics", TRENDS in Biochemical Sciences, 27, 288.

Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.F., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. 1995. "A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules", Journal of the American Chemical Society, 117, 5179–5197.

Cui Q., Li G., Ma J., Karplus M. 2004. "A normal mode analysis of structural plasticity in the biomolecular motor F(1)-ATPase", J. Mol. Biol., 340, 345.

Demerdash O.N.A., Daily M.D., Mitchell J.C. 2009. "Structure-based predictive models for allosteric hot spots", PLoS Computational Biology, 5, e1000531.

Freire E. 2000. "Can allosteric regulation be predicted from structure?", PNAS, 97, 11680.

Frye J.J., Klenchin V.A., Bagshaw C.R., Rayment I. 2010. "Insights into the Importance of Hydrogen Bonding in the γ-Phosphate Binding Pocket of Myosin: Structural and Functional Studies of Serine 236", Biochemistry, 49,4897–4907.

Giese K.C. ve Spudich J.A. 1997. "Phenotypically Selected Mutations in Myosin's Actin Binding Domain Demonstrate Intermolecular Contacts Important for Motor Function", Biochemistry, 36, 8465–8473.

Glembo T.J., Farrell D.W., Gerek Z.N., Thorpe M.F., Ozkan S.B. 2012 "Collective dynamics differentiates functional divergence in protein evolution", PLoS computational biology, 8, e1002428.

Gunasekaran K., Ma B., Nussinov R. 2004. "Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins?", Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 57, 433.

Harms M.J. ve Thornton J.W. 2014 "Historical contingency and its biophysical basis in glucocorticoid receptor evolution", Nature, 512, 203–207.

Hawkins R.J. ve McLeish T.C.B. 2004. "Coarse-grained model of entropic allostery", Phys. Rev. Lett., 93, 098104.

Hayward S., Kitao A., Go N. 1994. "Harmonic and anharmonic aspects in the dynamics of BPTI: a normal mode analysis and principal component analysis", Protein Sci., 3, 936.

Henzler-Wildman K. ve Kern D. 2007. "Dynamic personalities of proteins", Nature, 450, 964.

Ito K., Uyeda T.Q.P., Suzuki Y., Sutoh K., Yamamoto K. 2003. "Requirement of Domain-Domain Interaction for Conformational Change and Functional ATP Hydrolysis in Myosin", Journal of Biological Chemistry, 278, 31049–31057.

Kabakçıoğlu A., Yuret D., Gür M., Erman B. 2010. "Anharmonicity, mode-coupling and entropy in a fluctuating protein", Physical Biology, 7, 046005.

Kav B., Öztürk M., Kabakçıoğlu A. 2016. "Function changing mutations in glucocorticoid receptor evolution correlate with their relevance to mode coupling", Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 84, 655-665.

Kern D. ve Zuiderweg E.R.P. 2003. "The role of dynamics in allosteric regulation", Current Opinion in Structural Biology, 13, 748.

Kino T., Manoli I, Kelkar S., Wang Y., Su Y.A., Chrousos G.P. 2009. "Glucocorticoid receptor (gr) β has intrinsic, grα-independent transcriptional activity", Biochemical and biophysical research communications, 381, 671–675.

Kitao A. ve Go N. 1999. "Investigating protein dynamics in collective coordinate space. Current opinion in structural biology", 9, 164–169.

Laskowski R.A., Gerick F., Thornton J.M. 2009. "The structural basis of allosteric regulation in proteins", FEBS Lett., 583, 1692.

Leitner D.M. 2008. "Energy flow in proteins", Annu. Rev. Phys. Chem., 59, 233.

Levitt M., Sander C., Stern P.S. 1985. "Protein normal-mode dynamics: trypsin inhibitor, crambin, ribonuclease and lysozome", J. Mol. Biol., 181, 423.

Luque I., Leavitt S.A., Freire E., 2002. "The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin?", Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 31, 235.

Ma J. 2005. "Usefulness and limitations of normal mode analysis in modeling dynamics of biomolecular complexes", Structure, 13, 373.

Mahajan K., Mahajan N.P. 2013. "ACK1 tyrosine kinase: targeted inhibition to block cancer cell proliferation", Cancer Letters, 338, 185-92.

Malnasi-Csizmadia A., Dickens J.L., Zeng W., Bagshaw C.R. 2005. "Switch movements and the myosin crossbridge stroke", Journal of Muscle Research & Cell Motility, 26, 31–37.

Manning C.D. ve Schutz H. 1999. Foundations of statistical natural language processing, Cambridge: MIT press.

Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. 2002. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome", Science, 298, 1912-1934.

Mittermaier A. ve Kay L.E. 2006. "New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics", Science, 312, 224.

