

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HUNTINGTİN PROTEİNİNİN
BİYOİNFORMATİK AÇIDAN İNCELENMESİ

Hazırlayan
NERGİZ HÜRREM AYDOĞAN ÇATIK

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. NAGEHAN ERSOY

HAZİRAN 2008
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tezimin hazırlanması süresince büyük bir hoşgörü, emek ve olağanüstü gayret göstererek, yaşadığım tüm tersliklere göğüs germemi sağlayacak motivasyonu ve iyimserliğini hiç eksik etmeyen, bilgi ve birikimlerini cömertçe paylaşan, akademik meslek hayatım boyunca kendisini örnek alacağım değerli hocam Yrd. Doç. Dr Nagehan Ersoy'a desteği ve yardımları için teşekkürü bir borç bilirim.

Beni hiç bir zaman yalnız bırakmayan, her zaman destek olan, yaşadığı ortamı huzurlu kılan, sonsuz sevgisini hiç eksik etmeyen sevgili eşim, hayat arkadaşım Mehmet Çağlar Çatık'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En yakın dostum olan canım kardeşim Nilüfer Emet Aydoğan'a bütün zor zamanlarımda yanımda olduğu ve manevi desteğini bir an olsun eksik etmediği için çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, başarılı olmam için maddi ve manevi her türlü desteği, sevgiyi ve emeği veren sevgili annem Ayşe Bilge Aydoğan ve anneannem Advieye Çıkrıkçıoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da çok sıkıldığım anlarda tek bir gülüşü ile beni neşelendiren biricik kızım Kayra Naz Çatık'a çok teşekkür ederim.

Nergiz Hürrem Aydoğan Çatık

Haziran, 2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	V
TABLolar LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
ÖZET.....	XI
SUMMARY.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Proteinlerin Yapı ve İşlevleri.....	2
1.1.1. Amino Asitlerin Sınıflandırılması.....	3
1.2. Peptidler ve Proteinlerin Yapıları.....	7
1.2.1. Birincil Yapı.....	8
1.2.2. İkincil Yapı.....	9
1.2.2.1. α -heliks Yapısı.....	9
1.2.2.2. β -konformasyonu.....	11
1.2.3. Üçüncül Yapı.....	13
1.2.4. Dördüncül Yapı.....	13
1.3. Protein Motifleri.....	14
1.4. Huntington Hastalığı.....	18
1.4.1. Klinik Özellikleri.....	18
1.4.2. Genetik Özellikler.....	19
1.4.3. Huntington Hastalığının Moleküler Patolojisi.....	20
1.4.3.1. Huntingtin Proteini.....	20
1.4.3.2. Mutant PoliQ Proteinleri ve Olası Nörodejeneratif Mekanizmalar.....	21
1.4.3.3. Toksik İşlev Kazanımı ve İşlev Kaybı.....	21

1.4.3.4. Mutant PoliQ Proteinlerinde Konformasyon Değişimi.....	21
1.4.3.5. Mutant Protein Agregasyonu.....	22
1.4.3.6. Mutant PoliQ Proteinlerinin Proteolizi.....	22
1.4.3.7. Şaperonların ve Übikütin-Proteozom Sisteminin Rolü.....	23
1.4.3.8. Özgün Nöron Ölümü.....	23
1.4.4. Proteinlerin Yapı Analizi.....	24
1.4.4.1. Homoloji Modellemesi	25
1.4.4.2. Katlanma Tahmini veya Hızlama.....	25
1.4.4.3. Ab initio ya da De novo Tahmini.....	28
2. AMAÇ.....	29
3. YÖNTEMLER.....	30
3.1. Protein Dizisinin Bulunması ve Formatlanması.....	30
3.1.1. Protein Özelliklerinin Araştırılması.....	32
3.2. Protein Yapı Analizi.....	36
3.2.1. Hizalama.....	38
3.2.2. LOOPP.....	39
3.2.3. VMD Moleküler Grafik Programı.....	41
3.2.3.1. Molekül Yükleme	42
3.2.3.2. Proteinin Görüntülenmesi.....	42
3.2.3.3. Farklı Çizim Stilleri.....	44
3.2.3.4. Renklendirme Yöntemleri.....	45
4. SONUÇLAR.....	46
4.1. Huntingtin Proteinin Özellikleri.....	46
4.1.1. Huntingtin Proteinin FASTA Formatı.....	48
4.1.2. BLAST Taraması.....	49
4.1.3. HEAT Motiflerinin Belirlenmesi.....	50
4.1.4. Sarılmış Sarmal Bölgelerinin Analizi.....	50
4.1.5. Transmembran Bölgelerinin Araştırılması.....	52
4.2. Huntingtin Proteinin Modelinin Çıkarılması.....	53
4.2.1. LOOPP.....	54
4.2.1.1. LOOPP'ta Görev Yüklenmesi.....	54
4.2.1.2. Sonuçların Yüklenmesi.....	55
4.2.2. VMD Programında Huntingtin Proteinin Modelinin	

Çıkarılması.....	56
4.2.3. Mutasyonların Modellenmesi.....	77
6. TARTIŞMA.....	83
7. KAYNAKLAR.....	91
8. ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Bir Amino Asitin Genel Yapısı.....	2
Şekil 1.2. Alanin Amino Asitindeki Stereoizomeri.....	3
Şekil 1.3. Polar Olmayan R Gruplarına Sahip Amino Asitler.....	5
Şekil 1.4. Aromatik R Gruplu Amino Asitler.....	5
Şekil 1.5. Polar, Yüksüz R Gruplu Amino Asitler.....	6
Şekil 1.6. Pozitif Yüklü R Gruplarına Sahip Amino Asitler.....	6
Şekil 1.7. Negatif Yüklü R Gruplarına Sahip Amino Asitler.....	7
Şekil 1.8. Proteinin Primer, Sekonder, Tersiyer ve Kuanterner Yapısı.....	8
Şekil 1.9. Polipeptitin Primer Yapısı.....	8
Şekil 1.10. α -heliks Yapısı.....	10
Şekil 1.11. α -heliksin Kararlı Yapısı.....	10
Şekil 1.12. α -heliksin Helezonik Dönme Şekli.....	11
Şekil 1.13. β -tabakada Polipeptid Zincirlerinin Birbirleri İle Antiparalel Konumu.....	11
Şekil 1.14. β -tabakada Polipeptid Zincirlerinin Birbirleri İle Paralel Konumu.....	12
Şekil 1.15. Paralel ve Antiparalel Yapıda Hidrojen Bağlarının Oluşum Düzeni.....	12
Şekil 1.16. Protein Motifleri.....	15
Şekil 1.17. β - α - β Halkasının Tekrarlanması Sonucu α/β Fıçısı Oluşumu.....	16
Şekil 1.18. Tümü α Organizasyonlu Proteinler.....	16
Şekil 1.19. Tümü β Organizasyonlu Proteinler.....	17
Şekil 1.20. α/β Organizasyonlu Proteinler.....	17
Şekil 1.21. $\alpha+\beta$ Organizasyonlu Proteinler.....	18
Şekil 1.22. Huntingtin Hastalığı Geninin 4p16.3'daki Lokalizasyonu.....	19
Şekil 1.23. Huntingtin Proteinin Önemli Bölgeleri.....	21

Şekil 1.24. Huntington Hastalığı Patogenezi.....	24
Şekil 1.25. Dizi Şablonlar.....	26
Şekil 1.26. Üçüncü Hizalamada, İncelenen Sekans, Şablonun Bir Köşesini Sekecek Şekilde Hizalanmıştır.....	27
Şekil 1.27. İki Ayrı Motife Hizalanan Edilen Protein.....	27
Şekil 3.1. NCBI İnternet Sitesinden Proteinin Bulunması.....	30
Şekil 3.2. Proteinin FASTA Formatının Bulunması.....	31
Şekil 3.3. FASTA Formatında Proteinin Parçalara Ayrılması.....	31
Şekil 3.4. NCBI İnternet Sayfasından BLAST Programına Ulaşım.....	32
Şekil 3.5. Uygun BLAST Programının Seçilmesi.....	33
Şekil 3.6. Araştırılan Dizinin BLAST Taraması.....	33
Şekil 3.7. ExPASy İnternet Sayfasında Proteinin Araştırılması.....	34
Şekil 3.8. Sarılmış Sarmal Yapılarının Araştırılması.....	35
Şekil 3.9. Yeni Proteinin Eklenmesi.....	36
Şekil 3.10. TMAP Araştırması.....	36
Şekil 3.11. LOOPP Programının Seçilmesi.....	40
Şekil 3.12. LOOPP Programına Görevin Verilmesi.....	41
Şekil 3.13. Molekül Yükleme.....	42
Şekil 3.14. Dönme Şekilleri.....	43
Şekil 3.15. Fare Modları.....	43
Şekil 3.16. Grafik Gösterimler Penceresi.....	44
Şekil 4.1. NCBI İnternet Sayfasında Huntingtin Proteinin Bulunması.....	46
Şekil 4.2. Huntingtin'in Amino Asit Dizilimi.....	47
Şekil 4.3. P42858 Kodu ile Tanımlanan Huntingtin Proteinini.....	48
Şekil 4.4. FASTA Formatında Huntingtin Proteinin 400'lük Parçalara Ayrılması.....	48
Şekil 4.5. Huntingtin Proteinin BLAST Sonuçları.....	49
Şekil 4.6. Sarılmış Sarmal Bölgelerinin Araştırılması.....	51
Şekil 4.7. Huntingtin Proteinin Sarılmış Sarmal Bölgeleri.....	51
Şekil 4.8. Huntingtin Proteinin Transmembran Bölgelerinin Araştırılması.....	52
Şekil 4.9. Huntingtinin Transmembran Özellik Gösteren Bölümleri.....	53
Şekil 4.10. Model Oluşturmak için Denenen Programlar.....	53

Şekil 4.11. http://cbsu.tc.cornell.edu/ İnternet Sayfasında LOOPP'a yönlendirme.....	54
Şekil 4.12. Protein400 Görevinin Yüklenmesi.....	55
Şekil 4.13. Sonlanmış Görevin Dosya Yükleme İşlemi.....	56
Şekil 4.14. En İyi Beş Sonucun Görüntülenmesi.....	56
Şekil 4.15. 1WA5_B Protein Modeli.....	57
Şekil 4.16. 1B3U_A Protein Modeli.....	57
Şekil 4.17. 1IBR_B Protein Modeli.....	58
Şekil 4.18. 1W9C_A Protein Modeli.....	58
Şekil 4.19. 1Q1S_C Protein Modeli.....	59
Şekil 4.20. HHpred ile 1WA5_B Protein Gösterimi.....	59
Şekil 4.21. 1PAI_A Protein Modeli.....	60
Şekil 4.22. a.86.1.1.1 Protein Modeli.....	60
Şekil 4.23. 1AO7_E Protein Modeli.....	61
Şekil 4.24. 1LP9_E Protein Modeli.....	61
Şekil 4.25. 1UP6_E Protein Modeli.....	62
Şekil 4.26. 2GO2_A Protein Modeli.....	62
Şekil 4.27. 1X9D_A Protein Modeli.....	63
Şekil 4.28. 1EE5_A Protein Modeli.....	63
Şekil 4.29. 1YA2_A Protein Modeli.....	64
Şekil 4.30. 1Q1S_C Protein Modeli.....	64
Şekil 4.31. 1EE5_A Protein Modeli.....	65
Şekil 4.32. 1WA5_B Protein Modeli	65
Şekil 4.33. 2F6H_X Protein Modeli.....	66
Şekil 4.34. 2GO2_A Protein Modeli.....	66
Şekil 4.35. 2F5U_A Protein Modeli.....	67
Şekil 4.36. a.118.1.14.3_A Protein Modeli	67
Şekil 4.37. 1ZEE_A Protein Modeli.....	68
Şekil 4.38. 1GAI Protein Modeli.....	68
Şekil 4.39. 1YA2_C Protein Modeli.....	69
Şekil 4.40. 1Q1S_C Protein Modeli.....	69
Şekil 4.41. 2GFP_A Protein Modeli.....	70
Şekil 4.42. 1IBR_B Protein Modeli.....	70

Şekil 4.43. 1U7G_A Protein Modeli.....	71
Şekil 4.44. a.118.5.1.1_A Protein Modeli.....	71
Şekil 4.45. 1Y2A_C Protein Modeli.....	72
Şekil 4.46. 2F5U_A Protein Modeli.....	72
Şekil 4.47. 1RH5_A Protein Modeli.....	73
Şekil 4.48. 1IBR_B Protein Modeli.....	73
Şekil 4.49. 1YMF Protein Modeli.....	74
Şekil 4.50. 1C3C_A Protein Modeli.....	74
Şekil 4.51. 1HZ4_A Protein Modeli.....	75
Şekil 4.52. a.118.4.1.1_A Protein Modeli.....	75
Şekil 4.53. 1XM9_A Protein Modeli.....	76
Şekil 4.54. 1N4M_A Protein Modeli.....	76
Şekil 4.55. 1Y2A_A Protein Modeli.....	77
Şekil 4.56. 1WA5_B-Mutant 10 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.57. 1WA5_B-Mutant 13 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.58. 1WA5_B-Mutant 14 Proteinlerinin Karşılaştırılması	79
Şekil 4.59. 1WA5_B-Mutant 15 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.60. 1WA5_B-Mutant 16 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.61. 1WA5_B-Mutant 20 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.62. 1WA5_B-Mutant 25 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.63. 1WA5_B-Mutant 30 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.64. 1WA5_B-Mutant 13 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	82
Şekil 4.65. 1WA5_B-Mutant 30 Proteinlerinin Karşılaştırılması.....	82

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1.1. Standart Amino Asitlerin Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	4
Tablo 3.1. Modelleme Programları.....	37
Tablo 4.1. Huntingtin HEAT Motifleri.....	50

KISALTMALAR LİSTESİ

BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BW	: Biology Workbench
DDBJ	: DNA Database of Japan
DRPLA	: Dentatorubral Pallidoluysiyan Atrofi
EBI	: European Bioinformatics Institute
EMBL	: European Molecular Biology Laboratory
EXPASY	: Expert Protein Analysis System
HD Protein	: Huntington Disease Protein
HH	: Huntington Hastalığı
htt	: Huntingtin
LOOPP	: Learning, Observing and Outputting Protein Patterns
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
Opendx	: Open Source Visualization Data Explorer
PDB	: Protein Data Bank
PIR	: Protein Information Resource
PoliQ	: Poliglutamin
SBMA	: Spinobulbar Müsküler Atrofi
SCA	: Spinoserebellar Ataksi
SCOP	: The Structural Classification of Proteins
SIB	: Swiss Institute of Bioinformatics
TM	: Transmembrane
TMAP	: Prediction of Transmembrane
VMD	: Visual Molecular Dynamics

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HUNTINGTİN PROTEİNİNİN
BİYOİNFORMATİK AÇIDAN İNCELENMESİ

Hazırlayan

Nergiz Hürrem Aydoğan Çatık

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy

Haziran, 2008

ÖZET

Biyolojik fonksiyonları açısından çok fazla çeşitlilik gösteren proteinler, genetik bilginin ifadelendiği moleküler araçlardır. Proteinler amino asitlerin dehidrate polimerleri olup, tümü yirmi amino asitin karakteristik diziler halinde kovalent olarak bağlanması ile oluşur. Proteinlerde bulunan yirmi yaygın amino asit α -karbon atomuna bağlı, α -karboksil grubu, α -amino grubu ve ayırt edici bir değişken (R) grubu içerirler. Bir proteinin yapısındaki atomların uzaysal düzenimi proteinlerin konformasyonu olarak adlandırılır. Proteinler için dört yapı düzeyi tanımlanmıştır; bunlar birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarıdır. Süper ikincil yapılar olan motifler veya katlanmalar, ikincil yapıda bulunan elemanların ve bunlar arasındaki

bağlantıların düzenimleridir. Motiflere dayalı protein organizasyonu genel olarak dört sınıfa ayrılabilir: tümü α , tümü β , α/β ve $\alpha+\beta$.

Protein yanlış katlanması rol oynadığı hastalıkların listesi gün geçtikçe büyümektedir ve nörodejeneratif hastalıklar en geniş grubu oluşturmaktadır. Bu hastalıklara yol açan selektif nörodejenerasyon mekanizmalarının çözülebilmesi, normal ve mutant durumdaki proteinlerin modellerinin oluşturulması ve yapılarının belirlenmesini gerektirmektedir. Bu sayede hastalıkların tedavisi yolunda da adımlar atılabilecektir. Yapı analizi ile proteinlerin 3D yapısını belirlemek için üç tane önemli tahmin yöntemi vardır: homoloji modellemesi, hizalama ve ab initio.

Huntington Hastalığı'nda mutasyona uğrayan huntingtin proteininde ard arda tekrar eden glutamin amino asitlerinin sayılarında artış olmaktadır. Bunu takiben de protein konformasyonunda değişimler, mutant protein agregatları ve selektif nöron ölümü gözlemlenmektedir. Bu çalışmada VMD programı kullanılarak htt protein modeli oluşturulmuş ve protein üzerinde glutamin artışı mutasyonları oluşturularak protein konformasyonundaki değişim gösterilmeye çalışılmıştır. Normal ve mutant proteinin karşılaştırılmasında mutant proteinin yapısında dönüş ve sarmal yapılarının arttığı, α -heliks yapılarının kısaldığı gözlenmiştir. Bu durumda protein kendi içinde veya diğer proteinlerle kovalent olmayan bir etkileşime girerek kıvrımlı β tabakaları şeklinde ikincil bir yapı oluşturarak çökebilir. Mutant proteinin yapısının ortaya çıkarılması, moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına ve bu doğrultuda çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Huntington Hastalığı, huntingtin, protein yapı analizi, VMD, hizalama

SUMMARY

Proteins, showing considerable variation in terms of their biological functions, are the molecular instruments with which genetic information is described. Proteins are the dehydrated polymers of amino acids and are formed by the covalent bonding of twenty amino acids in linear series. Twenty common amino acids include α -carboxyl group, α -amino group and a distinctive R (variable) group, bonded to the α -carbon atom. The spatial leveling of the atoms in the structure of a protein is called the conformation of proteins. Four structure levels have been defined for proteins; primary, secondary, tertiary and quaternary structures. The motives or simple folding in the super secondary structures are the leveling of the elements in the secondary structure and the connections between them. Motives can be seen as units from simple to complex or sometimes repetitive units or their combinations. Folding of polypeptides depends on the arrangement of both physical and chemical limitations. Protein organization based on motives can generally be divided into four classes: all α , all β , α/β and $\alpha+\beta$.

The list of the diseases led by the wrong folding of proteins increases day by day and neurodegenerative diseases constitute the largest group among them. The mechanisms leading to selective neurodegeneration can be explored via modeling the normal and mutant forms of the proteins and analyzing their structures. With this information, studies regarding disease therapy can be initiated. In order to determine the 3D structure of the proteins with structure analysis, there are three important estimation methods, which are homology modeling, hizalama and ab initio.

In Huntington's Disease, glutamin amino acids are expanded in the mutant huntingtin protein. This is followed by conformational changes in the protein, mutant protein aggregation and selective neuron death. In this study, VMD programme is used to model the htt protein and changes in the protein structure is analyzed through forming glutamin expansion mutations. In the comparison of normal and mutant protein, it has been observed that the turn and coil structures are increased and α -helix structures are shorter. In this situation, protein may gain non-covalent interactions within itself or other proteins and aggregate in the form of twisted β sheets. Determination of the structure of the mutant protein, will light the way of

better understanding of the molecular mechanism and developing certain treatment methods.

Key words: Huntington's Disease, huntingtin, protein structure analysis, VMD, threading

1. GİRİŞ

Tüm proteinler, yapı ve fonksiyonlarını belirlemek için gerekli bilgiyi amino asit dizilerinde barındırırlar. Protein yapılarının aydınlatılması için kullanılan spektroskopik teknikler, optik dağılım metodları, X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans gibi geleneksel teknikler oldukça güçlü yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin uygulanması ve sonuç elde edilmesi uzun zaman alır, deneyimli personelle birlikte teknik donanımlı laboratuvar şartlarını gerektirir (Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, 1998, s.246). Bu nedenle sürekli belirlenen protein sekanslarının sayısı ve belirlenmiş olan protein yapısı sayısı arasında büyük uçurum vardır (The Proteomics Handbook, 2003, s.2). Bu açığın kapatılması, biyoinformatik araçlarla protein yapı tahmini metodları üzerinde yoğunlaşılması ile mümkün olabilir. Bu tekniklerin primer biyokimyasal verilerle birlikte kullanımı protein yapı ve fonksiyonunun aydınlatılması için çok güçlü bir sinerji yaratır.

Sürekli üretilen biyolojik bilgilerin kullanılabilmesi için öncelikle organize edilmeleri gerekmektedir. Biyoinformatik bilim dalının temel amacı da, biyolojik bilgilerin yaratılması ve saklanması için veritabanlarının oluşturulmasıdır. Bu alanda oluşturulan veritabanlarının büyük bir kısmı nükleik asitlere ait bilgileri içermektedir. Nükleik asit dizi bilgilerinin organizasyonu ve depolanması görevini üstlenmiş üç kuruluş vardır: Genbankası (GenBank), Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (EMBL) ve DNA Japonya Veritabanı (DDBJ) (Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, 1998, s.16; Biyoinformatik Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, 2004, s.9). Protein veritabanları ise nükleotid veritabanlarından daha önce oluşturulmuştur. Protein dizi verilerini toplayan ve kullanıma sunan üç önemli hizmet sağlayıcı bulunmaktadır: Swiss-Prot, Protein Bilgi Kaynağı Veritabanı (PIR) ve Protein Veritabanı (PDB) (Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, 1998, s.49).

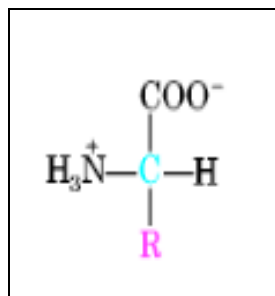
Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Huntington Hastalığı'na yol açan mutant huntingtin proteininin ve aynı zamanda normal huntingtin (htt) proteininin yapısının ve işlevinin belirlenmesi bugüne kadar mümkün olamamıştır (Andrade ve Bork, 1995). Bunun başlıca sebebi htt proteininin diğer proteinlerle yapısal bir

homolojisinin olmamasıdır. Huntington Hastalığı'na yol açan mutasyon, gendeki CAG tekrar sayılarındaki ve dolayısıyla proteinde kodlanan glutamin amino asitindeki artıştır (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Normal ve artmış glutamin sayılı mutant huntingtin proteinlerinin yapılarının aydınlatılması, proteinin fonksiyonunun ve dolayısıyla hastalık mekanizmasının aydınlatılmasında yarar sağlayacaktır.

Proteinlere ait yapı analizi çalışmaları son yıllarda oldukça yol kat etmiştir. Proteinlerin yapı tahmini için homoloji modellemesi, hizalama ve Ab initio olmak üzere üç önemli tahmin yöntemi vardır (Bioinformatik Sequenz-Struktur-Funktion, 2001, s.114; Bioinformatik Eine Einführung, 2003, s.4; Angewandte Bioinformatik, 2004, s.124). Bu yöntemlerle elde edilecek sonuçlar, laboratuvar çalışmaları sonucu elde edilen biyokimyasal verilerle birleştirilerek protein yapıları daha kısa sürede ve daha güvenilir bir şekilde saptanabilecektir.

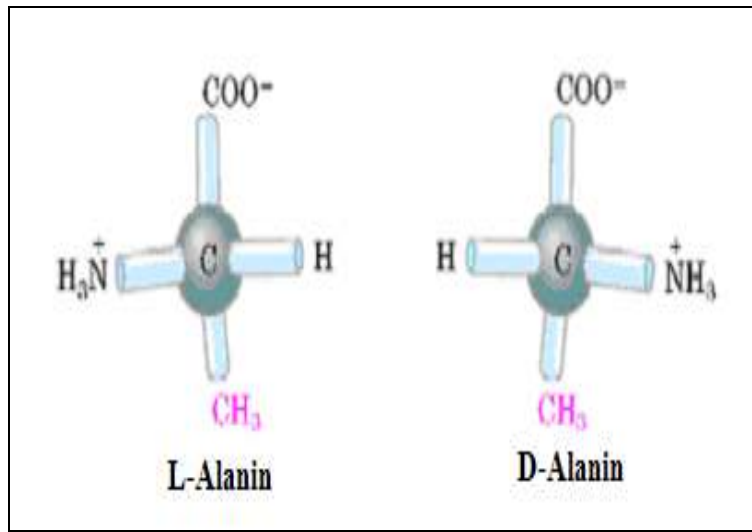
1.1. Proteinlerin Yapı ve İşlevleri

Biyolojik fonksiyonları açısından çok fazla çeşitlilik gösteren proteinler, genetik bilginin ifadelendiği moleküler araçlardır. Proteinler amino asitlerin dehidrate polimerleri olup, tümü yirmi amino asitin karakteristik diziler halinde kovalent olarak bağlanması ile oluşur. Bu yirmi amino asit, proteinlerdeki kompozisyon ve dizilimlerini belirtmek amacı ile kullanılan üç harfli kısaltma veya tek harfli sembol ile gösterilir. Proteinlerde bulunan yirmi yaygın amino asit, α -karbon atomuna bağlı α -karboksil grubu, α -amino grubu ve ayırt edici bir değişken grubu (R) içerir (Şekil 1.1.) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.116).