Monod J., Wyman J., Changeux J.P. 1965. "On the nature of allosteric transitions: A plausible model", J. Mol. Biol., 12, 88.

Moritsugu K., Miyashita O., Kidera A. 2000. "Vibrational energy transfer in a protein molecule", Phys. Rev. Lett, 85, 3970.

Nakagawa H., Joti Y., Kitao A., Kataoka M. 2008. "Hydration affects both harmonic and anharmonic nature of protein dynamics", Biophysical journal, 95, 2916–2923.

Neet K. ve Hunter T. 1996. "Vertebrate non-receptor protein–tyrosine kinase families", Genes to Cells, 1.

Nicolaides N.C., Galata Z., Kino T., Chrousos G.P., Charmandari E. 2010. "The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function", Steroids, 75, 1–12.

O'Malley B.W., Clark J.K., Schrader W.T. 1992. Mechanism of steroid hormones, Philedelphia: WB Sanders Co.

Onishi H. ve Morales M.F. 2007. "A closer look at energy transduction in muscle", Proceedings of the National Academy of Sciences, 104,12714–12719.

Ortlund E.A., Bridgham J.T., Redinbo M.R., Thornton J.W. 2007. "Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis", Science, 317, 1544–1548.

Patterson B. ve Spudich J.A. 1996. "Cold-sensitive mutations of Dictyostelium myosin heavy chain highlight functional domains of the myosin motor", Genetics, 143,801–810.

Patterson B., Ruppel K.M., Wu Y., Spudich J.A. 1997. "Cold-sensitive mutants G680V and G691C of Dictyostelium myosin II confer dramatically different biochemical defects", The Journal of biological chemistry, 272, 27612–27617.

Piazza F. ve Sanejouand Y.H. 2009. "Long-range energy transfer in proteins", Physical Biology, 6, 046014.

Pontiggia F., Colombo G., Micheletti C., Orland H. 2007. "Anharmonicity and self-similarity of the free energy landscape of protein G", Phys. Rev. Lett., 98, 48102.

Reubold T.F., Eschenburg S., Becker A., Kull F.J., Manstein D.J. 2003. "A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin", Nature structural biology, 10, 826–830.

Roitberg A., Gerber R.B., Elber R., Ratner M.A. 1995. "Anharmonic wave functions of proteins: Quantum self-consistent field calculations of BPTI", Science, 268, 1319-1322.

Ruppel K.M. ve Spudich J.A. 1996. "Structure-function studies of the myosin motor domain: importance of the 50-kDa cleft", Molecular biology of the cell, 7,1123–1136.

Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. 2000. "How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimula- tory, and preparative actions", Endocrine reviews, 21, 55–89.

Sasaki N., Ohkura R., Sutoh K. 2000. "Insertion or deletion of a single residue in the strut sequence of dictyostelium myosin II abolishes strong binding to actin", Journal of Biological Chemistry, 275,38705–38709.

Sasaki N., Ohkura R., Sutoh K. 2003. "Dictyostelium myosin II mutations that uncouple the converter swing and atp hydrolysis cycle", Biochemistry, 42, 90–95.

Sasaki N., Shimada T., Sutoh K. 1998. "Mutational analysis of the switch II loop of Dictyostelium myosin II", The Journal of biological chemistry, 273, 20334–20340.

Shimada T., Sasaki N., Ohkura R., Sutoh K. 1997. "Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of Dictyostelium discoideum myosin II", Biochemistry, 36, 14037– 14043.

Smith C.A. ve Rayment I. 1996. "X-ray Structure of the Magnesium(II)ADPVanadate Complex of the Dictyostelium discoideum Myosin Motor Domain to 1.9 A Resolution", Biochemistry, 3, 5404–541.

Spudich J.A. 1994. "How molecular motors work", Nature, 372, 515–518.

Sweeney H.L. ve Houdusse A. 2010. "Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism", Annual review of biophysics, 39, 539–557.

Tang S., Liao J., Dunn A.R., Altman R.B., Spudich J.A., Schmidt J.P. 2007. "Predicting allosteric communication in myosin via a pathway of conserved residues", Journal of molecular biology, 373,1361–1373.

Tsiavaliaris G., Fujita-Becker S., Batra R., Levitsky D.I., Kull F.J., Geeves M.A., Manstein D.J. 2002. “Mutations in the relay loop region result in dominant-negative inhibition of myosin II function in Dictyostelium.”, EMBO reports, 3,1099– 1105.

Varol O., Yuret D., Erman B., Kabakçıoğlu A. 2014. "Mode coupling points to functionally important residues in Myosin II", Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 82, 1777-1786.

Wang J., Wang W., Kollman P.A., Case D.A. 2006. "Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations", Journal of molecular graphics and modelling, 25, 247–260.

Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. 2004. "Development and testing of a general amber force field", Journal of computational chemistry, 25, 1157–1174.

Xing J. 2007. "Nonequilibrium Dynamic mechanism for allosteric effect", Phys. Rev. Lett., 99, 168103.

Yang J. ve Young M.J. 2009. "The mineralocorticoid receptor and its coregulators", Journal of molecular endocrinology, 43, 53–64.

Yogurtcu O.N., Gur M., Erman B. 2009. "Statistical thermodynamics of residue fluctuations in native proteins", J. Chem. Phys., 130 095103.

Zhou J. ve Cidlowski J.A. 2005. "The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses", Steroids, 70, 407–417.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ALKAN KABAKÇIOĞLU
Proje No:	113F092
Proje Başlığı:	Alosterik Proteinlerin Fonksiyonunda Kritik Rol Oynayan Bölgelerin Belirlenmesine Yönelik, Mod Etkileşimlerinin Dinamik Analizine Dayalı Yeni Bir Yöntem
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	DENİZ YURET
Danışmanlar:	BURAK ERMAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	KOÇ Ü. FEN F. FİZİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2013 - 01/11/2016
Onaylanan Bütçe:	367530.0
Harcanan Bütçe:	255038.83
Öz:	Proteinlerde yapı-dinamik-işlev arasındaki ilişki son birkaç on yıldır incelenmekte olan ve kanser, Alzheimer gibi hayati ve tedavisi bilinmeyen hastalıklardan sıradan gribe kadar pek çok sağlık sorununun altında yatan biyofiziksel mekanizmaların belirlenmesinde önemi olan bir araştırma alanıdır. Bu projenin kapsamını tanımlayan ve özellikle, kinazlar ve değişik reseptör proteinlerde olduğu gibi, proteinin içsel dinamiğinin bir liganda (örneğin küçük bir molekül ya da DNA) bağlanma sonrasında uğradığı değişikliğin ve bu değişim ile tetiklenen işlev artışı veya azalışının tanımlayıcı olduğu alosterik proteinler son zamanda aktif olarak araştırılmaya başlanmıştır. Bu proteinlerde iki bölge arasında bilgi transferinin molekülün iç dinamiğinin örneklediği yapıların dağılımı ve bu dağılımın liganda bağlanma sonrasında gösterdiği değişim ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bir başka paradigma ise, proteinin farklı noktaları arasındaki bilgi ve enerji transferinde salınım modları arasındaki etkileşimlerin önemli rol oynadığıdır. Projenin temel amacı, bu son paradigmadan yola çıkarak protein yapısında (özellikle yüzeyinde) işlev açısından kritik önemi olan bölgeleri belirleyen istatistiksel fizik temelli bir yöntem geliştirmek ve bu yöntemi farklı proteinler üzerinde sınamaktır. Geliştirdiğimiz yöntem birkaç aşamadan oluşmaktadır: 1.Proteinin doğal yapısından başlayarak termal salınımlarla beslenen denge dinamiğini uzun süreli moleküler dinamik benzetimleri ile örneklemek; 2.Bu örnekleri istatistiksel fizik yöntemleri kullanılarak geliştirdiğimiz yeni bir kuramsal analiz ile inceleyerek mod etkileşimlerinin sistem üzerindeki etkisini izole etmek; 3.Analiz sonuçlarını yine özgün bir projeksiyon yöntemi ile mod uzayından gerçek uzaya taşıyarak proteinin yapısında fonksiyonel açıdan kritik öneme sahip bölgeleri belirlemek. Metot, miyosin II, glükokortikoid reseptör protein ailesinden dört protein, insan serum albümin proteini ve prostat kanserinde önemli rol oynadığı bilinen kinaz ACK1 üzerinde sınanmış, hepsinde olumlu sonuçlar vermiştir. Elde edilen bulguların bir kısmı iki uluslararası makale ile rapor edilmiş olup diğerlerinin de ayrı bir yayına dönüştürülmesi süreci devam etmektedir. Son olarak, projede geliştirilen analiz metodu işlevsel bölgelerin tayini için geliştirilmiş başka bir metot ile karşılaştırılmıştır.
Anahtar Kelimeler:	alosterik protein, moleküler dinamik, mod etkileşimi, anharmonik etkiler
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK

Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Mode coupling points to functionally important residues in myosin II (Makale - Diğer Hakemli Makale), 2- A quantitative analysis for the relevance of mode coupling to protein function (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 3- ?A quantitative analysis for the relevance of mode coupling to protein function (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 4- Functionally important residues from mode coupling during short-time protein dynamics (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 5- Functionally important residues from mode coupling during short-time protein dynamics (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),

TÜBİTAK