Şekil 1.1. Bir amino asitin genel yapısı
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.116)

Glisin dışındaki amino asitlerde α -karbon atomu asimettir ve kiral merkezdur. α -karbon atomuna bağlanan dört farklı grup, ayna görüntüsü kendisi ile çakışmayan iki farklı uzaysal dzlenim oluşturur. Bu sayede amino asitler optikçe aktif stereoizomer çiftleri şeklinde (D ve L-stereoizomer) varolabilir (şekil 1.2.). Yine de proteinlerde sadece L-stereoizomerleri bulunur (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.117).



şekil 1.2.Alanin amino asitindeki stereoizomeri
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.117)

1.1.1. Amino Asitlerin Sınıflandırılması

Amino asitler R gruplarının pH 7.0'deki polaritesi ve yüküne göre suyla tepkimeye girme eğilimlerine göre beş ana sınıfta gruplandırılır (Tablo 1.1.) (Biyokimya, 1997, s.2).

Polar olmayan alifatik amino asitlerin R grupları polar özelliği taşımayıp, hidrofobiktir. Bu amino asit sınıfında glisin, alanin, valin, lösin, metiyonin ve izolösin yer alır (şekil 1.3.) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.118).

Aromatik amino asitler olan aromatik yan zincirli fenilalanin, tirozin ve triptofan, göreceli polar olmayan (hidrofobik) amino asitlerdir (şekil 1.4.) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.119).

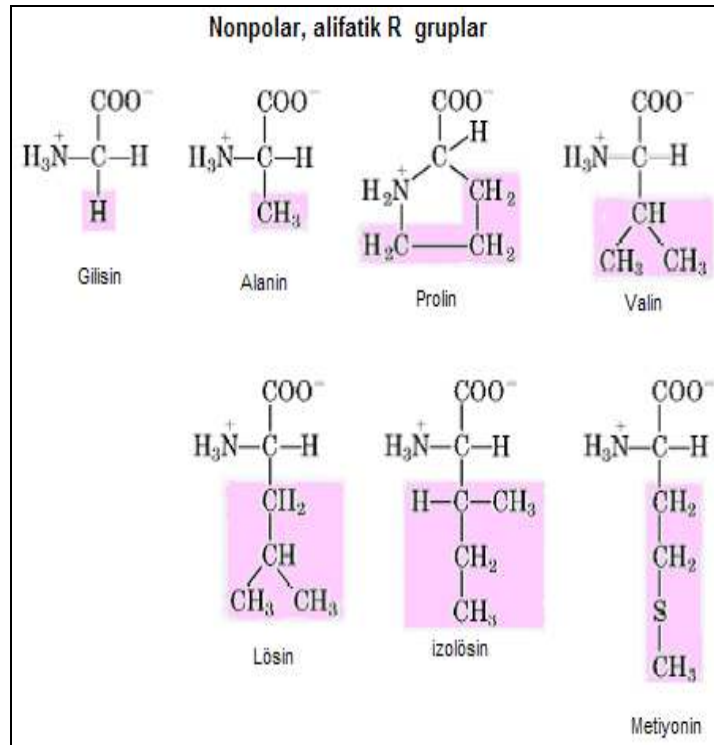
Tablo 1.1. Amino asitlerin özellikleri ve sınıflandırılması
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.116)

Aminoasit	Kısaltma / Sembol	M _r	pK _a değerleri			P _i	Hidropati endeksi	Proteinlerde oluş (%)
			pK ₁ (-COOH)	pK ₂ (NH ₃ ⁺)	pK _a (R grubu)			
Nonpolar, alifatik R grupları								
Glisin	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	-0.4	7.2
Alanin	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Prolin	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Valin	Val V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Lösin	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
İzolösin	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Metionin	Met M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatik R grupları								
Fenilalanin	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tirosin	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.3	3.2
Triptofan	Tıp W	204	2.38	9.39		5.89	-0.9	1.4
Polar, yüksüz R grupları								
Serin	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	-0.8	6.8
Treonin	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	-0.7	5.9
Sistein	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparajin	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	-3.5	4.3
Glutamin	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	-3.5	4.2
Positif yüklü R grupları								
Lizin	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidin	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginin	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1
Negatif yüklü R grupları								
Aspartat	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.5	5.3
Glutamat	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.5	6.3

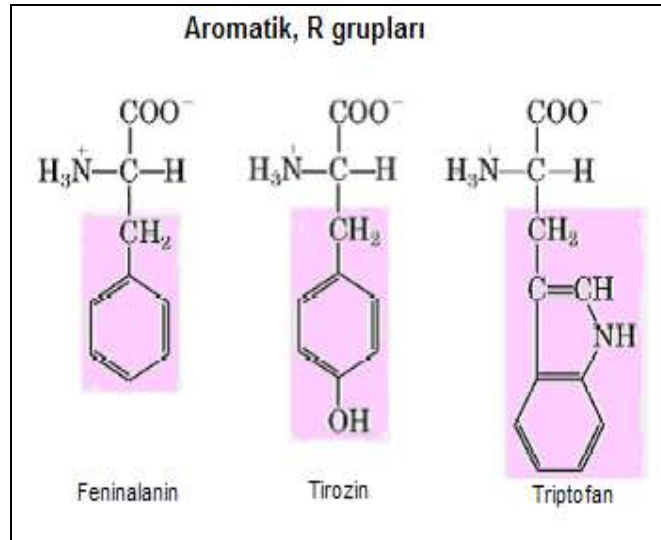
Polar yüksüz amino asitlerin içerdikleri işlevsel gruplar suyla hidrojen bağı yapar, polar olmayan amino asitlere göre suda daha iyi çözünebilir ve daha hidrofildir. Bu grupta yer alan amino asitler serin, treonin, sistein, prolin, asparajin ve glutamindir (Şekil 1.5.) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.120).

Bazik amino asitler pH 7.0'de pozitif yüklü R grubu içerirler. Bu sınıfta yer alan amino asitler lizin, arjinin ve histidindir (Şekil 1.6) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.120).

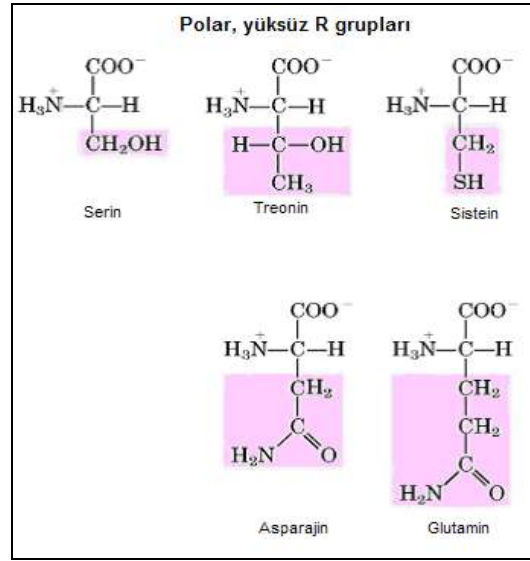
Asidik amino asitler pH 7.0'de net negatif yüklü R grubu içeren ve ikinci karboksil grubuna sahiptir. Bu amino asit sınıfında aspartat ve glutamat yer alır (Şekil 1.7) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.120).



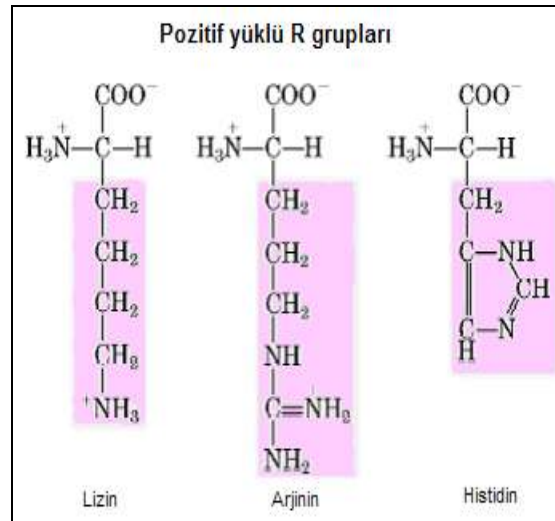
Şekil 1.3. Polar olmayan R gruplarına sahip amino asitler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.119)



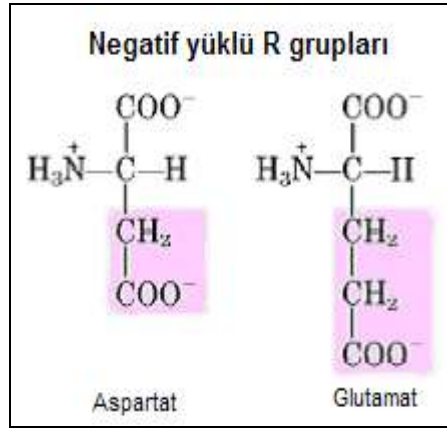
Şekil 1.4. Aromatik R Grupu amino asitler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.119)



Şekil 1.5. Polar, yüksüz R gruplu amino asitler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.119)



Şekil 1.6. Pozitif yüklü R gruplarına sahip amino asitler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.119)



Şekil 1.7. Negatif yüklü R Gruplarına sahip amino asitler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.119)

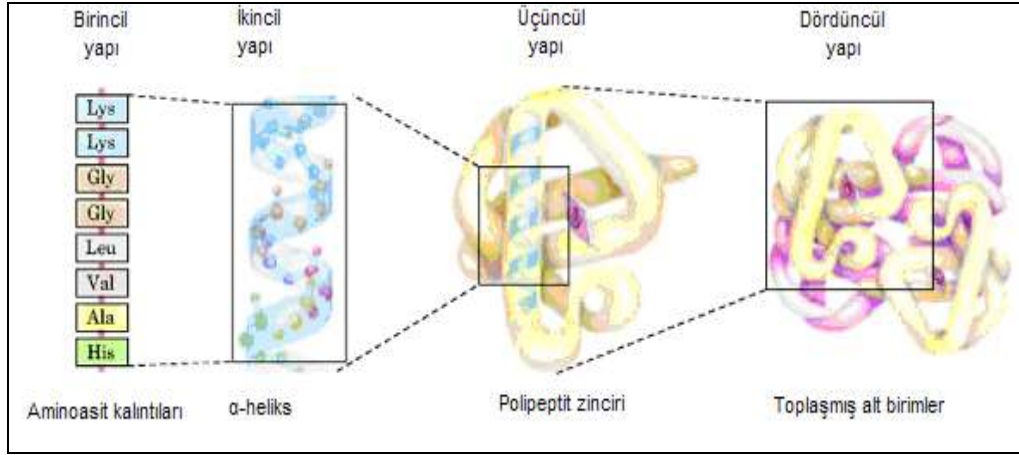
1.2. Peptitler ve Proteinlerin Yapıları

İki amino asit molekülünün peptit bağı olarak adlandırılan bir amid bağı ile kovalent olarak bağlanması sonucunda dipeptit oluşur. Bu bağı bir aminoasidin α -karboksil grubu ile diğer amino asidin α -amino grubu arasında dehidratasyon ile oluşur. Üç amino asidin iki peptit bağı ile bağlanması sonucu tripeptit, yine aynı şekilde amino asitlerin bağlanması ile tetrapeptitler, pentapeptitler meydana gelir. Böylece az sayıda amino asidin bağlanması ile oluşan yapıya oligopeptit, çok sayıda amino asidin bağlanmasıyla oluşan yapıya da polipeptit adı verilir. Polipeptit terimi çoğu zaman protein terimi ile birbirlerinin yerlerine kullanılsa da, polipeptitlerin moleküler ağırlığı genel olarak onbinin altındadır.

Basit proteinler sadece amino asitlerden oluşup başka kimyasal grup içermezler. Ancak bazı proteinler amino asitlere ek olarak kalıcı kimyasal gruplar içerirler ki, bu proteinlere konjuge (birleşik) proteinler denir. Konjuge proteinin amino asit olmayan kısmına prostetik grup adı verilir. Prostetik grubun kimyasal yapısı temel alınarak konjuge proteinler; lipoproteinler, glikoproteinler, fosfoproteinler, hemoproteinler, flavoproteinler ve metalloproteinler olarak altı gruba ayrılır.

Bir proteinin yapısındaki atomların uzaysal düzenlenimi proteinlerin konformasyonu olarak adlandırılır. Bu anlamda, proteinler için dört yapı düzeyi

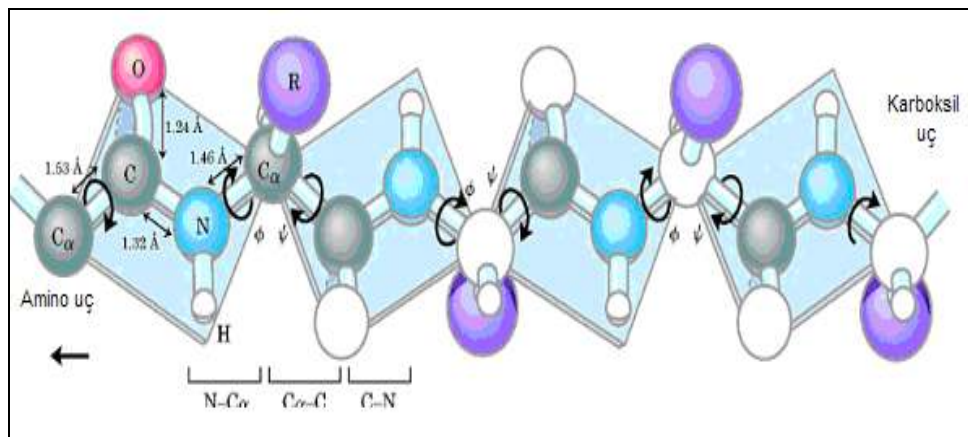
tanımlanmıştır. Primer (birincil), sekunder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuaterner (dördüncül) yapı (Şekil 1.8.) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.129).



Şekil 1.8. Proteinin primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapısı
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.129)

1.2.1. Birincil Yapı

Polipeptitin bir ucundaki amino asit serbest bir α -amino grubuna, diğer ucundaki amino asit ise serbest bir α -karboksil grubuna sahiptir (Şekil 1.9.). Amino asitlerin N-ucundan C-ucuna olan ve primer kimyasal bağların gösterildiği dizisi polipeptitin primer yapısıdır. Bu yapıda amino asitler arasındaki potansiyel etkileşimler hesaba katılmaz (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.162).



Şekil 1.9. Polipeptitin primer yapısı
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.162)

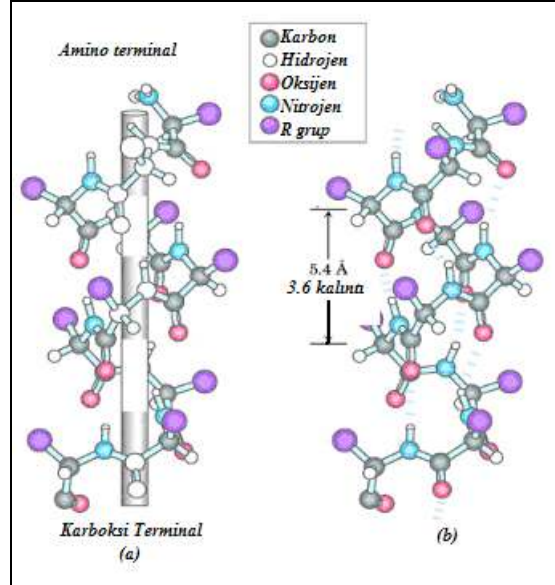
1.2.2. İkincil Yapı

Sekonder yapı, hidrojen bağları ile kararlı kılınan, düzenli tekrarlanan yapıları işaret eder. Diğer bir deyişle, sekonder yapıda ana zincirde oluşan hidrojen bağları ön plana çıkar, polipeptit zincirinde birbirine komşu olan amino asitlerin oluşturduğu, düzenli ve tekrarlayan konfigürasyonlar gösterilir. İkincil yapının özellikle birkaç tipi kararlıdır, bunlar protein yapısında en yaygın olarak bulunan α -heliks (α -sarmal) ve β -yaprağı konformasyonlarıdır. İkincil yapılar yerel olduğu için bir proteinin içinde farklı ikincil yapılara sahip pek çok bölge olabilir (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.163).

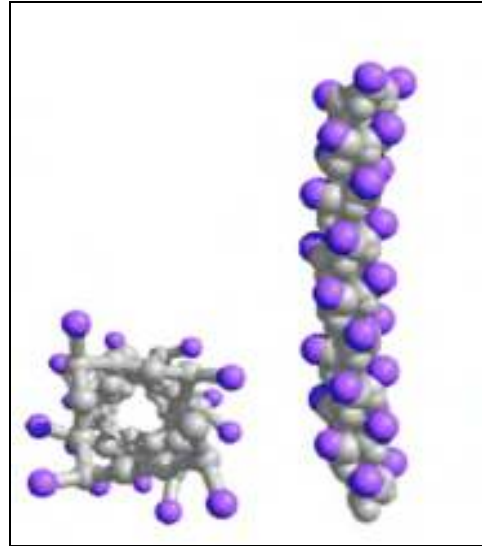
1.2.2.1. α -heliks Yapısı

Polipeptit zincirinin en basit düzlemi α -heliks olarak adlandırılan helezonik yapıdır. Bu helezonik yapıda, polipeptit iskeleti, heliks ortasından uzunlamasına aşağı doğru inen hayali bir eksen çevresinde, amino asitlerin R gruplarının heliks iskeletinden dışarı doğru yönelmesi ile sıkıca sarmalanmıştır. Eksen boyunca tekrarlayan birim, heliksin tek bir dönüşüdür ve yaklaşık 5.4 \AA uzunluğunda, 3.6 amino asit kalıntısı içermektedir. α -heliks yapısı, peptit bağının elektronegatif azot atomuna bağlı azot atomu ile bu peptit bağının amino terminal ucu kısmında bulunan dördüncü aminoasidin elektronegatif karbonil oksijen atomu arasında bulunan bir hidrojen bağı ile sabitlenir (Şekil 1.10.). α -heliksin ardışık dönüşleri bir sonraki dönüşle üç-dört hidrojen bağı yaparak bir arada tutulmakta ve bu da heliks yapısının tamamına önemli ölçüde kararlılık sağlamaktadır (Şekil 1.11.) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.164).

Polipeptitlerdeki amino asitlerin yaklaşık dörtte biri α -helikslerin yapısında olup helezonik dönme şekli sağ el dönüşlü heliks tarzındadır (Şekil 1.12.). Ancak kesin oran proteinden proteine büyük değişiklik gösterir (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.165).



Şekil 1.10. α -heliks yapısı (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.164)



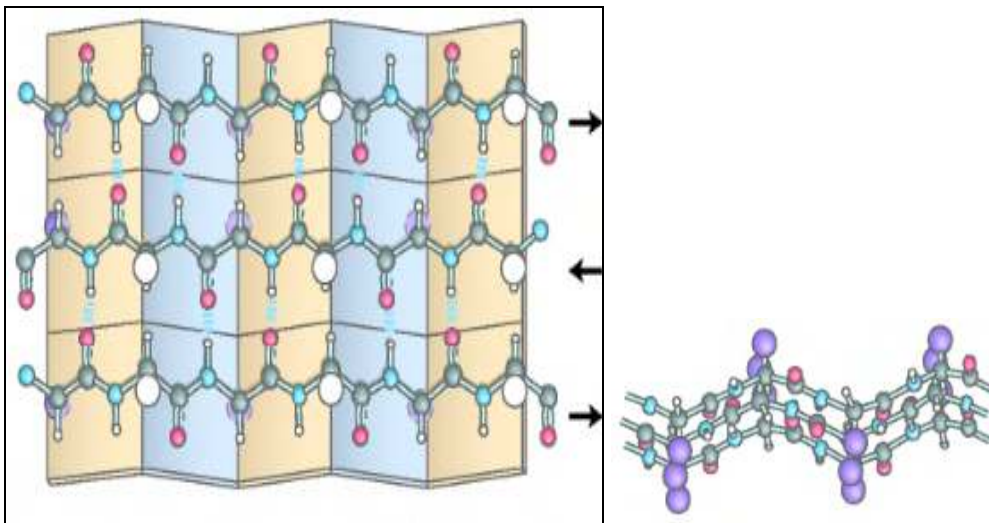
Şekil 1.11. α -heliksin kararlı yapısı
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.164)



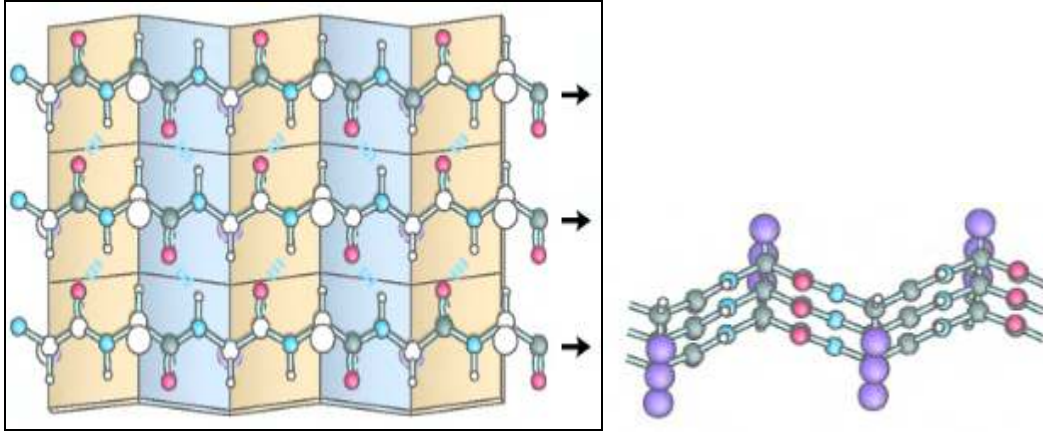
Şekil 1.12. α -heliksin helezonik dönme şekli
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.116)

1.2.2.2. β -konformasyonu

β -konformasyonundaki polipeptit zincirinin iskeleti zigzag yapısında uzayarak pliseye benzer bir yapı oluşturacak şekilde, yan yana gelerek düzenlenir. Bu düzen içinde hidrojen bağları polipeptit zincirinin bitişik kısımları arasında oluşur ve β tabaka olarak adlandırılır. β tabakada bulunan bitişik polipeptit zincirleri birbirleriyle antiparalel (Şekil 1.13.) veya paralel (Şekil 1.14.) konumda olabilir (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.166).

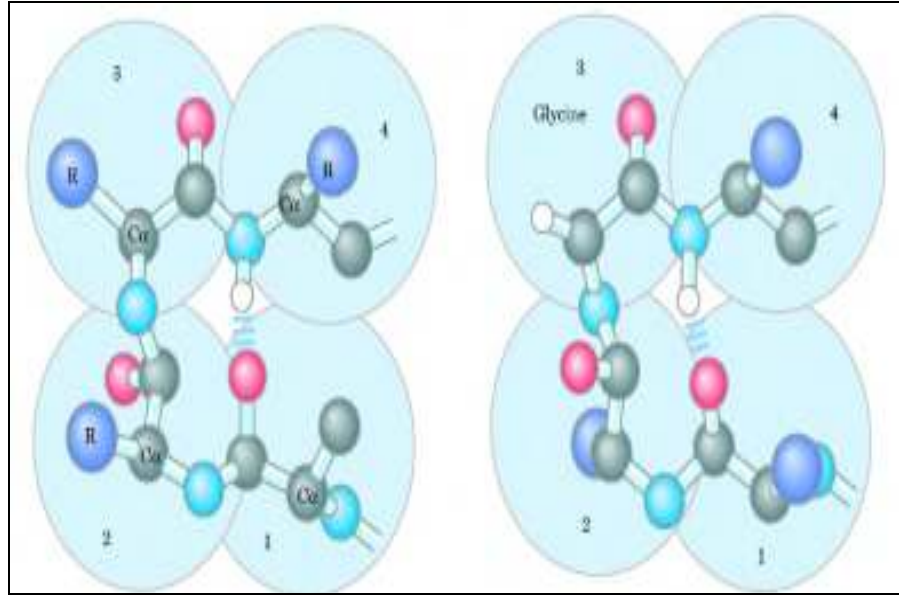


Şekil 1.13. β -tabakada polipeptid zincirlerinin birbirleri ile antiparalel konumu
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.167)



Şekil 1.14. β tabakada polipeptid zincirlerinin birbirleri ile paralel konumu
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.167)

Paralel yapıda tekrarlayan birim 6.5 \AA iken antiparalel yapıda tekrarlayan birim 7 \AA uzunluğundadır ve hidrojen bağlarının oluşum düzeni farklı olmasına rağmen birbirlerine oldukça benzemektedirler (Şekil 1.15) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.166).



Şekil 1.15. Paralel ve antiparalel yapıda hidrojen bağlarının oluşum düzeni
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.168)

β -kıvrımlar özellikle antiparalel β -tabakasının iki bitişik ucunu bağlayan, sık sık rastlanan yapılardır. Bu yapı dört amino asit içeren 180° 'lik bir dönüş olup, ilk

amino asidin karbonil oksijeni ve dördüncü amino asidin amino grubunun hidrojeni arasında hidrojen bağı oluşturur. Ancak merkezde bulunan iki amino asit kalıntısının peptit grupları, amino asitler arasındaki hidrojen bağı oluşumuna hiç katılmazlar. Kısaca proteinin yüzeyine yakın yerlerde ve kıvrımın merkezdeki iki amino asidine ait peptit gruplarının suyla hidrojen bağı yapabildiğine sık rastlanır. Üçlü heliks sekonder yapısı, üç polipeptit zincirinin iç içe dönerek kuvvetli bir yapı oluşturmasıdır. Ancak proteinlerde yaygın olarak bulunmaz (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.168).

1.2.3. Üçüncül Yapı

α - heliks, β -tabakalar ve diğer az rastlanan sekonder yapılar üç boyutlu düzenlenerek polipeptidin tersiyer yapısını oluşturur. Katlanma, hidrofilik yan zincirlere sahip amino asitlerin suyla veya çözücü iyonlarla temas kurabileceği proteinin dış kısmına, hidrofobik yan zincire sahip amino asitlerin proteinlerin iç kısmına yerleşmesi ile gerçekleşir. Bu yerleşim tersiyer yapıya kararlılık sağlar. Yan zincirler arasında görülen Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ile amino asitlerin non-polar yan zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimler gibi non-kovalent ilişkiler tersiyer yapıyı bir arada tutmaya yardımcı olur (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.170).

1.2.4. Dördüncül Yapı

Proteinlerin çoğu iki veya daha fazla polipeptit zincirlerinden meydana gelmiştir. Bu zincirler aynı veya farklı yapıda olabilirler. Tersiyer yapıyı kararlı halde tutan benzer kuvvetler, bu alt üniteleri de bir arada tutar. Proteinin bu alt birimlerinin üç boyutlu kompleksler şeklinde düzenlenimleri dördüncül (kuaterner) yapı olarak adlandırılır. Bu yapı çok büyük protein moleküllerine imkan tanımakla beraber, farklı aktiviteleri tek bir yapıda birleştirerek proteine daha geniş fonksiyonellik kazandırır.

Yapıyı oluşturan bu seviyelere ek olarak, proteinler işlevlerini görürken birbiriyle ilişkili bir yapıdan başka bir yapıya geçmeleri de protein yapısının diğer bir

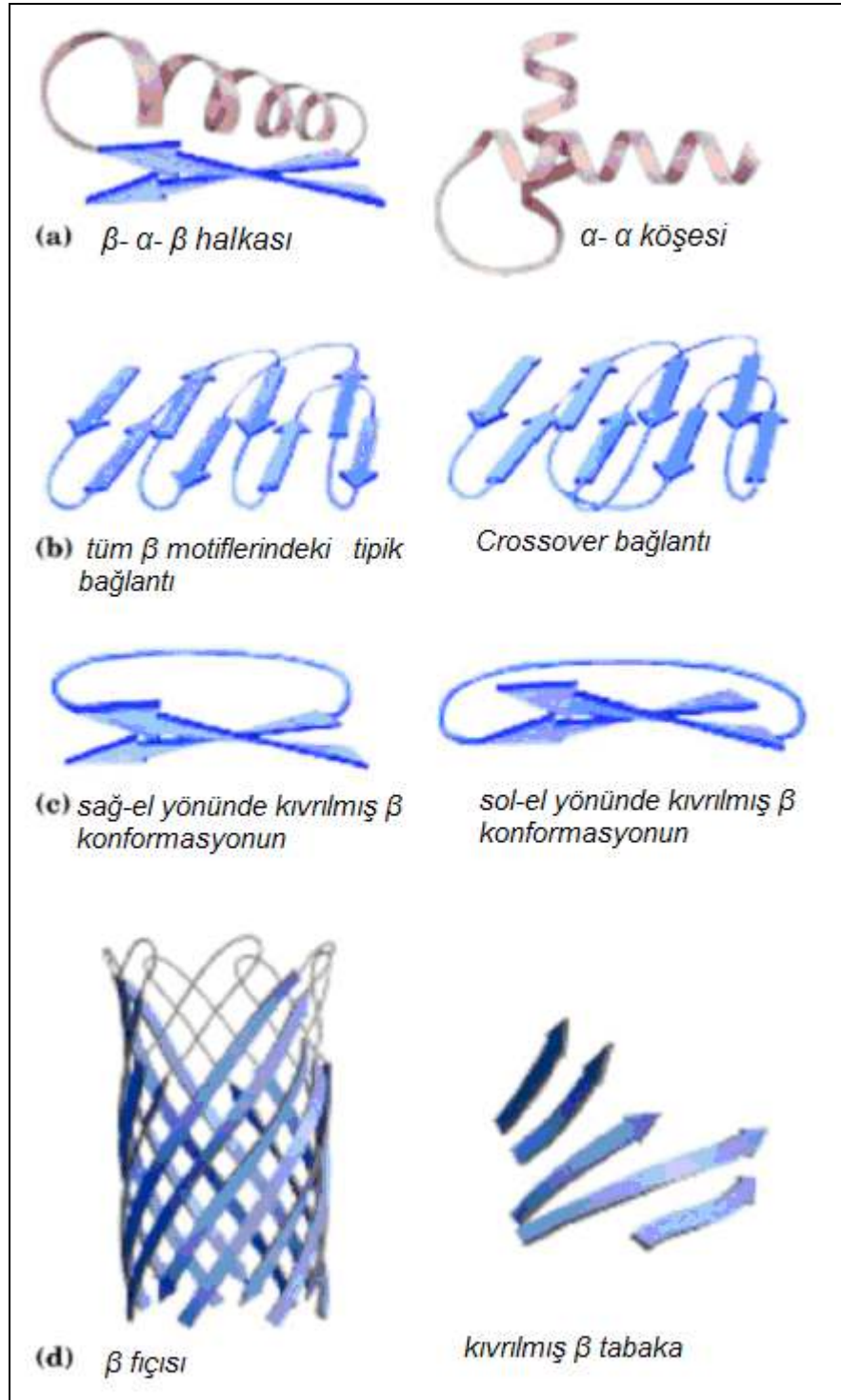
boyutunu oluşturur. Bu üçüncül veya dördüncül yapılarına proteinin "konformasyonları" denir ve bunlar arasındaki geçişlere konformasyonel değişim adı verilir (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.170) .

1.3. Protein Motifleri

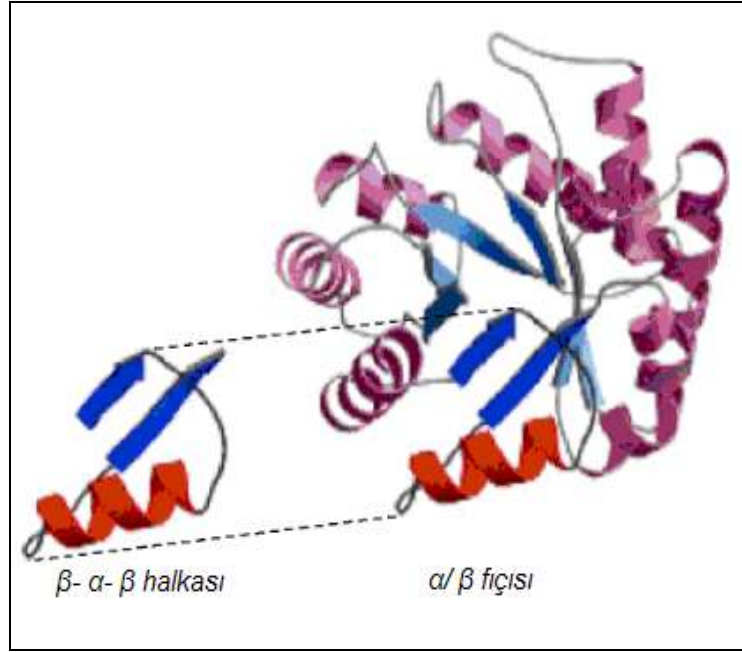
Üçüncül yapıdaki karmaşıklık alt yapıların incelenmesi ile azaltılmaktadır. Süper ikincil yapılar olan motifler veya basitçe katlanmalar, ikincil yapıda bulunan çeşitli elemanların ve bunlar arasındaki bağlantıların düzenlenimleridir. Motifler bazen basitten karmaşığa kadar uzanan bazen de tekrarlayan birimler ya da bileşimleri şeklinde görülürler. Polipeptitlerin katlanması hem fiziksel hem de kimyasal sınırlamaların düzenlenmesine bağlıdır. Protein yapılarının kararlılığında hidrofobik etkileşimlerin önemli katkısı vardır. Bu nedenle hidrofobik amino asit R gruplarının su dışarıda olacak şekilde gömülü olması en az iki tabakalı bir süper ikincil yapıyı oluşturur. Bu iki tabakalı yapıyı β - α - β halkası ve α - α köşesi gibi basit motifler oluşturur (Şekil 1.16.a-b) . İkincil yapının elemanları arasındaki bağlantılar birbirleri ile çapraz ya da düğüm oluşturmaz. Her bir parçanın sağ-el yönünde hafifçe kıvrıldığı durum β -konformasyonunun en kararlı halidir (Şekil 1.16.c.). Daha büyük bir çok yapının çekirdeğini oluşturan β -fiçisi ve kıvrılmış β -tabaka (Şekil 1.16.d.) bir çok parçanın bir araya geldiği yapıda bulunan β -tabakaların özgün olarak kıvrılması ile oluşur (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.184).

Bu kurallar çerçevesinde basit motiflerden daha karmaşık motifler oluşturulabilir. Basit bir motif olan β - α - β halkasının tekrarlanması ile daha kararlı ve yaygın bir motif olan α / β fiçisi olarak bilinen yapı oluşturulur (Şekil 1.17.) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.184).

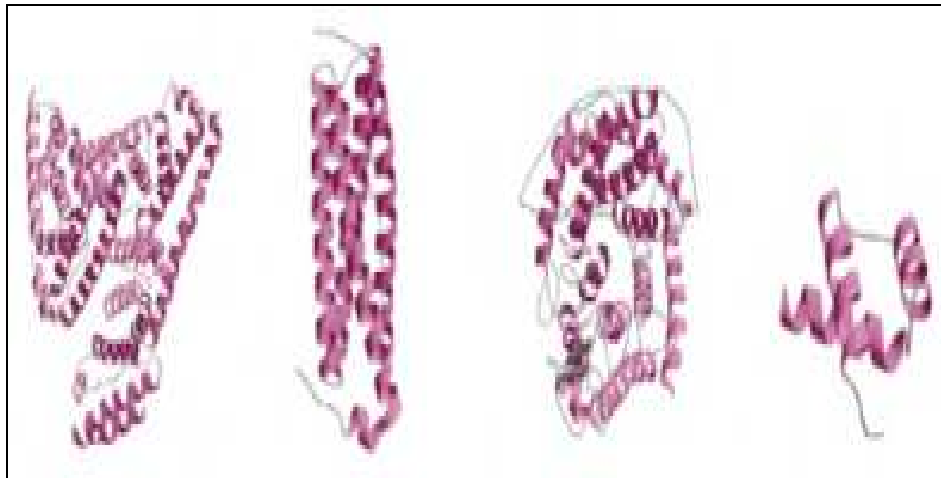
Motiflere dayalı protein organizasyonu genel olarak dört sınıfa ayrılabilir: tümü α , tümü β , α / β ve α + β . Proteinlerin yapısal sınıflandırılması SCOP ("Structural Classification Of Proteins") veritabanı ile sağlanmaktadır (Şekil 1.18-1.21) (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.184).



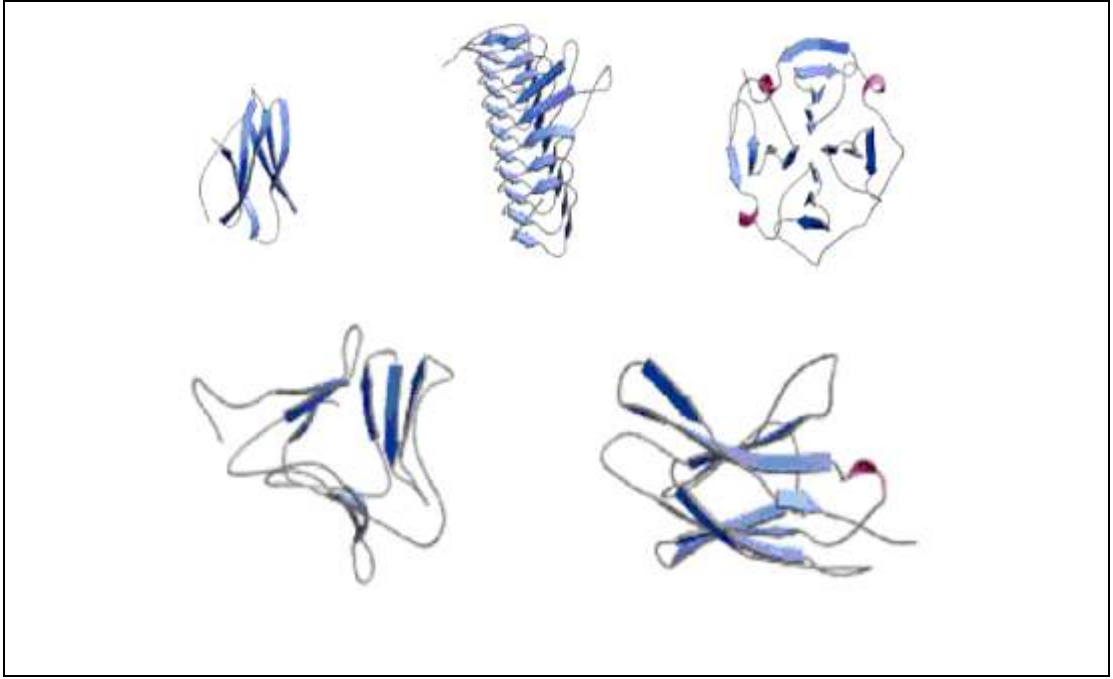
Şekil 1.16. Protein motifleri (Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.185)



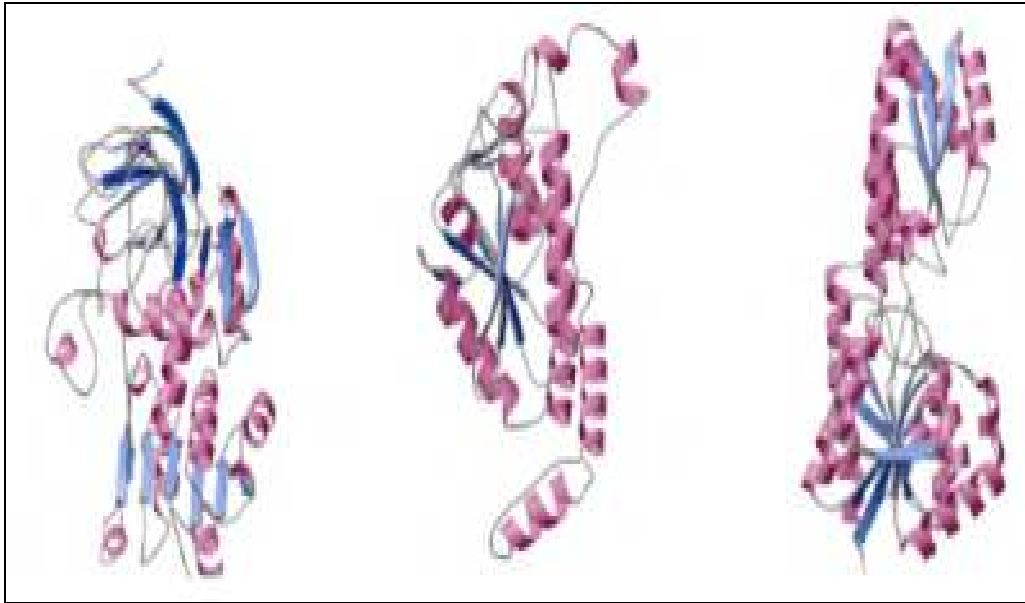
Şekil 1.17. β-α-β halkasının tekrarlanması sonucu α/β fiçisi oluşumu
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.185)



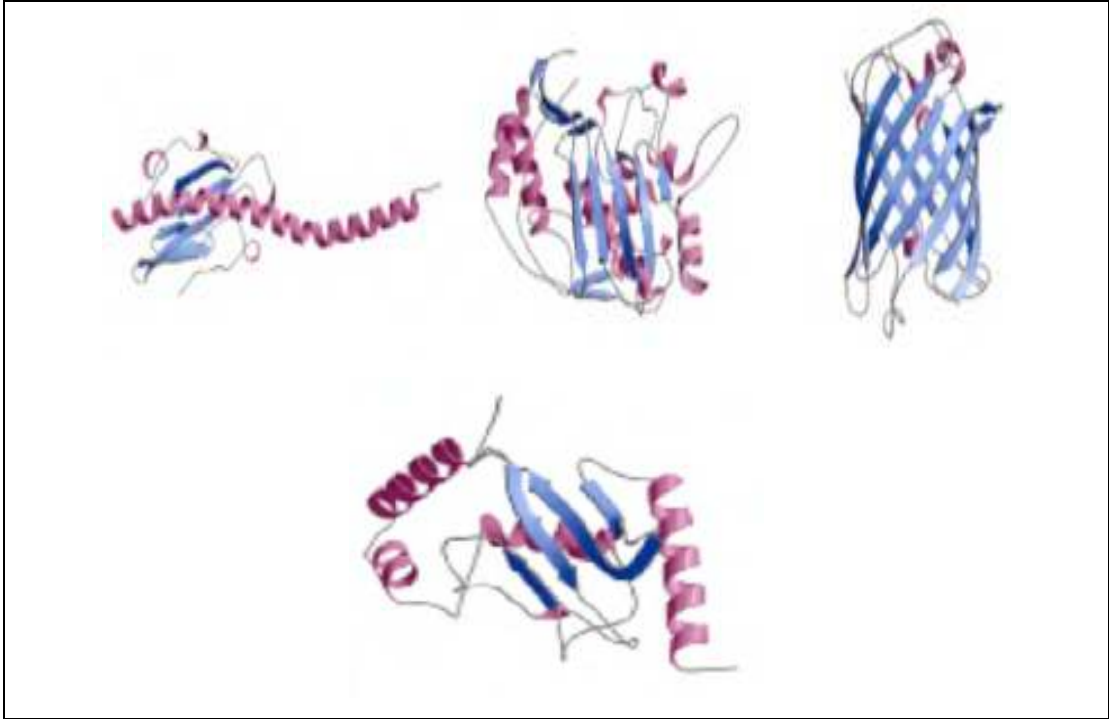
Şekil 1.18. Tümü α organizasyonlu proteinler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.186)



Şekil 1.19. Tümü β organizasyonlu proteinler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.186)



Şekil 1.20. α/β organizasyonlu proteinler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.187)



Şekil 1.21. $\alpha+\beta$ organizasyonlu proteinler
(Lehninger Principles of Biochemistry, 2000, s.187)

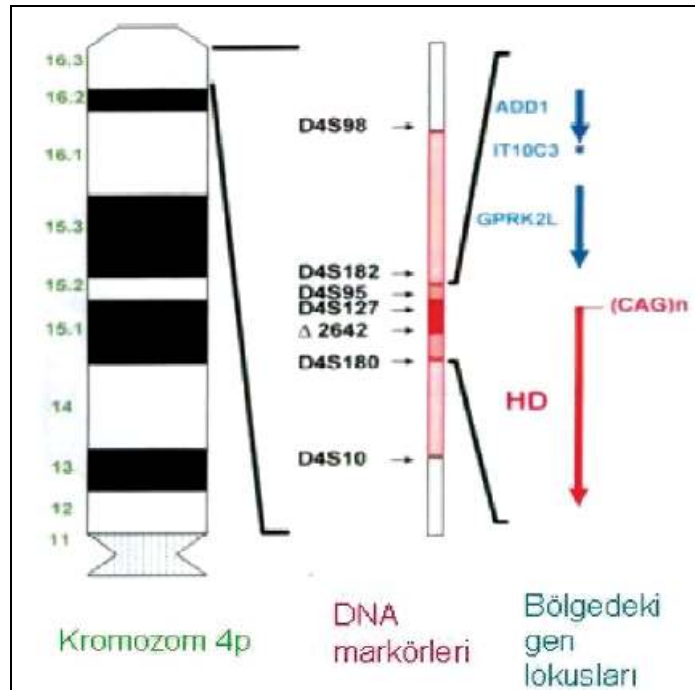
1.4. Huntington Hastalığı

1.4.1. Klinik Özellikleri

Dr. George Huntington ilk kez 1872 yılında Huntington Hastalığını dominant geçişli, geç-başlangıçlı, progresif ve ölümcül bir hastalık olarak tanımladı (Huntington, 1872). Huntington Hastalığı (HH) otozomal dominant geçişli ve santral sinir sistemini etkileyen, kronik, nörodejeneratif bir hastalıktır (Bates vd., 2002). Batı Avrupa'da görülme sıklığı 3-7/100.000'dir. Geç-başlangıçlı bir hastalık olarak bilinen HH'nin klinik semptomları genellikle 30-40'lı yaşlarda ortaya çıkar ve 10-20 sene içinde ölümlle sonuçlanır (Ho vd., 2001). Olguların %10'u erken başlangıçlıdır (juvenil form), bu durumda hastalık daha şiddetli ve hızlı seyrederek (Kremer, 2002). Huntington Hastalığı'nın klinik özellikleri motor, psikiyatrik ve kognitif bozukluklar olmak üzere üç grupta tolanabilir (Van vd., 1986). İlk tanımlandığı yıllarda hastalığa adını veren kore, hastalığın en çarpıcı semtomudur (Penney vd., 1990).

1.4.2. Genetik Özellikler

Huntington geninin 4. kromozomda (4p.16.3) olduğu bağlantı analizi ile 1983 yılında belirlenmiştir (Şekil 1.22) ve HH DNA markörlerine bağlantı ile haritalanan ilk otozomal dominant geçişli hastalık olmuştur (Gusella vd., 1983). Yaklaşık on yıl süren yoğun araştırmalardan sonra 1993 yılında hastalığa yol açan mutasyonun IT-15 geni üzerinde tekrar eden CAG nükleotidlerinin (nt) sayısındaki artış olduğu belirlenmiştir (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). 67 ekson ve 180 kb'den oluşan IT-15, büyük bir genidir. Polimorfik CAG nt tekrarları genin birinci eksonunda bulunur, ardından daha az polimorfik CCG dizileri (7-12 CCG) gelir. Bazı bireylerde, kodon 2642'de GAG delesyonu görülse de, bu polimorfizm aynı CCG dizileri gibi hastalığa yol açmaz.



Şekil 1.22. Huntington Hastalığı geninin kromozom 4p16.3'daki lokalizasyonu
(Gusella, 2000)

Gendeki CAG tekrarları normal bireylerde de farklı sayılarda bulunur, ancak tekrar sayılarının eşik değerinin üzerinde olması durumunda hastalık ortaya çıkar. Huntington Hastalığı dışında, CAG tripletlerinin sayılarındaki artış ile ortaya çıkan

sekiz nörodejeneratif hastalık bulunmaktadır: Dentatorubral Pallidolysian Atrofi (DRPLA), Spinobulbar Müsküler Atrofi (SBMA), Spinoserebellar Ataksi (SCA) Tip 1,3,6,7,17. Genlerdeki CAG bazları, buldukları proteinlerde glutamin amino asidini (Gln veya Q) kodlamasından dolayı; bu hastalıklar “Poliglutamin Hastalıkları” olarak tanımlanır. Poliglutamin hastalıkları otozomal dominant geçişlidir, sadece SBMA X-kromozomuna bağlı kalıtım gösterir (Cummings ve Zoghbi,2000).

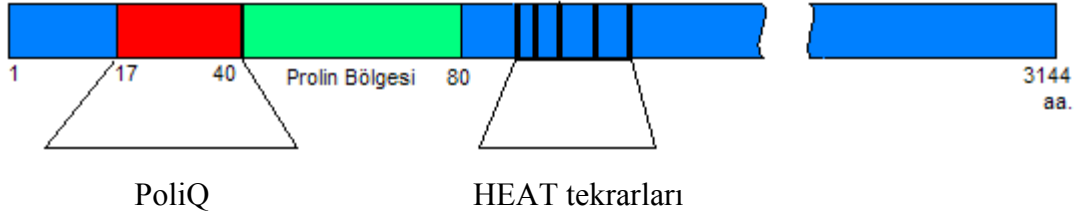
IT-15 genindeki tekrar sayıları, ilişkilendirildikleri fenotiplere göre dört grupta toplanmıştır (The American College of Medical Genetics,1998). CAG tekrarları 26 ve daha az olan aleller normal alel olarak adlandırılır ve Huntington Hastalığı’na yol açmazlar (Ersoy ve Başak, 2005). 27-35 CAG tekrarı taşıyan bireyler HH’na yakalanmazlar. Ancak mayotik instabilite gösteren bu aleller bir sonraki nesilde sayılarının artışıyla hastalığa yol açabilirler (Telenius vd., 1995). 36-39 CAG tekrarları azalmış penetrans aralığında yer alır, çünkü bu alelleri taşıyan bireylerin sadece bir kısmı Huntington Hastalığı’na yakalanmaktadır (Rubinsztein vd., 1996). Bu aralık içinde artan her tekrar ile penetransta artış gözlemlenir. Azalmış penetrans kısaca mutasyonu taşıyan bireylerin bir kısmının hastalık fenotipi göstermemesi olarak açıklanır (Wells ve Warren, 1998). 40 ve üzeri CAG tekrarı taşıyan bireyler her zaman Huntington Hastalığı’na yakalanırlar. Bu bireylerin çocuklarına hastalığı kalıtsal olarak geçirme olasılığı %50’dir (Kiebertz vd., 1994).

1.4.3. Huntington Hastalığı’nın Moleküler Patolojisi

1.4.3.1. Huntingtin Proteini

Huntingtin (htt) proteini 3144 amino asitten oluşur. 348 kilodalton (kDa) büyüklüğündeki bu protein, hücre içi protein etkileşiminde rol oynayan yaklaşık 40 amino asitlik beş HEAT tekrarı içerir (Şekil 1.23.). HEAT terimi, bu motifin ilk kez tanımlandığı proteinlerin baş harflerinden (Huntingtin, Elongation factor 2, regulatory A subunit of the protein phosphatase 2A, TOR1) adını almıştır (Andrade, 1995). Huntingtin proteininin işlevini belirlemek oldukça zordur, çünkü diğer

proteinlerle yapısal bir homolojisi yoktur. Yoğun araştırmalara rağmen bu proteinin işlevi hakkında bilinenler çok azdır.



Şekil 1.23. Huntingtin proteininin önemli bölgeleri

1.4.3.2. Mutant PoliQ Proteinleri ve Olası Nörodejeneratif Mekanizmalar

PoliQ proteinleri tüm hücre ve dokularda yaygın olarak sentezlenir, ancak sadece merkezi sinir sisteminde selektif nörodejenerasyona neden olurlar. PoliQ mutasyonu öncelikle mutant protein konformasyonunu değiştirir, değişen konformasyon da mutant proteinlere toksik işlev kazandırır. Mutant poliQ proteinlerinin enzimlerle kesilmesi agregasyon, inklüzyon cisimciklerinin oluşumu ve toksisite görülür. Konformasyonu değişmiş mutant proteinler farklı protein etkileşimlerine, transkripsiyon bozukluklarına ve ubiquitin-proteozom sisteminde (UPP) aksamalara neden olarak hücre ölümüne sebebiyet verir (Ersoy ve Başak, 2005).

1.4.3.3. Toksik İşlev Kazanımı ve İşlev Kaybı

PoliQ hastalıklarında moleküler mekanizma, mutant proteinin toksik işlev kazanımı ve normal proteinin işlev kaybını kapsar. Mutant poliQ tekrarlarının yeni bir işlev kazanarak hücrelerde toksisite yaratması hücre ölümünü tetikler. Buna ek olarak normal proteinin işlevini kaybetmesi de olası mekanizmalar arasındadır. Normal proteinler mutant formları ile etkileşerek normal işlevlerini yerine getiremeyebilirler ve bu durum, patojenik mekanizmaya dolaylı yoldan etki edebilir. Diğer PoliQ hastalıkları gibi Huntington Hastalığı'nda da işlev kazanma ve işlev kaybetme mekanizmaları aynı anda etkin olabilir (Cattaneo vd., 2001).

1.4.3.4. Mutant PoliQ Proteinlerinde Konformasyon Değişimi

Mutant PoliQ proteinlerde konformasyon değişimini açıklamak için transglutaminaz hipotezi ve polar zipper modeli olmak üzere iki model geliştirilmiştir. Transglutaminaz hipotezi, transglutaminaz enzimi için substrat olan glutamin amino asitlerinin lizin amino asitleri ile izopeptit bağları oluşturabileceğini söyler. Transglutaminaz aktivitesinin mutant poliQ proteinleri tarafından arttırılarak agregasyona neden olduğu kanıtlanmıştır (Green, 1993). Polar zipper modeline göre ise, konformasyonu değişmiş mutant protein ya kendi içinde ya da başka bir CAG tekrarlı molekülle kovalent olmayan bir etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda protein β -kıvrımlı tabaka şeklinde ikincil bir yapı oluşturarak çökebilir (Perutz vd.,1994). Huntington hastalarının beyinlerinde görülen agregatlar β -kıvrımlı tabaka yapısındadır. CAG tekrarları eşik değerinin altında olan normal huntingtin proteini hücrelerde çözünebilir durumdadır, ancak mutant proteinler kıvrımlı tabaka yapısında çöker; bu da polar zipper modelinin önemli bir kanıtıdır (Perutz, 1995).

1.4.3.5. Mutant Protein Agregasyonu

Huntington Hastalığı ve diğer poliQ hastalıkları patogenezinde rol alan proteinler hücre içinde agregat oluşturarak çöklerler. PoliQ dizisi dışında birbirinden oldukça farklı olan poliQ proteinlerinin oluşturdukları agregatlara transkripsiyon faktörleri, şaperon ve proetozom gibi birçok değişik protein grupları dahil olabilir. Çökelen protein gruplarının farklı olabilmesi sebebiyle de farklı PolyQ hastalıklarında farklı işlev değişimlerine neden olabilir.

Agregasyonun hastalık patogenezindeki rolü halen tartışmalıdır. Agregatlar hücre içinde toksisiteye neden olabilir, poliQ toksisitesine karşı koruyucu olabilir, ya da sadece patolojik sürecin bir yan ürünü olabilir (Rajogopalan, 2001). Agregasyon ve toksisite arasındaki bağlantı tam olarak aydınlanmamış olsa da, agregatların patolojik bir markör olduğu kesinlik kazanmıştır (Li, 2001).

1.4.3.6. Mutant PoliQ Proteinlerinin Proteolizi

PoliQ proteinlerinin proteolizinde protein-spesifik enzimler, kaspazlar ve kalpeinler rol oynar (Chan ve Mattson, 1999). Kalsiyumla aktive olan sistein

proteazlar olan kalpainler sinir sisteminde proenzim heterodimer olarak bulunurlar. Mutant huntingtin kalpainler tarafından daha kolay kesilmektedir. Kalpain ile kesim engellendiğinde, huntingtin agregatları ve toksisitenin azaldığı gözlemlenmiştir (Gafni vd., 2004). Apoptoz ve emplamasyonda rol oynayan bir grup aspartate-özgü sistein proteazlardan kaspazların da HH patogenezinde rol oynadığı çeşitli deneylerle gösterilmiştir (Thornberry ve Lazebnil, 2004).

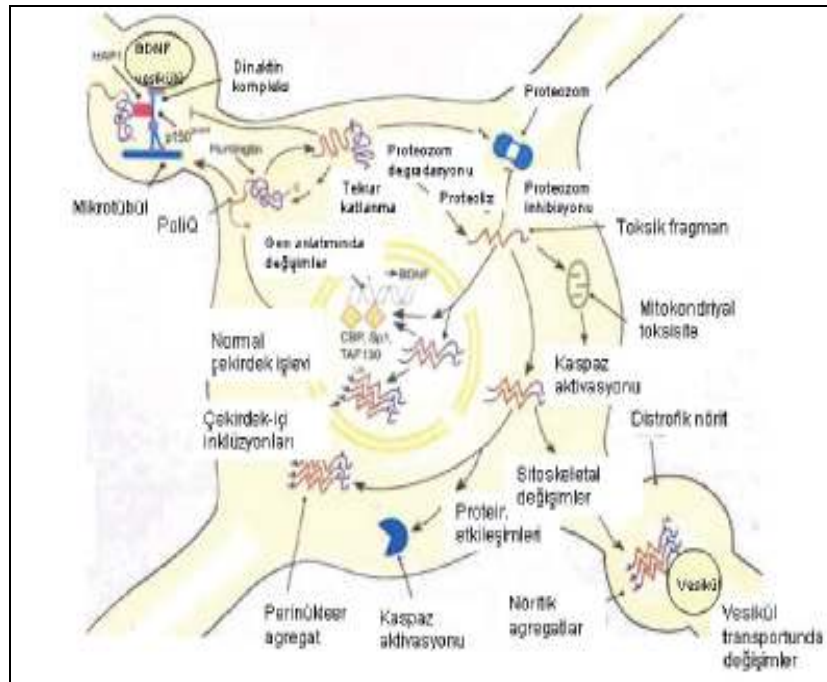
Huntingtin proteinin kesim ürünü olan ve polyQ dizisini barındıran N-terminal kısmı hücreler için daha toksiktir (Wellington vd., 1998). N-terminal protein fragmanları kaspazları daha çok aktive eder ve toksik fragman oluşumunu tetikler, bu da döngü içine giren hücrelerin apoptoza uğramasına neden olur (Wellington vd., 2000).

1.4.3.7. Şaperonların ve Übikülin-Proteozom Sisteminin Rolü

Mutant poliQ proteinleri farklı bir konformasyon kazanırlar ve yanlış katlanma sonucu hücre içinde degradasyona direnç göstererek protein birikimine neden olur. HSP40 ve HSP70 şaperon proteinlerine hücre agregatlarında rastlanmaktadır. Bu şaperonların normalden fazla sentezlendiği durumlarda agregatların azaldığı ve bazen poliQ toksisitesini baskıladığı gözlemlenmiştir (Chai vd., 1999). Şaperonlar, übikülin-proteozom sisteminin (UPP) proteinleri degrade etmesine de yardım ederler. PoliQ gibi bir çok nörodejeneratif hastalıkların ortak özelliklerinden biri, mutant proteinlerin degradasyona direnç göstermesi veya UPP'nin tıkanması sonucunda gerçekleşen hatalı proteolizdir (Opal vd., 2002). Proteozomların mutant poliQ proteinlerini degrade etmesi gerekirken, tıkanarak proteinlerin birikmesine neden olabilecekleri için apoptoz gerçekleşebilir (Ding vd., 2002; Waelter vd., 2001).

1.4.3.8. Özgün Nöron Ölümü

Huntingtin proteini tüm hücre ve dokularda yaygın olarak sentezlenir. Dolayısıyla mutant proteinin sadece striyatuma özgü nöronlarda dejenerasyona sebep olması aydınlanmamış bir konudur. Yine de mutant huntingtinin striyatuma özgü nöronlarda işlev kaybı veya toksik işlev kazanımı ile aktivitenin değişmesi sonucunda özgün nöron ölümünü açıklanabilir (Cattaneo vd., 2001).



Şekil 1.24. Huntington Hastalığı patogenezi (Beal, 2004).

1.4.4. Proteinlerin Yapı Analizi

Bir proteinin üçüncül yapısının veya parçası olduğu komplekslerin dördüncül yapısının keşfi, proteinin işlevi hakkında önemli ipuçları verebilir. Yapı belirlemek için kullanılan en yaygın deneysel teknikler X ışını kristalografisi ve NMR spektroskopisidir, her ikisi de atomik çözünürlükte bilgi sağlarlar (Branden ve Tooze, 1999) Kriyoelektron mikroskopisi, çok büyük protein kompleksleri ve virüsler hakkında daha düşük çözünürlüklü yapısal bilgi üretmekte kullanılır; bunun bir çeşitlemesi sayılan elektron kristalografisi de bazı durumlarda, özellikle membran proteinlerinin iki boyutlarının kristalleri için, yüksek çözünürlüklü bilgi üretebilir (Gonen vd., 2005). Çözülmüş yapılar genellikle PDB veritabanına kaydedilir. Yapısı çözülmüş protein sayısından çok daha fazla sayıda gen vardır. Ayrıca, yapısı çözülmüş olan bu proteinler, deneysel tekniklere kolayca tabi tutulabilenlerdir. Örneğin, globüler proteinlerin X-ışını kristalografisi için kristalleştirilmeleri nispeten kolaydır. Buna karşın membran proteinlerinin kristalleştirilmesi zordur ve PDB'de az sayıda temsil edilirler (Walsh vd., 2004). Yapısal genomik teknikleri ile, bu yetersizliklerin üstesinden gelmek amacıyla belli katlama sınıflarına ait yapılar

sistemik olarak çözülebilmektedir. Protein yapı tahminleme yöntemleri, deneysel olarak yapısı belirlenmemiş proteinler hakkında makul yapıları üretmeyi amaçlar.

Yapı tahmini için üç önemli tahmin yöntemi vardır: Homoloji modellemesi, katlanma tahmini veya hizalama, Ab initio ya da de novo tahmini (Bioinformatik:Sequenz-Struktur-Funktion, 2001, s.114; Bioinformatik Eine Einführung, 2003, s.4; Angewandte Bioinformatik, 2004, s.124)

1.4.4.1. Homoloji modellemesi

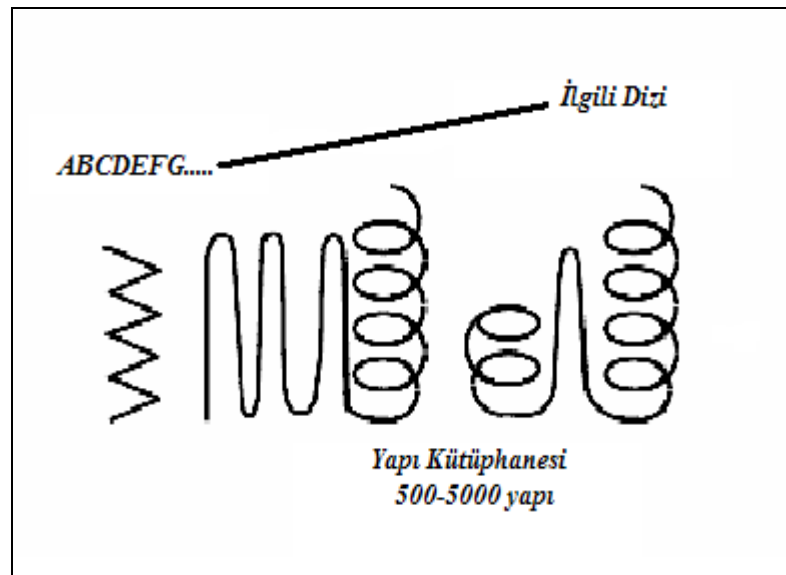
Homoloji modellemesi, modellenecek proteine dizi benzerliği olan "şablon" bir yapıya dayanır (Bioinformatik Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, 2004, s.118). Yapısal genomun amacı çözülmüş yapılar arasında yeterince çeşitlilik elde edip geri kalanları modellemektir. Mevcut şablon yapılar modellenecek proteine uzaktan ilişkili olduğu durumlarda güvenilir modeller üretmek zordur. Bu sorunun çözümü dizin hizalamasının en doğru şekilde yapılmasından geçmesi gerektiği öne sürülmüştür (Zhang ve Skolnick , 2005). Homoloji modellemesi, bir proteinin 3D yapısının, yapısı çözümlenmiş olan bir ya da birkaç protein yapısı üzerinden çözümlenmesidir. Diğer bir deyişle, bilinmeyen bir yapıya sahip protein yapısı bilinen diğer proteinlere benzerlik gösteriyorsa bu protein için homoloji modellemesi ile 3D modeli oluşturulabilir. Modelin oluşumu için C alfa atomunun kalıp modeli süper pozisyonunda yan zincir oryantasyonunun da loop oluşumunda ve modeli iyileştirmek için enerji optimizasyonunu sınıflandırılmaktadır. Bu metodla elde edilen yapılar, dizilerin birbirlerine benzerliğine bağlıdır. İki protein %50 ya da daha fazla oranda aynı ise, yapılar modelin %90 ya da daha fazlasında benzer konformasyonda olacaktır (Biyoinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, 1998, sf. 52)

1.4.4.2. Katlanma tahmini veya hizalama

İkinci durum, yapısı bilinmeyen proteine herhangi bir homolog proteinin bulunmamasıdır. Buna rağmen, işaretlenmemiş (etiketlenmemiş) sekans benzerlikleri, proteinlerin 3D yapılarında oldukça benzerlik gösterebilmektedir. Böylece bir dizinin daha önce bilinen 3D katlanmasına ne kadar iyi uyup uymadığını

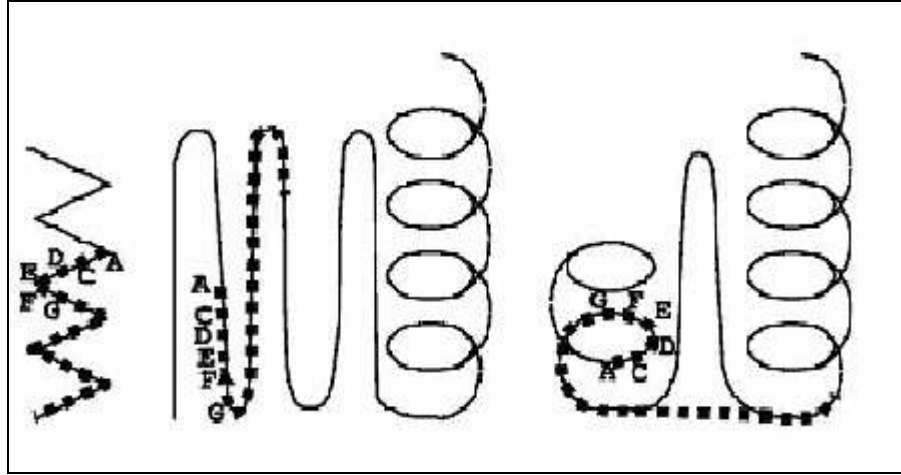
test edilebilmektedir. Bu bir skor değeri ile değerlendirilmektedir. Bu yöntemde diziler kalıp dizisi ile değil, yapısal şablon ile ilişkilendirilmektedir ve tahminler son derece ileri metodlar kullanan programlarla yürütülmektedir. Diğer bilindik proteinlerin dizi benzerliği olmamasına rağmen deneysel olarak çıkarılmış yeni protein yapılarının çoğunlukla katlamalar içermesi, SCOP veritabanı ile bağlantısına bakılmasını gerektirmektedir. Şu anki süreçte protein evrimi boyunca bulunmuş katlamaların sayısı sınırlıdır, ancak mevcut olan bütün katlamaların bulunması çok yakındır.

Hizalama, katlanma tahmini için kullanılan bir methodur. Hizalama hesaplanmasında, pek çok programda ortak olan bazı unsurlar bulunmaktadır. İlk olarak, bir sıralama ve bir dizi şablon (Şekil 1.25) ya da bilindik yapı bulunmaktadır.

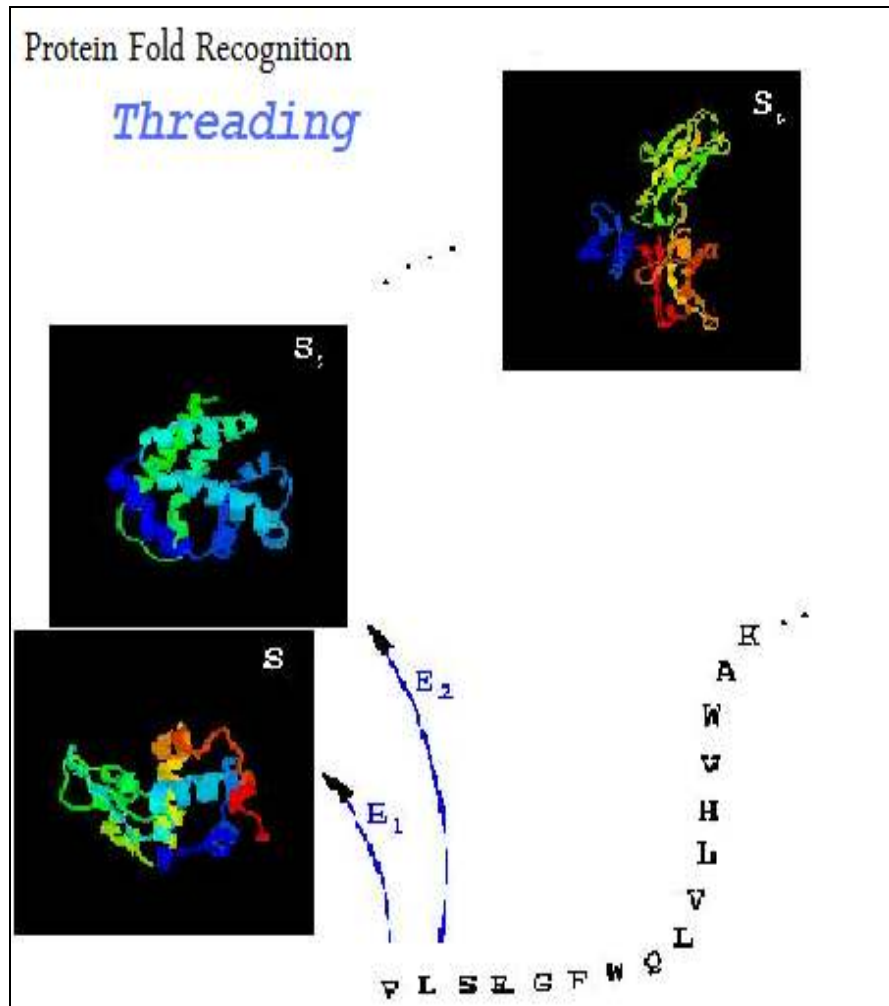


Şekil 1.25. Dizi şablonlar (The Proteomics Handbook, 2003).

Bu yapılar PDB’de bulunan yapılardır. Daha sonra bir sıralama alınır ve kütüphanedeki her bir şablonun içinden “thread” edilir (Şekil 1.26). Hizalama kelimesi, sekansın alınıp her bir şablon üzerindeki her bir bölgeden (ACDEFG....) aşama aşama geçirilmesi demektir; ancak amaç, herhangi bir skor yada quasi-enerji fonksiyonu ile ölçülen en iyi sıralama düzenlemesini (Şekil 1.27) bulmaktır (The Proteomics Handbook, 2003, s.3-4)



Şekil 1.26. Üçüncü hizalamada, incelenen sekans, şablonun bir köşesini sekecek şekilde hizalanmıştır (The Proteomics Handbook, 2003).



Şekil 1.27. İki ayrı motife hizalanan protein

1.4.4.3. *Ab initio* ya da *De novo* tahmini

Yapı tahmininde üçüncü bir metod *Ab initio* ya da *De novo* tahminidir. Bu amino asit zincirinin protein katlaması, atomik interaksyonunun biyofizik kurallarının tamamlanmış takımın kullanılması ile oluşturulur.

De novo tahmini için, üç boyutlu yapı (tersiyer yapı) temel katlama teorisi prensiplerini kullanmak oldukça komplekstir, çünkü 3D yapıyı kodlayan dizi elementleri bilinmemektedir. Yapıların tahminleri ile uğraşan bilgisayara dayalı bu araştırma sahası “moleküler mekanik” ya da “moleküler dinamik” olarak nitelendirilmektedir. Bu da aminoasit yan zincirlerinin çoklu interaksyonlarının değerlendirilmesi ile oluşturulmaktadır.

2. AMAÇ

Dünyada bilinen dokuz poliglutamin tekrarı hastalıkları içinde en yaygın olarak görüleni Huntington Hastalığı'dır. Avrupa'da görülme sıklığı 3-7/100000'dir. Huntington Hastalığı, otozomal dominant geçişli nörodejeneratif bir hastalık olup, santral sinir sistemine özgü istemsiz hareketler, motor koordinasyon bozukluğu, hafıza kaybı ve çeşitli psikiyatrik bozukluklarla karakterizedir. İlgili mutasyon, IT 15 genindeki CAG tekrar sayılarındaki artıştır. Kodlanan huntingtin proteininin işlevi henüz tam olarak aydınlatılmamış ve diğer proteinlere benzerliği bulunamamıştır.

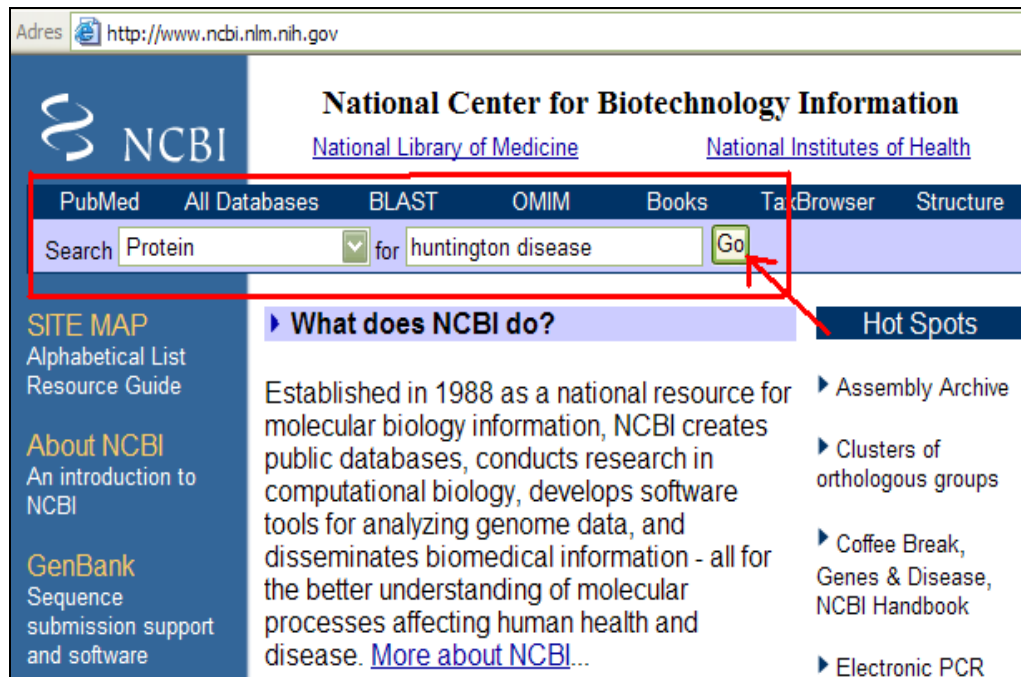
Bu çalışmada biyoinformatik bilgileri ve modelleme programları kullanılarak normal protein yapısının incelenmesi, in silico mutasyon oluşturularak mutant protein özelliklerinin araştırılması ve normal ve mutant proteinlerin konformasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu proteinin normal ve hatalı formlarının üç boyutlu yapılarının incelenmesi ve modellenmesi, işlevsel özelliklerinin ortaya çıkarılmasındaki ilk adımdır. Bu sayede proteinlerin rol aldıkları hastalık yollarının aydınlatılması hızlandırılacak ve geliştirilecek olan tedavi metodlarına ışık tutulacaktır.

3. YÖNTEMLER

3.1. Protein Dizisinin Bulunması ve Formatlanması

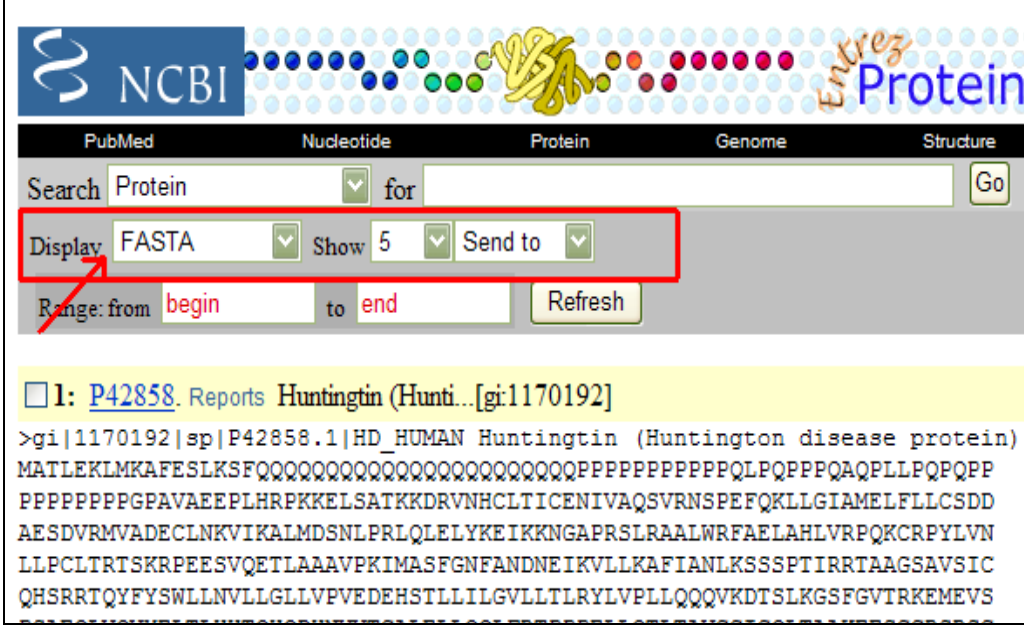
Amino asit dizisi belirlenmiş olan bir proteinin özelliklerinin araştırılmasında ilk adım, amino asit dizisinin veritabanlarından elde edilmesidir. Bu amaçla “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” adlı internet sitesi (www.ncbi.nlm.nih.gov) kullanılır. Bu internet sayfasında mevcut bulunan veritabanları arasından protein veritabanı içinde ilgili protein, ismi, görev aldığı bir yolak ya da hastalık ismi yazılarak taranır (Şekil 3.1.). Tarama sonucu ortaya çıkan proteinler arasından araştırılan türe ait olan protein seçilir ve proteinin amino asit dizisi, proteinle ilgili yapılmış olan araştırmalar ve diğer özellikleri çıkarılır.



Şekil 3.1. NCBI internet sitesinden proteinin bulunması

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

Bulunan amino asit dizisinin karşılaştırma ya da modelleme yöntemlerinde kullanılabilmesi için FASTA formatına çevrilmesi gerekir (Şekil 3.2.). FASTA, 1988’de oluşturulan bir dizi eşleştirme veya veritabanı tarama programıdır (Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, 2004, s.49).



NCBI Entrez Protein

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure

Search Protein for Go

Display FASTA Show 5 Send to

Range: from begin to end Refresh

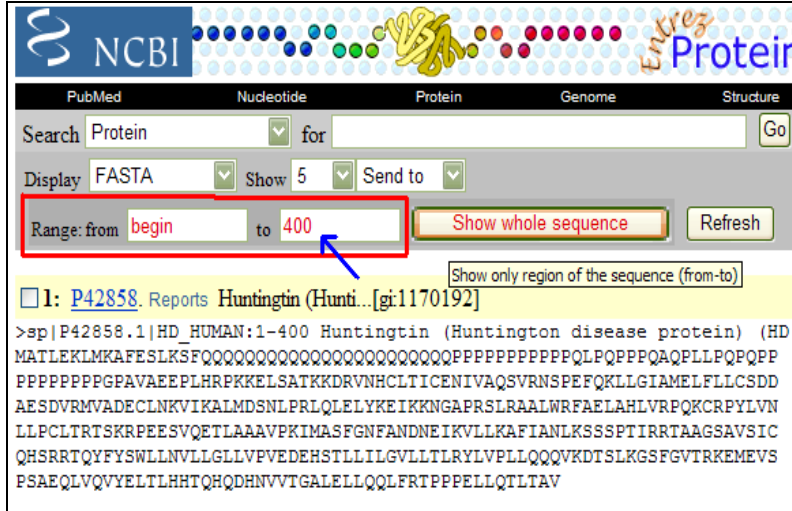
1: [P42858](#). Reports Huntingtin (Hunti...[gi:1170192]

```
>gi|1170192|sp|P42858.1|HD_HUMAN Huntingtin (Huntington disease protein)
MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPQLPQPPQAQPLLQPQPP
PPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFLLCSD
AESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWRFAELAHLVRPQKCRPYLVN
LLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSIC
QHSRRTQYFYSWLLNVLLGLLVPVEDEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVKDTSLKGSFGVTRKEMEVS
```

Şekil 3.2. Proteinin FASTA formatının bulunması

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

Protein modellemelerinin daha detaylı ve güvenilir sonuçlar vermesi için özellikle büyük proteinlerin modellenmesinde protein dizisi bölümlere ayrılarak incelenebilir. Bu çalışmada da 3144 amino asitten oluşan huntingtin proteini 400 amino asitlik parçalar ayrılarak incelenmiştir. FASTA formatı sayfasında yer alan “begin to end” kısmına istenilen parçanın büyüklüğü girilerek protein istenilen büyüklükteki bölümlere ayrılır (Şekil 3.3.).



NCBI Entrez Protein

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure

Search Protein for Go

Display FASTA Show 5 Send to

Range: from begin to 400 Show whole sequence Refresh

1: [P42858](#). Reports Huntingtin (Hunti...[gi:1170192]

Show only region of the sequence (from-to)

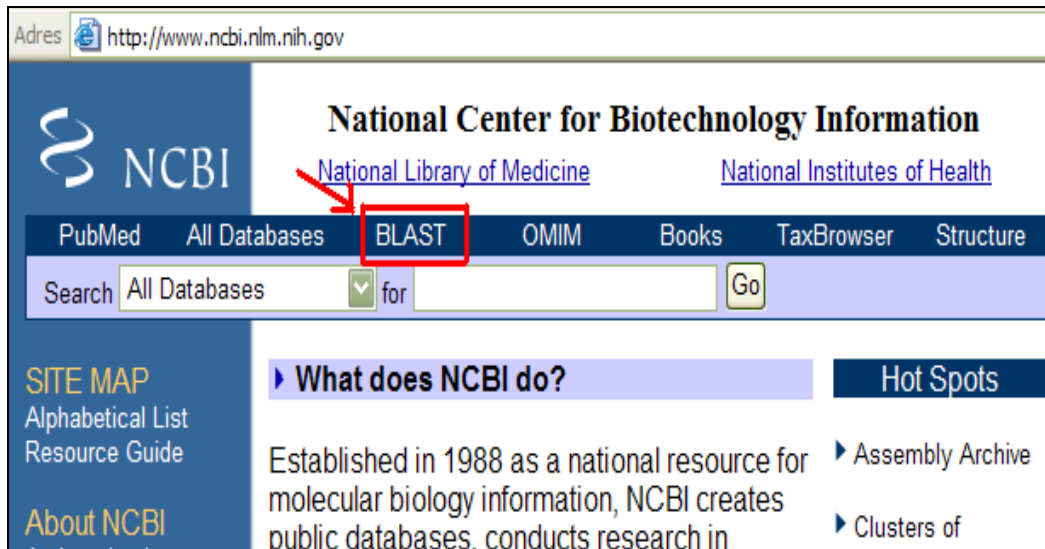
```
>sp|P42858.1|HD_HUMAN:1-400 Huntingtin (Huntington disease protein) (HD
MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPQLPQPPQAQPLLQPQPP
PPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFLLCSD
AESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWRFAELAHLVRPQKCRPYLVN
LLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSIC
QHSRRTQYFYSWLLNVLLGLLVPVEDEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVKDTSLKGSFGVTRKEMEVS
PSAEQLVQVYELTLHHTQHQDHNVTGALELLQQLFRTPPPELLQTLTAV
```

Şekil 3.3. FASTA formatında proteinin parçalara ayrılması

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

3.1.1. Protein Özelliklerinin Araştırılması

Bir proteinin özelliklerinin belirlenmesinde ilk safha, ilgilenen proteinin bilinen diğer proteinlerle olan benzerliğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, proteinlerin amino asit dizileri karşılaştırılır. Dizi analizinde homoloji araştırması, ilgilenilen dizinin daha önce araştırılıp veritabanlarına eklenen diğer tüm dizilerle karşılaştırılmasıdır. Homoloji araştırması için tasarlanmış birçok bilgisayar programı vardır. Bunların içinde en önemlisi ve en basiti BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) programıdır (Şekil 3.4.) (Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, 2004, s.54). Homoloji araştırması için öncelikle uygun BLAST programı seçilmelidir. Örneğin, nükleotid dizisi için veritabanında karşılaştırılacaksa BLASTN, protein dizisi karşılaştırılacaksa BLASTP programları seçilir (Şekil 3.5.) (Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, 2004, s.55). Bu çalışmada araştırılan huntingtin proteininin homoloji araştırması, NCBI internet sayfasından ulaşılan BLASTP programı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6.)



Şekil 3.4. NCBI internet sayfasından BLAST programına ulaşım

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

Basic BLAST	
Choose a BLAST program to run.	
nucleotide blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast</i>
protein blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms: <u>blastp</u>, psi-blast, phi-blast</i>
blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

Şekil 3.5. Uygun BLAST programının seçilmesi

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Enter accession number, gi, or FASTA sequence Clear Query subrange

Araştırılan dizi yazılır...

From

To

Or, upload file Gözet

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Choose Search Set

Database

Organism

Enter organism name or id-completions will be suggested

Enter organism common name, chemical, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Entrez Query

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Algorithm

blastp (protein-protein BLAST)

PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)

PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database nr using Blastp (protein-protein BLAST)

Show results in a new window

Şekil 3.6. Araştırılan dizinin BLAST taraması

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Bundan sonraki aşamada protein dizisi ve yapısı hakkında daha detaylı analizler yapılır. Expert Protein Analysis System (ExPASy) sunucusu (www.expasy.org) dünya üzerinde protein dizileri ve yapıları hakkında bilgi alınabilecek en önemli sunucudur. On beş yıldır aktif olan bu sunucu, Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) tarafından sağlanmaktadır. Bu site protein veritabanı olmasının yanı sıra çok çeşitli analiz gereçlerini de sağlar ve diğer sunuculara da bağlantı verir. ExPASy internet sayfasına araştırılan proteinin NCBI'dan elde edilen kodu girilerek özellikleri araştırılır (Şekil 3.7). Bu şekilde proteinlerin eğer varsa 3D yapıları, türlere özgünlükleri, etkileşimleri ile ilgili bilgilerin yer aldığı alt veri tabanları çıkarılır. Bunlara ek olarak proteinlerin hücre içi lokalizasyonu ve ekspresyon paternleri ile ilgili bilgiler ve referanslar bulunabilir.



Şekil 3.7. ExPASy internet sayfasında proteinin araştırılması

Proteinlerin araştırılması gereken diğer bir özelliği, sarmalanmış sarmal yapılarının incelenmesidir. İkincil yapılarda proteinin içinde farklı ikincil yapılarla sahip pek çok bölge olabilir. İki ya da daha çok heliks zincirinin birbirine sarılması

ile sarılmış sarmal (“coiled coil”) protein yapısı oluşur. Proteinin bu bölgeleri diğer proteinlerle olan etkileşimi gerçekleştirir. Sarılmış sarmal bölgelerinin araştırılması için www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html internet sayfası kullanılır (Şekil 3.8.)

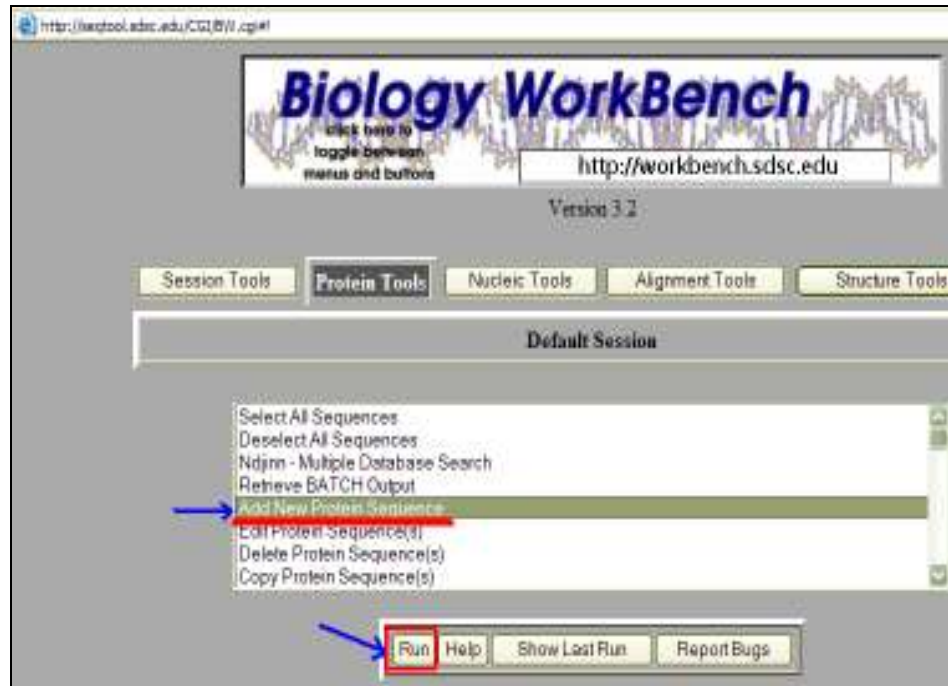
The screenshot shows the COILS web form interface. The browser address bar displays http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html. The page contains instructions on how to use the tool, followed by a form with the following fields and options:

- Window width: all
- matrix: MTIDK, 2.5fold weighting of positions a,d: no
- Query title (optional): Araştırılan proteinin ismi...
- Input sequence format: Plain Text
- Query sequence or ID or AC or GI (see above for valid formats): Araştırılan proteinin dizisi...

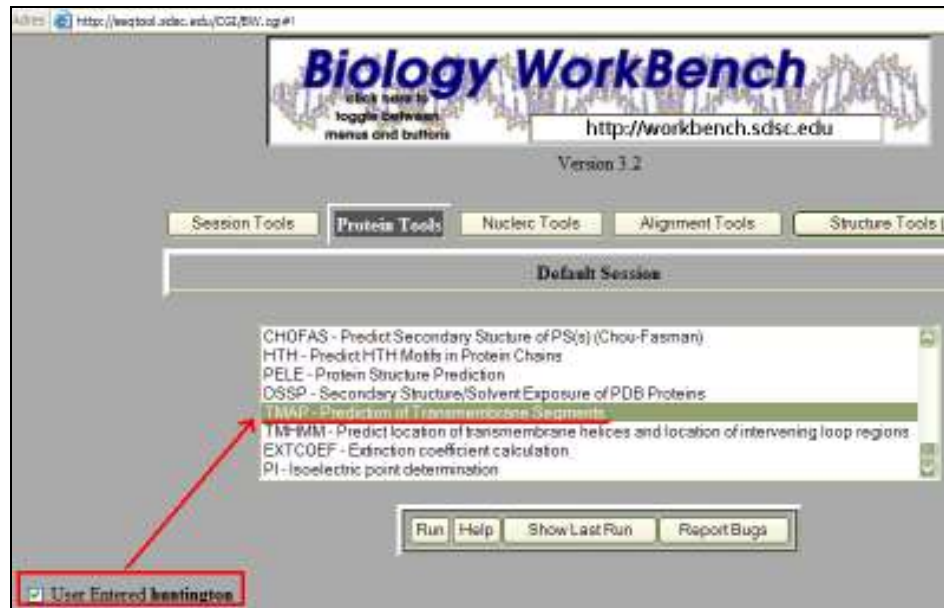
At the bottom of the form, there are two buttons: "Run Coils" (highlighted with a red box and a blue arrow) and "Clear Input".

Şekil 3.8. Sarılmış sarmal yapılarının araştırılması
(www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)

Proteinlerin transmembran bölgelerinin araştırılması da, fonksiyonlarının belirlenmesine yardımcı olacaktır. Bu amaçla, “Biology Work Bench” (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>) internet sayfasında yer alan TMAP (“Prediction of Transmembrane Segments”-Transmembran Bölümlerinin Tahmini) programından yararlanır. Öncelikle <http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi> internet sayfasında proteinin analiz edilebilmesi için araştırılan proteinin dizisi kaydedilir (Şekil 3.9) ve TMAP programı ile transmembran bölümler bulunur (Şekil 3.10.).



Şekil 3.9. Yeni proteinin eklenmesi (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>)




Şekil 3.10. TMAP araştırması (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>)

3.2. Protein Yapı Analizi

Proteinin üçüncül yapısını ve modelini çıkarmak için www.ca.expasy.org/tools/ adresindeki internet sitesinde "tertiary structure prediction" bölümünde yer alan tüm hizalama ("threading") yöntemleri denir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Modelleme programları (www.expasy.org)

3 Boyutlu Yapı Tahmini
<p>Karşılaştırmalı modelleme</p> <ul style="list-style-type: none"> • SWISS-MODEL  - Otomasyonlu bilgiye dayalı protein modelleme sunucusu (An automated knowledge-based protein modelling server) • 3D yapboz – Bilinen yapının homologuna dayalı proteinler için üç boyutlu modeller (Three-dimensional models for proteins based on homologues of known structure) • CPH models – Otomasyonlu nöral- ağa dayalı protein modelleme sunucusu (Automated neural-network based protein modelling server) • ESyPred3D –Nöral ağları kullanan otomasyonlu homoloji modelleme programı (Automated homology modeling program using neural networks) • Geno3d – Protein üç boyutlu yapısının otomatik modellenmesi (Automatic modelling of protein three-dimensional structure) • SDSC1 - Protein Yapısı Homoloji Modelleme Sunucusu (Protein Structure Homology Modeling Server) <p>Threading</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3D-PSSM – İkincil yapı bilgisiyle birlikte 1D ve 3D dizi profillerini kullanan protein yapı tahmini (Protein fold recognition using 1D and 3D sequence profiles coupled with secondary structure information) (Foldfit) • Fugue– Dizi- yapı homoloji teşhisi (Sequence-structure homology recognition) • HHpred - HMM-HMM karşılaştırmasıyla protein homoloji saptaması ve yapı tahmini (Protein homology detection and structure prediction by HMM-HMM comparison) • Libellula – Fold teşhis sonuçlarını değerlendirmek için nöral ağ yaklaşımı (Neural network approach to evaluate fold recognition results) • LOOPP – diziyi diziyeye, diziyi yapıya ve yapıyı yapıya bağlama (Sequence to sequence, sequence to structure, and structure to structure alignment) • SAM-T02 – HMM'ye dayalı Protein Yapı Tahmini (HMM-based Protein Structure Prediction) • Threader - Protein yapı tahmini (Protein fold recognition) • ProSup - Protein yapı sürempresyonu (Protein structure superimposition) • SWEET – Dizilerinden sakaridlerin 3D modelleri inşa etmek (Constructing 3D models of saccharides from their sequences)

“Threading“ bölümündeki programlar içinde LOOPP “Learning, Observing and Outputting Protein Patterns,, (Protein modellerini öğrenme, gözlemleme ve üretme) proteinin yapı analizinde kullanılan programdır.

3.2.1. Hizalama

Uzun yıllardır protein yapısı amino asit sıra bilgisine dayanarak tahmin edilmeye çalışılmaktadır. En genel anlamıyla protein yapısı tahmini gerçekten çetin bir sorundur. Her peptit düzlem (ω) açısının sabit, iki boyutlu ve *geçişli* olduğunu varsayın. Her bir amino asitte phi ve psi (ϕ, ψ) sırt açıları bulunmaktadır ve iki ya da üç tercihli yerel biçimlenmeler olabilir. En basitinden, 100 amino asitten oluşan bir proteinin 10^{30} (2^{100}) ila 10^{47} (3^{100}) arasında farklı şekli bulunabilir. Hatta bu rakamlarda, yan zincirler ya da omurga şekillerinin daimi değişkenler olduğu göz önüne alınmamıştır. Bu hesap sorunu, fazladan her bir amino asit için ikiye katlanmaktadır. Mevcut durumda 50 kalıntılı bir proteinin yapısı tahmin edilebiliyorsa, 51 kalıntılı bir proteinin yapısının tahmin edilmesi birkaç yıl daha sürebilir. Ancak, proteinler, bir polimer tüm olası şekillere bürünemez (Crippen ve Maiorov,1995); tam tersine, doğada sınırlı sayıda protein kıvrımı bulunmaktadır (Leonov, 2003, Wolf, 2000, Govindarajan, 1999, Zhang ve DeLisi, 1998, Wang, 1998, Zhang, 1997, Wang, 1996, Orengo, 1994, Chothia, 1992) ve belirli yapıların daha fazla korunduğu (Englan vd., 2003, Li vd., 2002, Miller vd., 2002, Helling vd., 2001, Shahrezaei vd., 2000, Bornberg-Bauer, 1997, Govindarajan, 1996, Orengo,1994) gözlemlenmiştir. Bu durum önemli sonuçlar doğurmaktadır. Bir araştırmacı hiçbir benzerlik beklemezken, çözmek üzere olduğu yapı bilinmekte olan bir yapıya çok benziyor olabilir. Son yıllarda, protein veri bankasında (Berman vd., 2000) saklanan yapıların %15'inden azı yeni biçim olarak adlandırılabilir. Biçim tanımının mantığı budur. İncelenen protein sırasının bilinen yapıda herhangi bir şeyle tespit edilebilir bir sıra benzerliği bulunmayabilir ancak keşfedilmeyi bekleyen benzer bir yapı mevcut olabilir. Eğer ilgili yapı tanımlanıp hizalama hesaplamasını yapılandırabilmek için bir sıra oluşturulabilirse, faydalı bir model ortaya çıkarılabilir. Hatta, daha da iyisi, bu metodun geçerli olmayacağı ve sıralamanın yeni bir yapıya dönüşeceği durumları tespit etmektir. Olağan sıra karşılaştırmasının tersine hizalama yöntemi, her bir modelin yapısal bilgisini kullanmalıdır. Basit bir veritabanı araştırmasının bir sıra ile bilinen bir yapı arasında güvenilir bir benzerlik bulması halinde, bu bir model oluşturmak için en iyi yöntem olacaktır. Dikkatli, ayrıntılı, tekrarlanan veritabanı araştırmasının istatistik olarak güvenilir bir benzerlik bulamaması halinde, hizalama hesaplaması gerekecektir.

İlk olarak elimizde bir sıralama ve bir dizi şablon ya da bilindik yapı bulunmaktadır. Sıralama, kütüphanedeki her bir şablonun içerisinden thread edilir, yani her bir şablon üzerindeki her bir bölgeden (ACDEFG.....) aşamalı olarak geçirilir. Amaç, herhangi bir skor yada sahte fonksiyon ile ölçülen en iyi sıralama düzenlemesini bulmaktır.

Threading hesaplaması bir moleküle en iyi şeklin bulunmasına odaklanmaktadır. Bir moleküle en uygun şeklin bulunması, protein hesaplamalarında, sistemin potansiyel enerjisinin bulunması için klasik atom modelin kullanılmasını kapsar. (Cornell vd., 1995, Van Gunsteren vd., 1996, MacKerel vd., 1998, Brooks vd., 1983). Ancak ihtiyaç duyulan şey, doğru protein kalıntısı düzenlemelerini tanıyabilen bir skor fonksiyonunun bulunmasıdır.

Bir sıralamanın şablon yapısına en uygun hizalamasını bulmak çok önemlidir, ancak hala sorun teşkil etmektedir. Sıralama yapı hizalamaları genelde hataya açıktır (Lemer vd., 1995, Chang vd.,2002). C^α atomları arasındaki ortalama mesafe 3.8 Å'dır, yani tek bir kalıntının bağlantısızlığı modelin, ilaç tasarımı gibi bir uygulamada, şablon molekülü bilinmeyen yapıya uygun bir molekül olsa dahi, faydasız kılınması için yeterli olacaktır. Daha sonra, yanlış yerlerde birkaç amino asitlik boşluklar bırakan daha büyük bir bağlantısızlık, bir parça α-heliksine yada tesadüfi bir halkaya β-lifli kalıntılar gönderebilir.

3.2.2. LOOPP

LOOPP, protein katlanma potansiyelleri için bir taslaktır. Sekanstan sekansa, sekanstan yapıya ve yapıdan yapıya sıralamalar oluşturma şeklinde çalışır. Ayrıca katlanma potansiyellerinin optimizasyonu ve yapılan uygulamaların işlevlerinin değerlendirilmesini mümkün kılar. LOOPP'un temel amaçları uzantı ve dizge sıralamaları yönünden protein kıvrımı tanımlanması, protein modellerinin doğrusal programlama ve istatistiksel analizini kullanarak protein kıvrılma potansiyellerinin dizaynı, yapıdan yapıya sıralamaları kullanarak yeterli oranda protein kıvrım kütüphanelerinin inşa edilmesidir.

Programın kullanılabilmesi için, ExPASy internet sitesinden LOOPP seçeneğine girilerek ilgili sayfaya yönlendirme yapılır (Şekil 3.11.). LOOP programını işleyen internet sayfasına (www.cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx)

gerekli bilgiler girilir. “Job name” bölümüne proteinin ismi, “input sequence” bölümüne de proteinin 400 amino asitlik parçaları sırayla görev olarak yüklenir. İstenirse “Advanced options” da yer alan bir takım özellikler değiştirilir ve görev başlatılır. İşlem sonucu, yine aynı sayfaya yazılan e-posta adresine postalanacaktır (Şekil 3.12.).

Computational Biology Service Unit
Microsoft High-Performance Computing Institute

Welcome to Computational Biology Service Unit
member of Cornell Life Sciences Core Laboratories Center

Web computing tools developed/hosted at CBSU through easy-to interface

LOOPP	MOIL	BLAST (parallel, real-time)	Genome Seq. Alignment	R
MDIV	MDIV	PathogenTracker	iDeCAL	
CLUSTALW (parallel, real-time)	P-HMMER (Pfam)	MKPRF	MODELLER	P
Drosophila BLAST	URMS			

CBSU Microsoft HPC
CBSU bioinformatics support for the next generation sequencing
[CAC Desktop Bioinformatics Applications for Windows](#)
[FTP server with sequence databases used with CBSU programs \(both formatted and fasta\)](#)

CBSU was founded in 2001 as a computational resource for the Tri-institutional Collaboration

Şekil 3.11. LOOPP programının seçilmesi

(<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>)

Görev yüklendikten sonra araştırmacının e-posta adresine sırayla üç adet ileti gelir. Bunlardan biri görevin iletildiğini, diğeri görevin başladığını ve sonucusu da görevin bittiğini bildiren mesajlardır. Yüklenen görev tamamlanmış ise ilgili dosya bilgisayara kaydedilir. Dosyanın yüklemesi sona erdiğinde içindeki ilk beş model ayrı bir dosyaya kaydedilir.

E-mail: (only guests need to use this field, registered users should log in)

Job name: (please, no spaces, special characters etc., underscore is OK)
 Please notify me about LOOPP updates

Input sequence (amino acids one-letter code only, no names, numbers etc):

```
MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPQLPQPPQAQFLLPQPQPP
PPPPPPPGPAVAEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFLLCSD
AESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRIQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWRFAELAHLVLPQKCRPYLVN
LLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSIC
QHSRRTQYFYSWLLNVLLGLLVPEDEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVQKDTSLKGSFGVTRKEMEVS
PSAEQLVQVYELTLHHTQHGDHNVVTGALELLQQLFRTPPPELLQTLTAV
```

Cluster: Nodes: (0 means that the number of nodes will be chosen automatically)
([Show timeout info](#))

Şekil 3.12. LOOPP programına görevin verilmesi
(<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>)

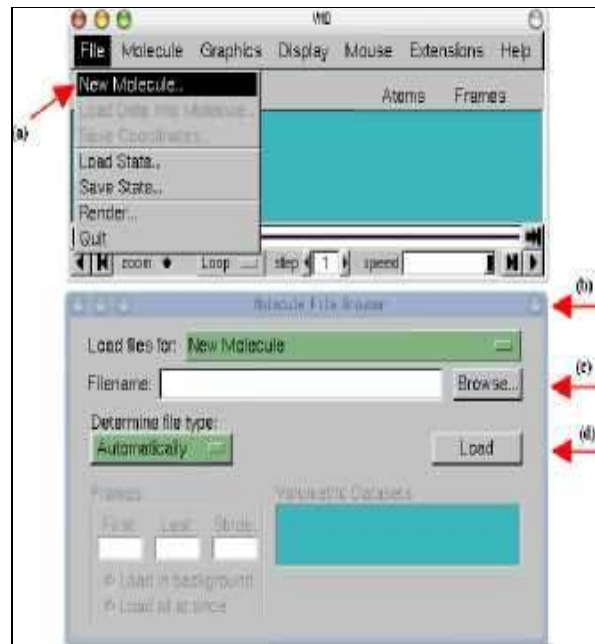
3.2.3. VMD Moleküler Grafik Programı

Proteinlerin 3 boyutlu yapısının belirlenmesi için Jmol, Opndx, Rasmol, VMD ve XCrySDen modelleme programları mevcuttur. Bu araştırmada VMD (“Visual Molecular Dynamics”) programı kullanılmıştı, çünkü bu programla kompleks proteinlerin moleküler 3D yapılarının çıkarılması ve yapıların incelenmesi oldukça basittir. VMD programının kullanımının anlaşılması ve uygulaması çok rahattır. VMD bunun yanı sıra protein içinde yer alan α -heliks, β tabaka, sarmal, dönüş ve van der Waals bağları gibi bir çok özelliğin de gösterimini gerçekleştirir. Bunun yanı sıra proteinin sekans bilgilerini, atomların dizilişini ve proteinin mikromoleküler ayrıntıları gibi daha birçok özelliğin gösterimini de mümkün kılar (Einführung in die

Praktische Bioinformatik, 2002, s.249). VMD programına www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/ adresinden ulaşılabilir. PDB dosyası şeklinde kaydedilen proteinlerin VMD moleküler grafik programında üç boyutlu yapısı oluşturulur (Humphrey vd., 1996).

3.2.3.1. Molekül Yükleme

“File →New Molecule“ menü elemanı seçilir. VMD ana penceresinde (Şekil 3.13.a) ekranda “Molecule File Browser“ (Şekil 3.13.b) isimli yeni bir pencere belirir.“Browse“ (Şekil 3.13.c) butonunu kullanılarak “vmd-tutorial-files“taki pdb dosyası bulunur. Dosya seçildiğinde, dosyanın yükleyebilmesi için “Load“ ’a (Şekil 3.13.d) basılır. Molekül ekranda görüntülenir.



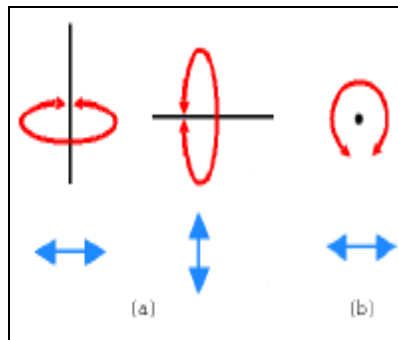
Şekil 3.13. LOOP programında molekül yükleme

(www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/)

3.2.3.2. Proteinin Görüntülenmesi

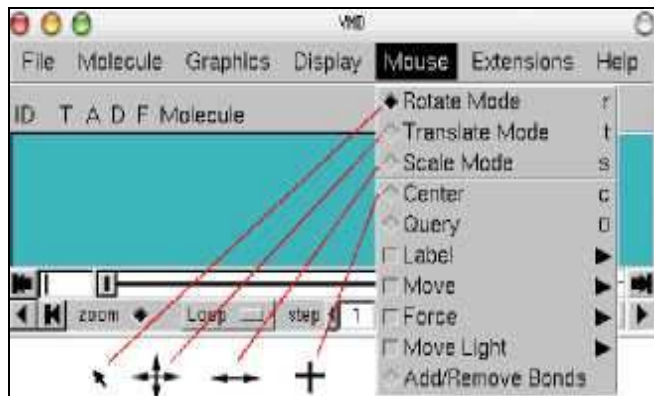
Proteinin 3D yapısını görebilmek için bilgisayar faresi çoklu biçimlerde kullanılır. OpenGL gösteriminde, farenin sağ tuşuna tıklanır ve fare hareket ettirilir.

Bu farenin dönme modudur ve molekülün, ekranın eksenine paralel bir şekilde döndürülmesini sağlar (Şekil 3.14.a). Sağ tuşa basılıp bir önceki aşama tekrarlanırsa, ekrandakine dikey bir eksende dönüş gerçekleşir (Şekil 3.14.b).



Şekil 3.14. Dönme Şekilleri (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd)

VMD ana penceresinde, “Mouse” menüsüne bakılır (Şekil 3.15). Burada, mouse biçimi “Rotation” dan “Translation” yada “Scale” biçimine dönüştürebilir.



Şekil 3.15. Fare modları (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd)

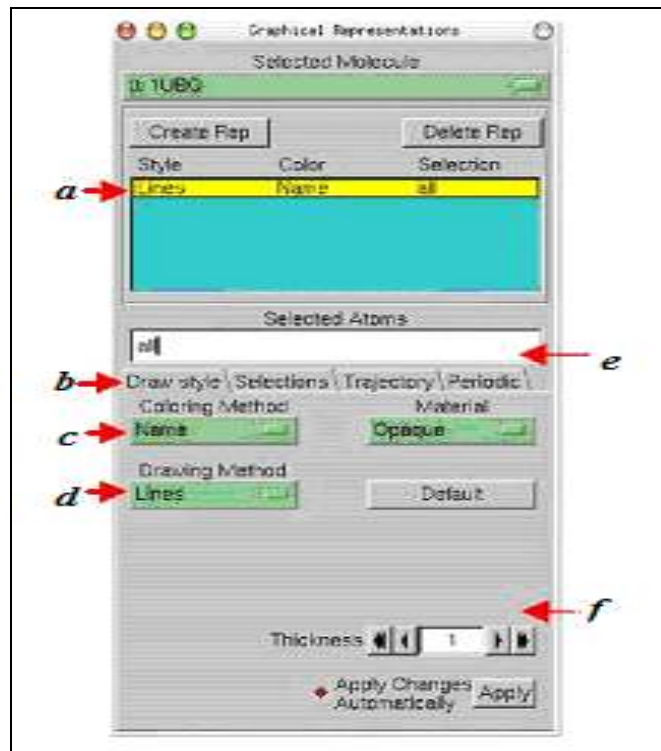
“Translation” (çeviri) modu, sol tuş basılı tutulurken, molekülün ekranın etrafında dolaştırılmasını sağlar. “Translation” modundayken, farenin orta tuşu basılı tutularak kesme düzlemi değiştirebilir. “Scale” (ölçü) modu, sol tuş basılı tutulurken fareyi dikey olarak hareket ettirmek suretiyle görüntünün büyütülüp küçültülmesini sağlar.

3.2.3.3. Farklı Çizim Stilleri

VMD, molekülü çok çeşitli çizim stilleri kullanarak görüntüleyebilir. Burada, bu çizimlerden, proteinde farklı yapılar bulunmasını sağlayacak olanlar incelenir.

“Graphics→Representations” menü elemanı seçilir. Molekülü görüntülemek için kullanılan mevcut grafik gösterimi sarıyla işaretlenmiş olarak görülür (Şekil 3.16.a).

“Draw Style” (çizim şekli) sekmesinde (Şekil 3.16.b), gösterimin stili (Şekil 3.16.d) ve rengi (Şekil 3.16.c) değiştirilebilir. Her bir çizim yönteminin kendine özgü parametreleri bulunmaktadır (Şekil 3.16.e). Örneğin, Graphical Representations penceresinin sağ alt köşesindeki ayarları kullanarak çizgilerin kalınlığı değiştirilebilir (Şekil 3.16.f).



Şekil 3.16. Grafik gösterimler penceresi

(www.ks.uiuc.edu/Research/vmd)

“Coloring Method → Name” (Renklendirme Metodu → İsim)’de, her bir atomun kendine özgü bir rengi vardır. Örneğin; O kırmızı, N mavi, C siyanür ve S sarıdır. “Default” (varsayılan) butonuna basılır, böylece, çizim yönteminin varsayılan özelliklerine geri dönülür.

3.2.3.4. Renklendirme Yöntemleri

Görüntünün renklerini değiştirmek için, “Coloring Method →ResType” (Renklendirme Yöntemi- ResTürü) seçilir (Şekil 3.16.c). Bu, kutupsal olmayan (beyaz), temel (mavi) asidik (kırmızı) ve kutupsal (yeşil) tortuların birbirinden ayırt edilmesini sağlar. “Coloring Method → Structure” (Şekil 3.16.d) (Renklendirme Metodu-Yapı) seçilir ve “NewCartoon” görüntüsünün ikincil yapıyla örtüşen renklere olduğundan emin olunur. Proteinin yapı analizi tamamlanır.

4. SONUÇLAR

4.1. Huntingtin Proteinin Özellikleri

Huntingtin proteinin özelliklerini belirlemek amacı ile öncelikle NCBI internet sayfasından Huntington Hastalığı'nda mutasyona uğrayan huntingtin proteini bulundu (Şekil 4.1).

The screenshot shows the NCBI Entrez Protein search results for 'huntingtin disease'. The search results are displayed in a table format. The second entry is highlighted with a red box and an arrow pointing to it. The entry details are:

Item	Accession	Protein Name	Organism	GI	Database
1	NP_001007904	huntingtin [Xenopus tropicalis]	Xenopus tropicalis	gi56118546	RefSeq
2	P42858	Huntingtin (Huntington disease protein) (HD protein)	Homo sapiens	gi1170192	UniProt
3	P42859	Huntingtin (Huntington disease protein homolog) (HD protein homolog)	Mus musculus	gi1708161	UniProt

Şekil 4.1. NCBI internet sayfasında huntingtin proteininin bulunması

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

“Huntingtin (Huntington disease protein) (HD protein)” olarak yer alan proteinin 3144 amino asitten oluştuğu (Şekil 4.2.) ve P42858 kodu ile tanımlandığı tespit edildi (Şekil 4.3.).

```

1 matleklmka feslksfqgg qqqqqqqqqqqq qqqqqqqqqqqq ppppppppppp pqlpqqpppqa
61 qpllpqqpppp pppppppppppp avaeepplhrp kkelsatkkd rvnhcoltice nivagavrnns
121 pefqkllgia melfflcsdd aedsvrmvad eolnkvikal mdsnlprlql elykeikkng
181 aprlraalw rfaelahlvr pqkcrpylvr llpclrtrsk rpeesvqetl aaavpkimas
241 fgnfandnei kvllkafian lkseseptirr taagsavsic qhsrrtqyfy swllnvlgl
301 lvpvedehst llilgvlltl rylvpllqqq vkdtelkgsf gvtrkemevs psaeqlvqvfy
361 eltlhhtqhq dhnvvtgale llqqflrtpp pellqtltav ggigqltaak eesggrersg
421 sivealiaggg sscspvlrsk qkgkvllege ealeddeesr sdvssalta svkdeisgel
481 aassgvstpg saghdiiteq prsqhtlqad svdlascldt ssatdgeded ilshsssqvs
541 avpsdpamdl ndgtqasspi sdssqttteg pdsavtpsds seivldgtdn qylglqigqpp
601 qdedeeatgi lpdeaseafr nssmalqqah llknmshcrq pdsavdkfv lrdeatepgd
661 qenkpcrirk digqstddd aplvhcavrll saeflltggk nvlvpdrdvr vskcalalsc
721 vgaavahpe affsklykvp ldtteypee qyvdilnyid hgdppvrgat ailogtlics
781 ilerarfhvq dwmgirtlt gntfeladci pllrktlkde ssvtcklact avrnvcmslc
841 seyselglq liidvltlrn ssywlvrrel letlaeidfr lvsfleakae nlhrgahhyt
901 gllklqervl nnvvihlldg edprvrhvaa aslirlvpkl fykodqggqd pvvavardqs
961 svylklmhhe tqppshfsvs titriyrgyn llpsitdvtm ennlrsviaa vshelitstt
1021 raltfgocea lcllstaftpv ciwslgwhog vpplsasdes rksctvgmat miltllssaw
1081 fpldlshahqd alilagnlla asapkslrse waseeeanpa atkqeevwpv lgdralvpmv
1141 eqflshllkv inicahvldd vapgpaikaa lpsltnppsl spirrkqkek epgeqasvpl
1201 spkkgseasa asrqsdtegp vttskssslg sfyhlpssyk lhdvllkatha nykvtldlqn
1261 stekfggflr saldvlsgil elatllqdigk cveeilgyk scfarepmma tvcvqllkt
1321 lfgtnlasqf dglssnpeks qgragrlges svrpglyhyc fmaypythftq aladaalrnm
1381 vgaeqendts gwfdvlqkvs tqkntltav tknradknai hnhirlfepl vikalkqytt
1441 ttcvqlqkqv ldllaqlvql rvnyclldsd qvfigfvlkq feyievqgqr eseaiipnif
1501 fflvllsyer yhsqqiigip kiiqlodgim asgrkavtha ipalqpivhd lflvrgtnka
1561 dagkeletqk evvsmllrl iqyhqvlemf ilvlqqchke nedkwrkrler qiadiilpml
1621 akqqmhidsh ealgvntlf eilapeelrp vdmllrsmfv tpntmasvst vqlwisgila
1681 ilrvlisqst edivlsriqe lsfspylisc tvinrlrdgd ststleehse gkqiknlpee
1741 tferfllqlv gilledivtk qlkvemseqq htfcyqelgt llmclihifk sgmfrritaa
1801 atrlfrsdgc ggsfytlldl nlrarsmitt hpalvllwoc illlvnhtdy rrwaevqgtp
1861 krhslsstkl lspqmsgeee dsdlaaklgn onreivrrga lilfcdyvcq nihdsehlw
1921 livnhigqli slsheppvqd fisavhrnsa asglfiqaiq srcenlstpt mlkktllqcle
1981 gihlsgsgav ltlyvdrllc tpfvrllarmv dilacrrvem llaanlqesm aqlpmeelnr
2041 iqeylqssgl aqrhqrlysl ldrfrlstmq dslspsppvs shpldgdghv sletvspdkd
2101 wyvhlvksqc wtrdsalle gaelynrripa edmnafmmns efnlslapc lslgmseisg
2161 gqksalfeaa revtlarvsg tvqqlpavhh vfpelpaep aaywsklndl fgdaalyqsl
2221 ptlaralagy lvvsklpsh lhlppekekd ivkfvvatle alswhliheq iplsldlqag
2281 ldccclalql pglwsvsst efvthacsli yovhfileav avqppgeqls pertrntpka
2341 iseeeeevdp ntqnpkyita acemvaemve slqsvlalgh krnsgvpafll tpllrrniis
2401 larlplvnsy trvpplvwkl gwspkpggdf gtafpeipve flqekevffe fiyrintlgw
2461 tertqfeetw atllgvltvq plvmeqeesp peedtertqi nvlavqaits lvlsamtvpv
2521 agnpavscle qqprnkplka ldtrfgrkls iirgiveqei qamvskreni athhlyqawd
2581 pvpalspatt galishekll lqinperelg smsykgqvs ihsvwlgnsi tpreeeewde
2641 eeeeeadapa psspptsppn srkhragvdi hcsqflllel ysrwilpss artrpailis
2701 evvrallvvs dlfternqfe lmyvtltelr rvhpsedeil aqylvpatck aaavlgmdka
2761 vaepvarlle stlrsshps rvgalhgvly vlecdllldt akqlipvisd yllsnlkgia
2821 hovnihsqgh vlvmcatafy lienypldvg pefsaaiiqm cgvmllgsee stpsiiyhca
2881 lrglerllls eqlerldaes lvklsvdrvn vhsphramaa lglmltcmty gkekvspgrt
2941 sdnpaapds esvivamerv svlfdrirkg fpcearvvar ilpqflldff ppqdimnkvi
3001 geflengqpy pqfmatvvyk vfqtlhetgq ssmvrddwml slsnftqrap vamatwslsc
3061 ffvsastspw vaailphvis rmgkleqvdv nlfclvatdf yrhqieeeld rrafqsvlev
3121 vaapgspsyhr lltclrnvhk vtto

```

Şekil 4.2. Huntingtin’in amino asit dizilimi

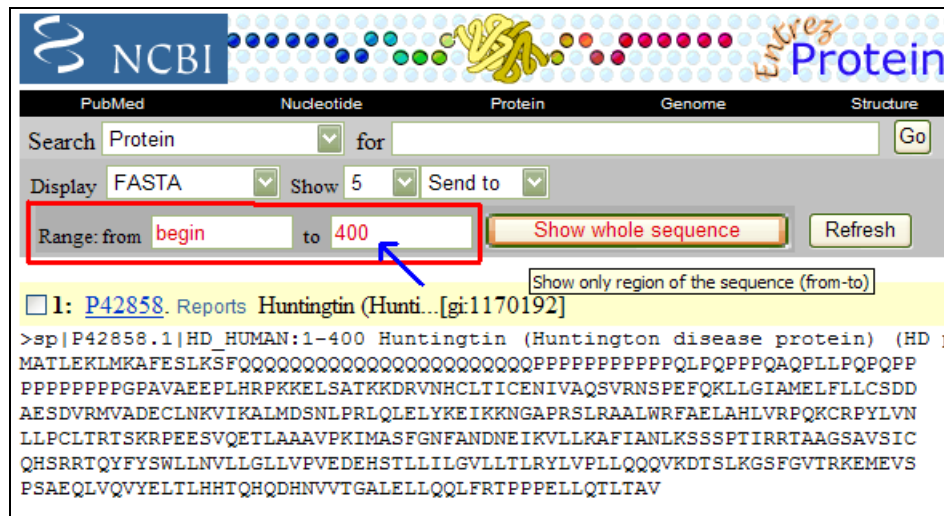
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein&cmd=search&term=p42858>)



Şekil 4.3. P42858 kodu ile tanımlanan huntingtin proteini (www.ncbi.nlm.nih.gov)

4.1.1. Huntingtin Proteinin FASTA Formatı

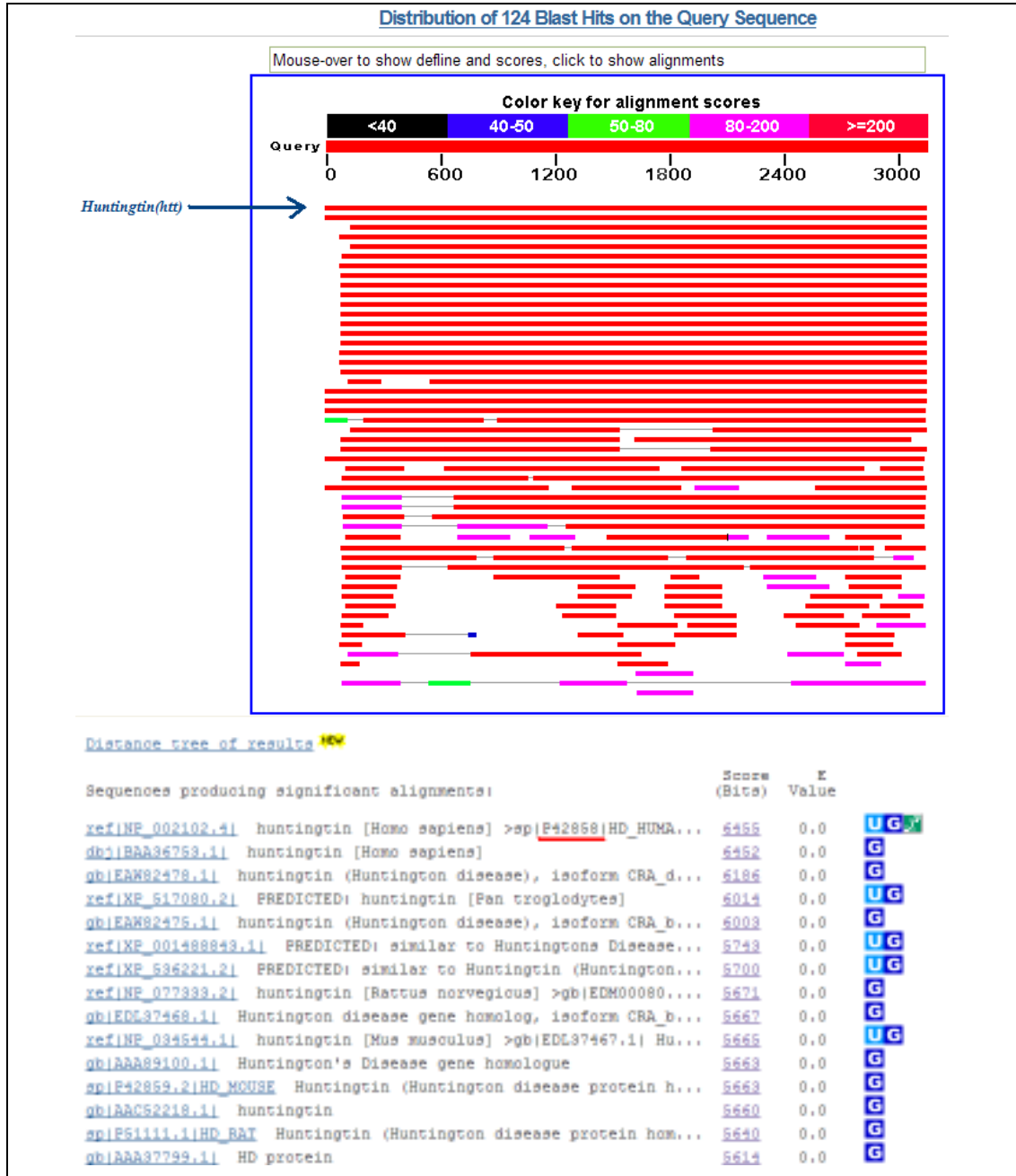
Proteinin amino asit dizisi modelleme yöntemlerinde kullanılabilmesi için display bölümünde yer alan FASTA formatına uygulandı ve kaydedildi. Ayrıca modellenmenin daha sağlıklı sonuçlar vermesi için huntingtin proteini 400'lük amino asit parçalarına ayrıldı. Proteinin belli parçalara bölünmesini gerçekleştirmek için FASTA formatında yer alan "begin to end" bölümüne istenilen parçanın sayıları girilerek sonuçlar elde edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. FASTA formatında huntingtin proteinin 400 lük parçalara ayrılması (www.ncbi.nlm.nih.gov)

4.1.2. BLAST Taraması

Huntingtin'in diğer bilinen proteinlere olan homolojisi BLAST ile araştırıldı (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Huntingtin proteinin BLAST sonuçları (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Yapılan BLAST taraması sonucunda huntingtin proteininin diğer bilinen proteinlerle homolojisi bulunmamıştır.

4.1.3. HEAT Motiflerinin Belirlenmesi

Proteinin özelliklerini daha kapsamlı araştırmak ve proteinin içinde yer alan HEAT motiflerini belirlemek için ExPASy internet sayfasına proteinin kodu olan P42858 yazılarak sonuçlar elde edildi (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Huntingtin HEAT motifleri (<http://www.expasy.org/uniprot/P42858>)

Anahtar	Başlangıç-Bitiş	Uzunluk	Tanım
Zincir	1-3144	3144	Huntingtin.
Tekrar	206-243	38	HEAT 1.
Tekrar	248-285	38	HEAT 2.
Tekrar	318-362	45	HEAT 3.
Tekrar	804-841	38	HEAT 4.
Tekrar	904-942	39	HEAT 5.
Motif	2397-2406	10	Nükleer eksport sinyali
COMPBIAS	18-40	23	Poly-Gln.
COMPBIAS	41-51	11	Poly-Pro.
COMPBIAS	65-80	16	Poly-Pro.

4.1.4. Sarılmış Sarmal Bölgelerinin Analizi

www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html internet sayfasında huntingtin proteinin sarılmış sarmal bölgeleri araştırıldı (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.).

Yapılan analiz sonucunda huntingtin proteininin 1-41, 1365-1426, 1432-1467, 1556-1617 ve 1743-1787 amino asit bölgelerinde sarılmış sarmal yapısı tespit edilmiştir.

http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html

For further information see the updated [Sequence Submission](#). The program is also available by [ftp](#).

Usage: Paste your sequence in one of the supported [formats](#) into the sequence field below and press the "Run Coils" button. Make sure that the format button (next to the sequence field) shows the correct format.

You may change the options below:

Window width: all

matrix: MTIDK 2.5fold weighting of positions a,d no

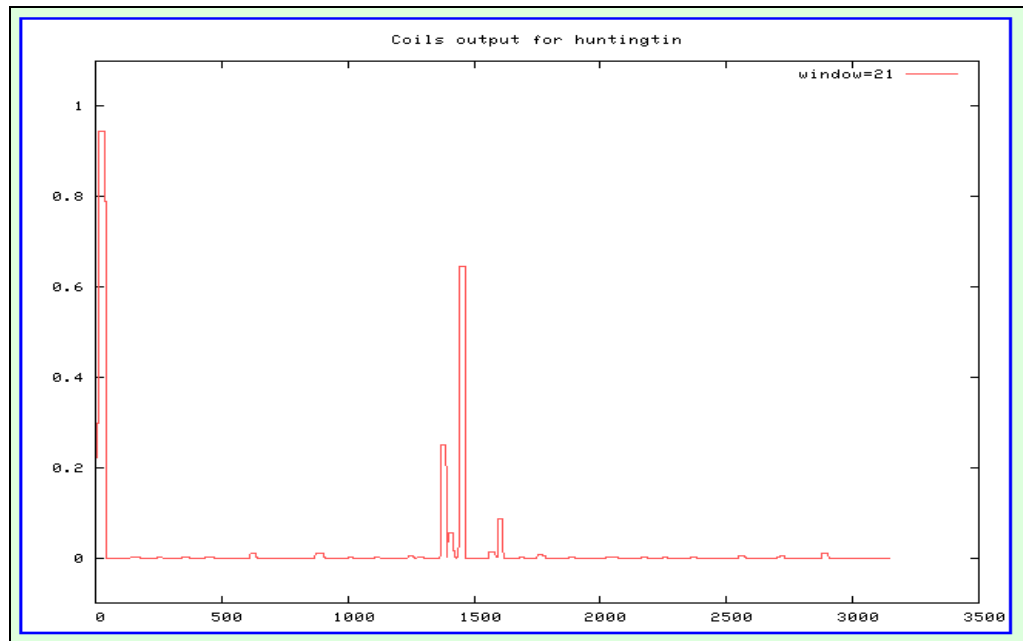
Query title (optional): huntingtin

Input sequence format: Plain Text

Query sequence or ID or AC or GI (see above for valid formats):
 MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPFQLQFPFPQ
 AQP LLPQPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKRELSATRRKDRVNHCLTICENIVAQSVR
 NSPEFQKLLGIAMELFLLCSDDAESDVRMVADECLNRVIRKALMDSNLPRQLQLELYKEIK
 RINGAPRSLRAALWRFAELAHLVKCRPFYLVNLLPCLTRTSKRFEESVQETLAAAVPK
 IMASFGNFANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPTIRTAAGSAVVICQHSRATQYFYSWLLN

Run Coils Clear Input

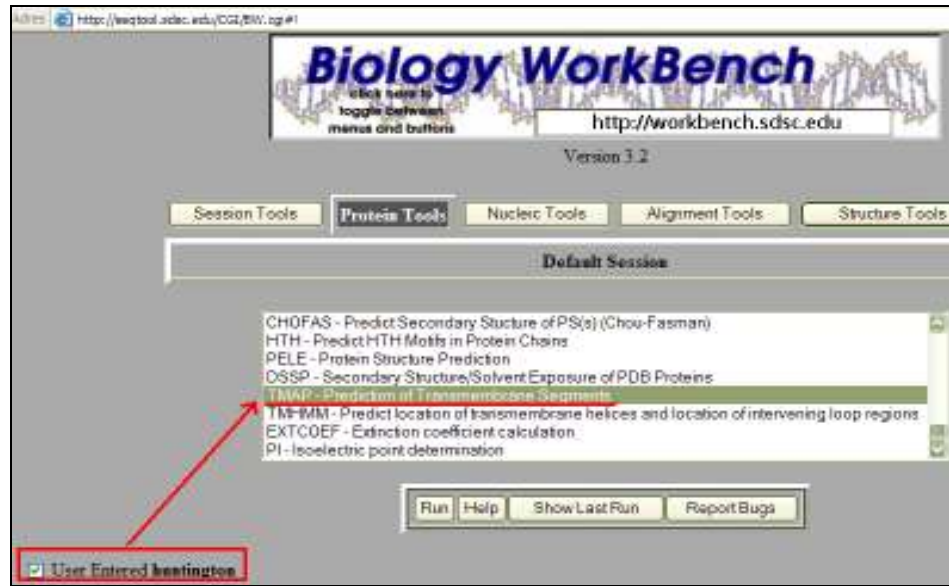
Şekil 4.6. Sarılmış sarmal bölgelerinin araştırılması
www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html



Şekil 4.7. Huntingtin proteininin sarılmış sarmal bölgeleri
www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html

4.1.5. Transmembran Bölgelerinin Araştırılması

Huntingtin proteininin transmembran bölgeleri "Biology Work Bench" internet sayfasında yer alan TMAP programında araştırıldı (Şekil 4.8.). Huntingtin proteininde 13 adet transmembran özellik gösteren bölümü bulundu (Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. Huntingtin proteininin transmembran bölgelerinin araştırılması (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>)

```

TMAP Results

RESULTS from program TMAP, edition 52

Numbers give: a) number of transmembrane segment
              b) start of TM segment (alignment position / residue number)
              c) end of TM segment (alignment position / residue number)
              d) length of TM segment within parentheses

PREDICTED TOPOLOGY: Nin (contributions: 2 in 1 out K in R in)
'in' corresponds to 'cytosolic'; 'out' corresponds to 'non-cytosolic'

PREDICTED TRANSMEMBRANE SEGMENTS
TM 1: 311 - 326 (16)
TM 2: 762 - 790 (29)
TM 3: 1023 - 1051 (29)
TM 4: 1065 - 1085 (21)
TM 5: 1091 - 1111 (21)
TM 6: 1489 - 1514 (26)
TM 7: 1669 - 1690 (22)
TM 8: 1773 - 1799 (27)
TM 9: 1824 - 1852 (29)
TM 10: 2310 - 2337 (28)
TM 11: 2389 - 2410 (22)
TM 12: 2499 - 2525 (27)
TM 13: 3061 - 3078 (18)

```


Şekil 4.9. Huntingtinin transmembran özellik gösteren bölümleri (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>)

4.2. Huntingtin Proteinin Modelinin Çıkarılması

Huntingtin proteinin modelini oluşturmak üzere www.ca.expasy.org/tools/ internet sitesinde bulunan aşağıdaki programlar denendi ve en iyi sonuç “Threading” bölümünde yer alan LOOPP (Protein modellerini öğrenme, gözleme ve üretme) adlı protein tanımlama programı ile elde edildi (Şekil 4.10).

3 Boyutlu Yapı Tahmini

Karşılaştırmalı modelleme

- [SWISS-MODEL](#)  - Otomasyonlu bilgiye dayalı protein modelleme sunucusu
(An automated knowledge-based protein modelling server)
- [3D yapboz](#) - Bilinen yapının homologuna dayalı proteinler için üç boyutlu modeller
(Three-dimensional models for proteins based on homologues of known structure)
- [CPH models](#) - Otomasyonlu nöral- ağa dayalı protein modelleme sunucusu
(Automated neural-network based protein modelling server)
- [ESyPred3D](#) - Nöral ağları kullanan otomasyonlu homoloji modelleme programı
(Automated homology modeling program using neural networks)
- [Geno3d](#) - Protein üç boyutlu yapısının otomatik modellenmesi
(Automatic modelling of protein three-dimensional structure)
- [SDSC1](#) - Protein Yapısı Homoloji Modelleme Sunucusu
(Protein Structure Homology Modeling Server)

Threading

- [3D-PSSM](#) - İkincil yapı bilgisiyle birlikte 1D ve 3D dizi profillerini kullanan protein yapı tahmini
(Protein fold recognition using 1D and 3D sequence profiles coupled with secondary structure information (Foldfit))
- [Fugue](#) - Dizi- yapı homoloji teşhisi
(Sequence-structure homology recognition)
- [HHpred](#) - HMM-HMM karşılaştırmasıyla protein homoloji saptaması ve yapı tahmini
(Protein homology detection and structure prediction by HMM-HMM comparison)
- [Libellula](#) - Fold teşhis sonuçlarını değerlendirmek için nöral ağ yaklaşımı
(Neural network approach to evaluate fold recognition results)
- [LOOPP](#) - diziye diziye, diziye yapıya ve yapıyı yapıya bağlama
(Sequence to sequence, sequence to structure, and structure to structure alignment)
- [SAM-T02](#) - HMM'ye dayalı Protein Yapı Tahmini
(HMM-based Protein Structure Prediction)
- [Threader](#) - Protein yapı tahmini
(Protein fold recognition)
- [ProSup](#) - Protein yapı sümpresyonu
(Protein structure superimposition)
- [SWEET](#) - Dizilerinden sakaridlerin 3D modelleri inşa etmek
(Constructing 3D models of saccharides from their sequences)

Şekil 4.10. Model oluşturmak için denenen programlar (www.expasy.org)

4.2.1. LOOPP

LOOPP protein katlanma potansiyelleri için bir taslak oluşturur. <http://cbsu.tc.cornell.edu/> internet sayfasında LOOPP seçilerek ilgili sayfaya yönlendirme gerçekleştirildi (Şekil 4.11.).

Computational Biology Service Unit
Microsoft High-Performance Computing Institute

Welcome to Computational Biology Service Unit
member of Cornell Life Sciences Core Laboratories Center

Web computing tools developed/hosted at CBSU through easy-to interface

LOOPP	MOIL	BLAST (parallel, real-time)	Genome Seq. Alignment	R
MDIV	MDIV	PathogenTracker	iDeCAL	
CLUSTALW (parallel, real-time)	P-HMMER (Pfam)	MKPRF	MODELLER	P
Drosophila BLAST	URMS			

CBSU Microsoft HPC
[CBSU bioinformatics support for the next generation sequencing](#)
[CAC Desktop Bioinformatics Applications for Windows](#)
[FTP server with sequence databases used with CBSU programs \(both formatted and fasta\)](#)

CBSU was founded in 2001 as a computational resource for the Tri-institutional Collaboration

Şekil 4.11. <http://cbsu.tc.cornell.edu/> internet sayfasında LOOPP'a yönlendirilme

4.2.1.1. LOOPP' ta Görev Yüklenmesi

www.cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx internet sayfasına ilk önce “E-mail” yazan kutuya e-posta adresi yazıldı. “Job name” bölümüne protein400 ismi, “input sequence” bölümüne de proteinin 400 amino asitlik parçaları sırayla görev olarak

yüklendi. “Advanced options” da yer alan özellikler standart bırakıldı ve “Submit” yapılarak görev başlatıldı (Şekil 4.12).

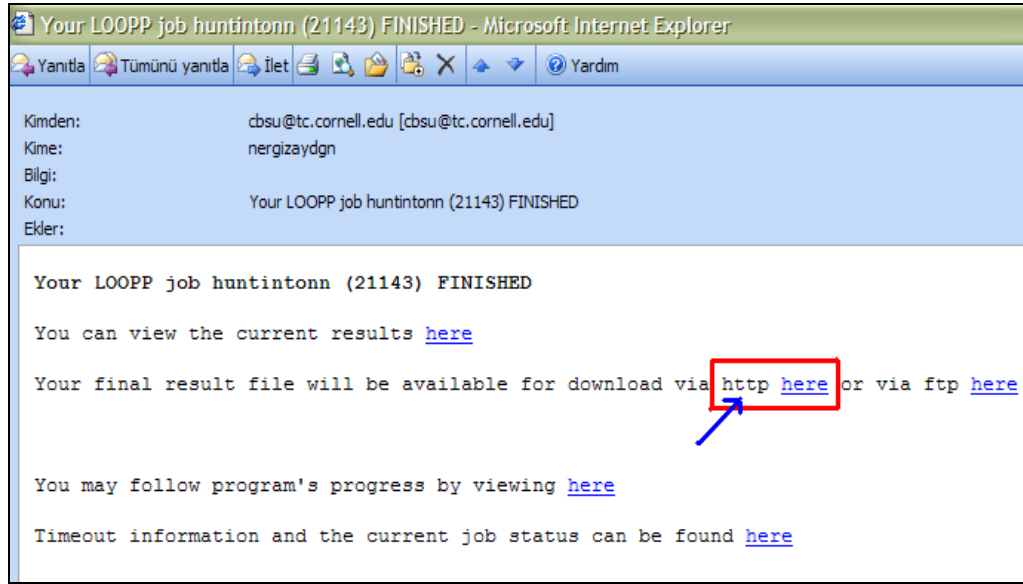
Şekil 4.12. Protein400 görevinin yüklenmesi

(www.cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx)

4.2.1.2. Sonuçların yüklenmesi

Sonuçlar zipli dosya şeklinde e-posta adresine geldikten sonra e-posta daki “[http here](#)” tıklatılarak dosya yükleme tamamlandı (Şekil 4.13.) ve bilgisayarda yeni bir klasöre kaydedildi.

Yükleme işlemi tamamlandığında dosyalar açılarak en iyi beş sonuç kopyalanarak ayrı bir klasörde toplandı (Şekil 4.14.). Bu en iyi beş sonuç daha sonra VMD programına yüklendi ve proteinin modeli çıkarıldı.



Şekil 4.13. Sonlanmış görevin dosya yükleme işlemi

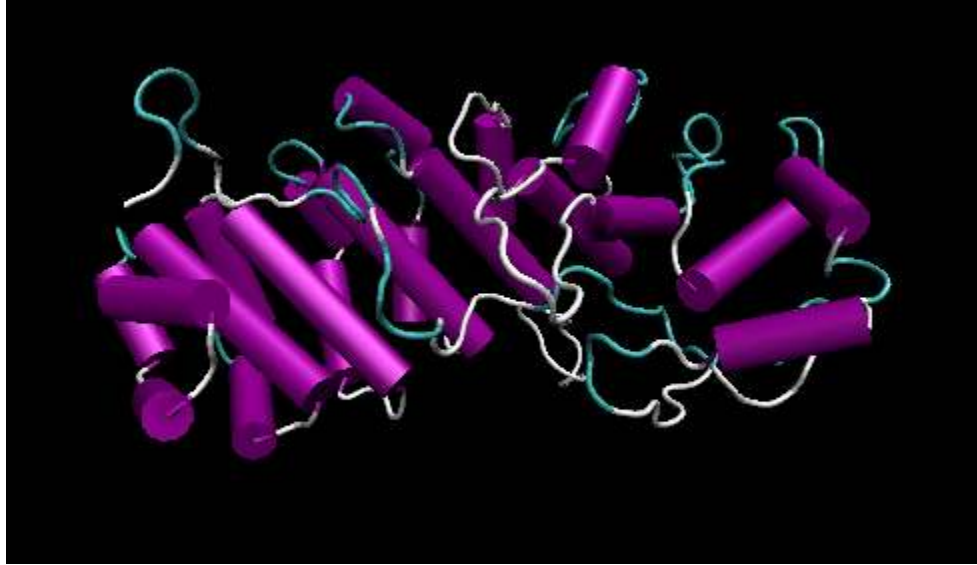


Şekil 4.14. En iyi beş sonucun görüntülenmesi

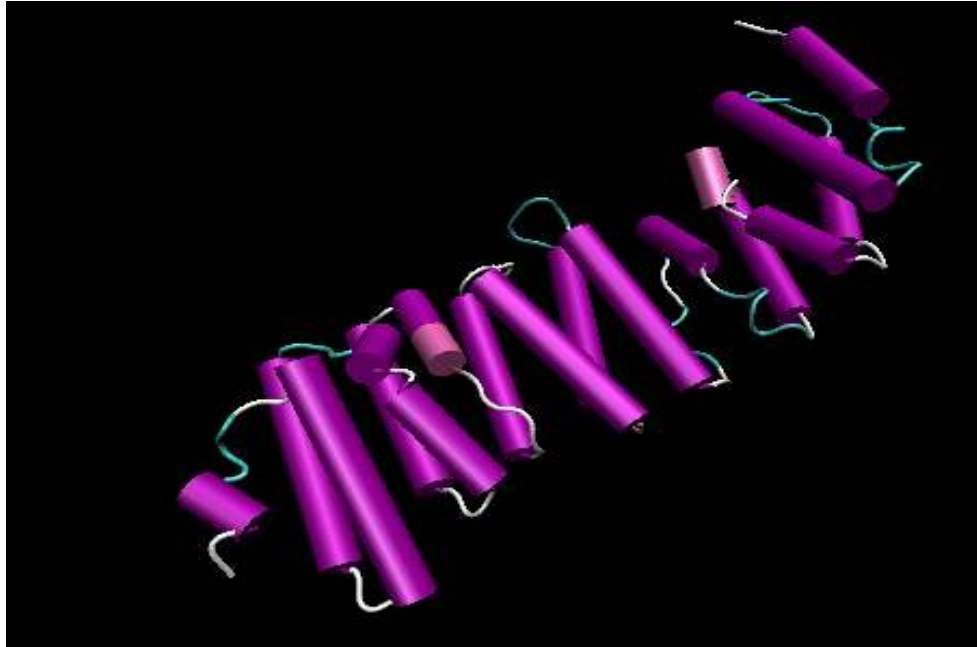
4.2.2. VMD Programında Huntingtin Proteinin Modelinin Çıkarılması

Protein 400 lük parçalar halinde LOOPP'a yüklendi çünkü program kısa amino asit dizilerinde daha olumlu ve gerçeğe yakın sonuçlar veriyor. LOOPP'tan gelen

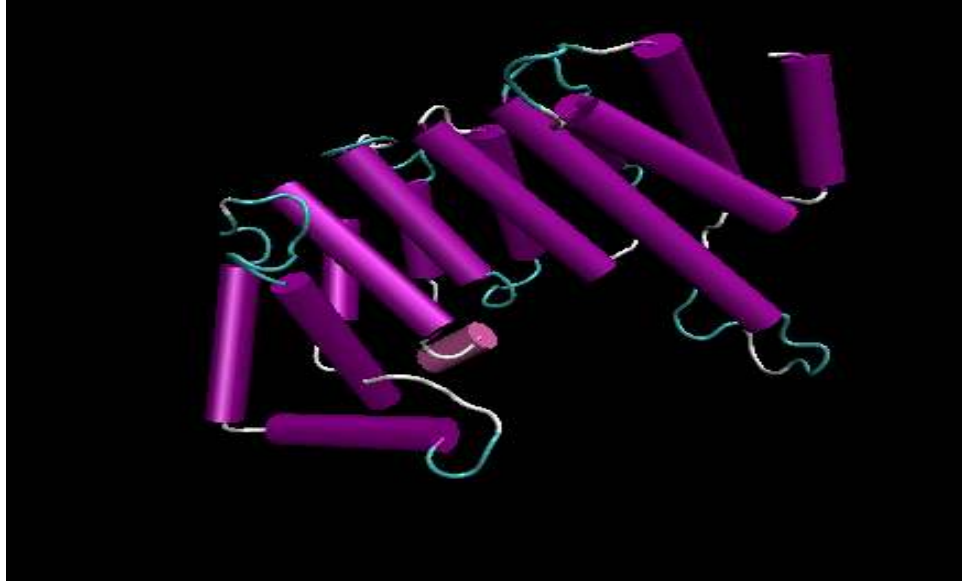
sonuçlar doğrultusunda ilk 400 amino asit için en iyi beş sonuç 1WA5_B (şekil 4.15.), 1B3U_A (şekil 4.16.), 1IBR_B (şekil 4.17.), 1W9C_A (şekil 4.18.) ve 1Q1S_C (şekil 4.19.)'dir.



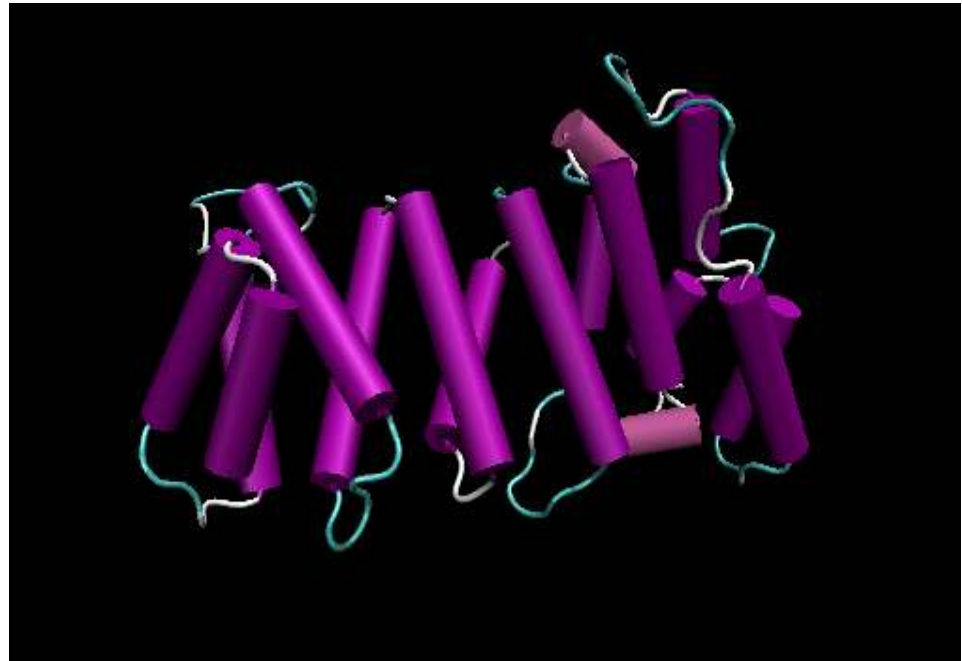
şekil 4.15. 1WA5_B proteinin modeli



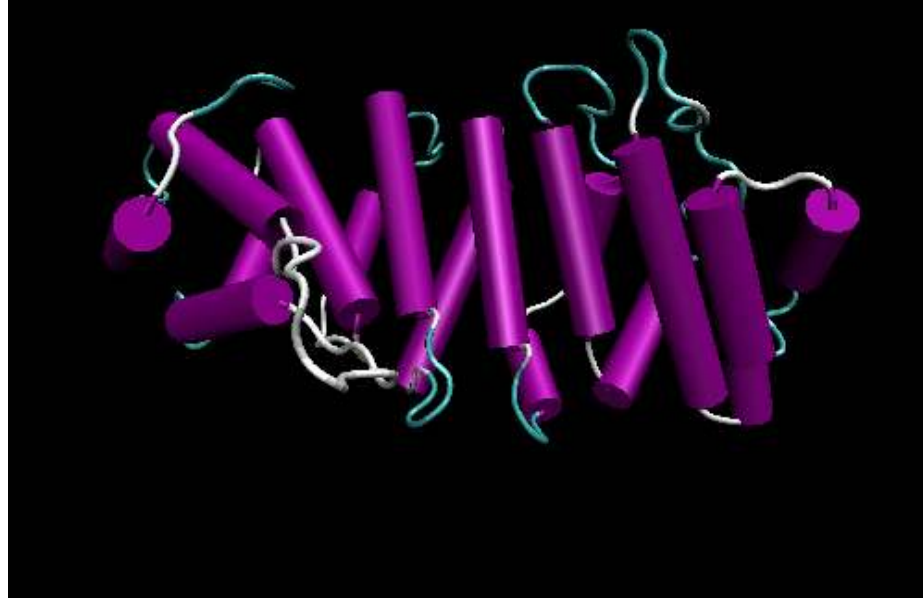
şekil 4.16. 1B3U_A proteinin modeli



Şekil 4.17. 1IBR_B protein modeli



Şekil 4.18. 1W9C_A protein modeli



Şekil 4.19. 1Q1S_C protein modeli

www.expasy.org internet sayfasında yer alan HHpred programı ile huntingtin proteininin yapısı araştırıldı ve çıkan sonuçlar doğrultusunda diğer proteinlere göre 1WA5_B proteininin ilk 400 amino asitlik bölümü ile en fazla benzerlik gösterdiği ispat edildi (Şekil 4.20.).

HOME | Login | Personal Database

Bioinformatics Toolkit
Max-Planck Institute for Developmental Biology

This website is optimized for M

Show results of job:

FeatHMMER | HHpred | HHsenser | NucleotideBLAST | PSI-BLAST | PatternSearch | ProteinBLAST

New job | Resubmit | Resubmit/HHsenser | Resubmit/HMM | Realign | Log | Delete

HHpred - Results Job-ID: 8396896 Date: 04:30 on Feb 16 2007

Results | Histogram | Show query alignment

Create model | Merge Q/T alignments | Save | Export

Color alignments color only SS color alignments color alignments

Need help on how to interpret your results? Click [here](#).

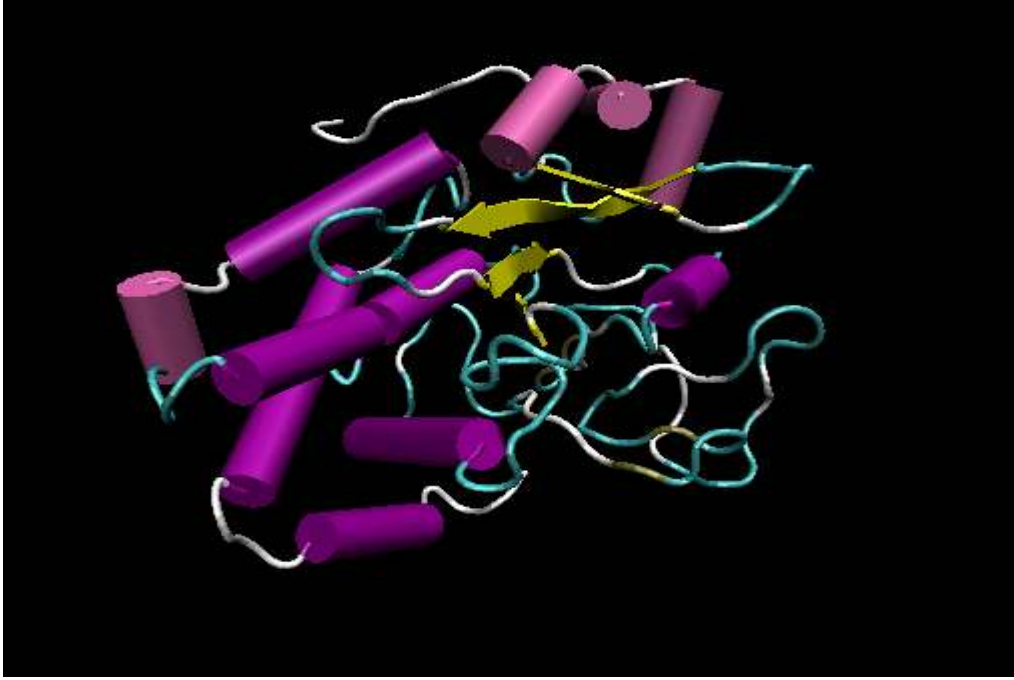
100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700 1800 1900 2000 2100 2200 2300 2400

118- 119- 120- 121- 122- 123- 124- 125- 126- 127- 128- 129- 130- 131- 132- 133- 134- 135- 136- 137- 138- 139- 140- 141- 142- 143- 144- 145- 146- 147- 148- 149- 150- 151- 152- 153- 154- 155- 156- 157- 158- 159- 160- 161- 162- 163- 164- 165- 166- 167- 168- 169- 170- 171- 172- 173- 174- 175- 176- 177- 178- 179- 180- 181- 182- 183- 184- 185- 186- 187- 188- 189- 190- 191- 192- 193- 194- 195- 196- 197- 198- 199- 200- 201- 202- 203- 204- 205- 206- 207- 208- 209- 210- 211- 212- 213- 214- 215- 216- 217- 218- 219- 220- 221- 222- 223- 224- 225- 226- 227- 228- 229- 230- 231- 232- 233- 234- 235- 236- 237- 238- 239- 240- 241- 242- 243- 244- 245- 246- 247- 248- 249- 250- 251- 252- 253- 254- 255- 256- 257- 258- 259- 260- 261- 262- 263- 264- 265- 266- 267- 268- 269- 270- 271- 272- 273- 274- 275- 276- 277- 278- 279- 280- 281- 282- 283- 284- 285- 286- 287- 288- 289- 290- 291- 292- 293- 294- 295- 296- 297- 298- 299- 300- 301- 302- 303- 304- 305- 306- 307- 308- 309- 310- 311- 312- 313- 314- 315- 316- 317- 318- 319- 320- 321- 322- 323- 324- 325- 326- 327- 328- 329- 330- 331- 332- 333- 334- 335- 336- 337- 338- 339- 340- 341- 342- 343- 344- 345- 346- 347- 348- 349- 350- 351- 352- 353- 354- 355- 356- 357- 358- 359- 360- 361- 362- 363- 364- 365- 366- 367- 368- 369- 370- 371- 372- 373- 374- 375- 376- 377- 378- 379- 380- 381- 382- 383- 384- 385- 386- 387- 388- 389- 390- 391- 392- 393- 394- 395- 396- 397- 398- 399- 400- 401- 402- 403- 404- 405- 406- 407- 408- 409- 410- 411- 412- 413- 414- 415- 416- 417- 418- 419- 420- 421- 422- 423- 424- 425- 426- 427- 428- 429- 430- 431- 432- 433- 434- 435- 436- 437- 438- 439- 440- 441- 442- 443- 444- 445- 446- 447- 448- 449- 450- 451- 452- 453- 454- 455- 456- 457- 458- 459- 460- 461- 462- 463- 464- 465- 466- 467- 468- 469- 470- 471- 472- 473- 474- 475- 476- 477- 478- 479- 480- 481- 482- 483- 484- 485- 486- 487- 488- 489- 490- 491- 492- 493- 494- 495- 496- 497- 498- 499- 500- 501- 502- 503- 504- 505- 506- 507- 508- 509- 510- 511- 512- 513- 514- 515- 516- 517- 518- 519- 520- 521- 522- 523- 524- 525- 526- 527- 528- 529- 530- 531- 532- 533- 534- 535- 536- 537- 538- 539- 540- 541- 542- 543- 544- 545- 546- 547- 548- 549- 550- 551- 552- 553- 554- 555- 556- 557- 558- 559- 560- 561- 562- 563- 564- 565- 566- 567- 568- 569- 570- 571- 572- 573- 574- 575- 576- 577- 578- 579- 580- 581- 582- 583- 584- 585- 586- 587- 588- 589- 590- 591- 592- 593- 594- 595- 596- 597- 598- 599- 600- 601- 602- 603- 604- 605- 606- 607- 608- 609- 610- 611- 612- 613- 614- 615- 616- 617- 618- 619- 620- 621- 622- 623- 624- 625- 626- 627- 628- 629- 630- 631- 632- 633- 634- 635- 636- 637- 638- 639- 640- 641- 642- 643- 644- 645- 646- 647- 648- 649- 650- 651- 652- 653- 654- 655- 656- 657- 658- 659- 660- 661- 662- 663- 664- 665- 666- 667- 668- 669- 670- 671- 672- 673- 674- 675- 676- 677- 678- 679- 680- 681- 682- 683- 684- 685- 686- 687- 688- 689- 690- 691- 692- 693- 694- 695- 696- 697- 698- 699- 700- 701- 702- 703- 704- 705- 706- 707- 708- 709- 710- 711- 712- 713- 714- 715- 716- 717- 718- 719- 720- 721- 722- 723- 724- 725- 726- 727- 728- 729- 730- 731- 732- 733- 734- 735- 736- 737- 738- 739- 740- 741- 742- 743- 744- 745- 746- 747- 748- 749- 750- 751- 752- 753- 754- 755- 756- 757- 758- 759- 760- 761- 762- 763- 764- 765- 766- 767- 768- 769- 770- 771- 772- 773- 774- 775- 776- 777- 778- 779- 780- 781- 782- 783- 784- 785- 786- 787- 788- 789- 790- 791- 792- 793- 794- 795- 796- 797- 798- 799- 800- 801- 802- 803- 804- 805- 806- 807- 808- 809- 810- 811- 812- 813- 814- 815- 816- 817- 818- 819- 820- 821- 822- 823- 824- 825- 826- 827- 828- 829- 830- 831- 832- 833- 834- 835- 836- 837- 838- 839- 840- 841- 842- 843- 844- 845- 846- 847- 848- 849- 850- 851- 852- 853- 854- 855- 856- 857- 858- 859- 860- 861- 862- 863- 864- 865- 866- 867- 868- 869- 870- 871- 872- 873- 874- 875- 876- 877- 878- 879- 880- 881- 882- 883- 884- 885- 886- 887- 888- 889- 890- 891- 892- 893- 894- 895- 896- 897- 898- 899- 900- 901- 902- 903- 904- 905- 906- 907- 908- 909- 910- 911- 912- 913- 914- 915- 916- 917- 918- 919- 920- 921- 922- 923- 924- 925- 926- 927- 928- 929- 930- 931- 932- 933- 934- 935- 936- 937- 938- 939- 940- 941- 942- 943- 944- 945- 946- 947- 948- 949- 950- 951- 952- 953- 954- 955- 956- 957- 958- 959- 960- 961- 962- 963- 964- 965- 966- 967- 968- 969- 970- 971- 972- 973- 974- 975- 976- 977- 978- 979- 980- 981- 982- 983- 984- 985- 986- 987- 988- 989- 990- 991- 992- 993- 994- 995- 996- 997- 998- 999- 1000

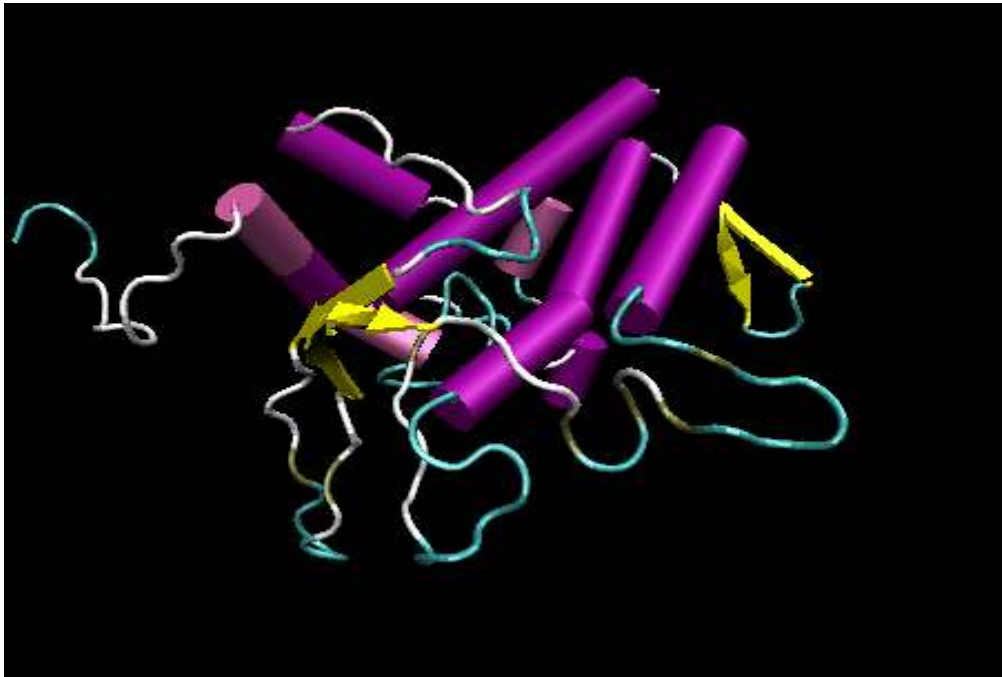
1WA5_B

Şekil 4.20. HHpred ile 1WA5_B proteinin gösterimi (www.expasy.org)

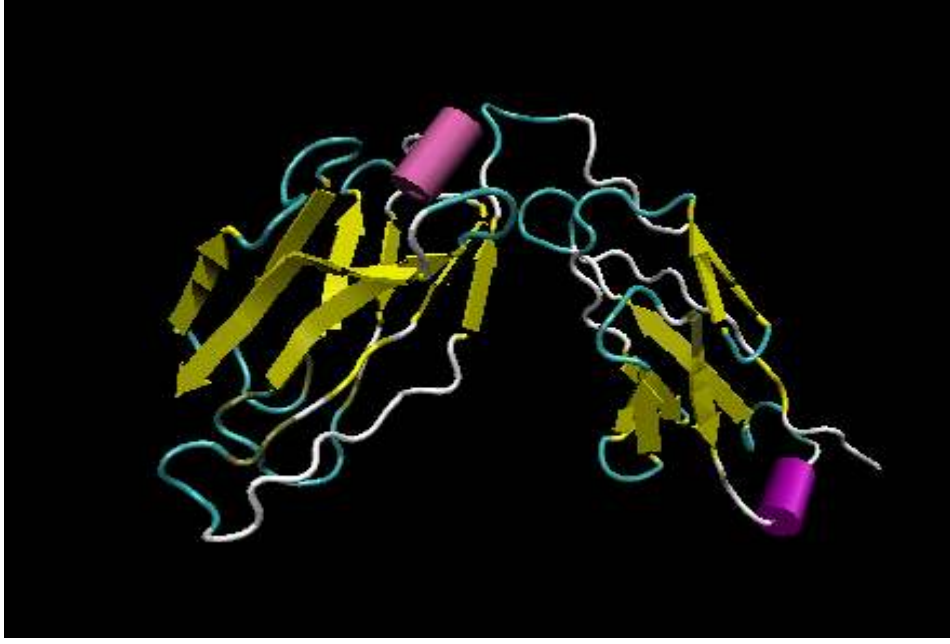
Proteinin ikinci 400 amino asitlik bölümü için gelen en iyi beş sonuç: 1PAI_A (Şekil 4.21), a.86.1.1.1 (Şekil 4.22), 1AO7_E (Şekil 4.23), 1LP9_E (Şekil 4.24) ve 1UP6_E (Şekil 4.25) proteinleridir.



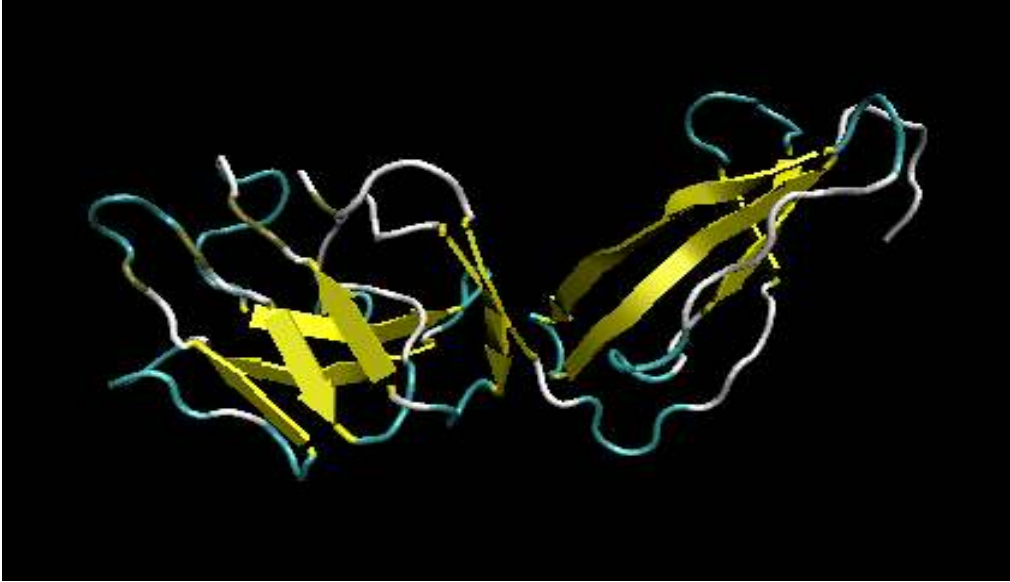
Şekil 4.21. 1PAI_A protein modeli



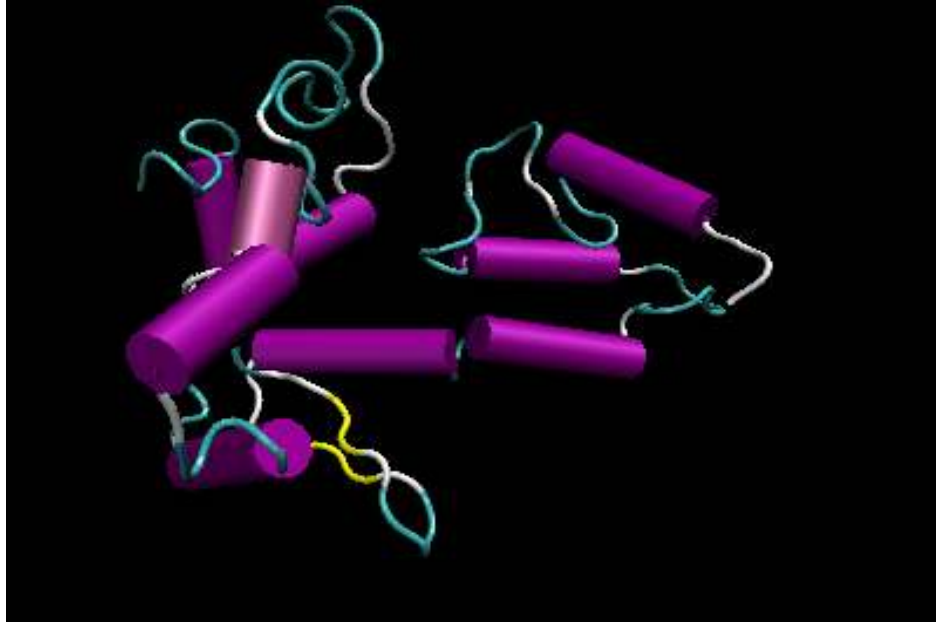
Şekil 4.22. a.86.1.1.1 protein modeli



Şekil 4.23. 1AO7_E protein modeli

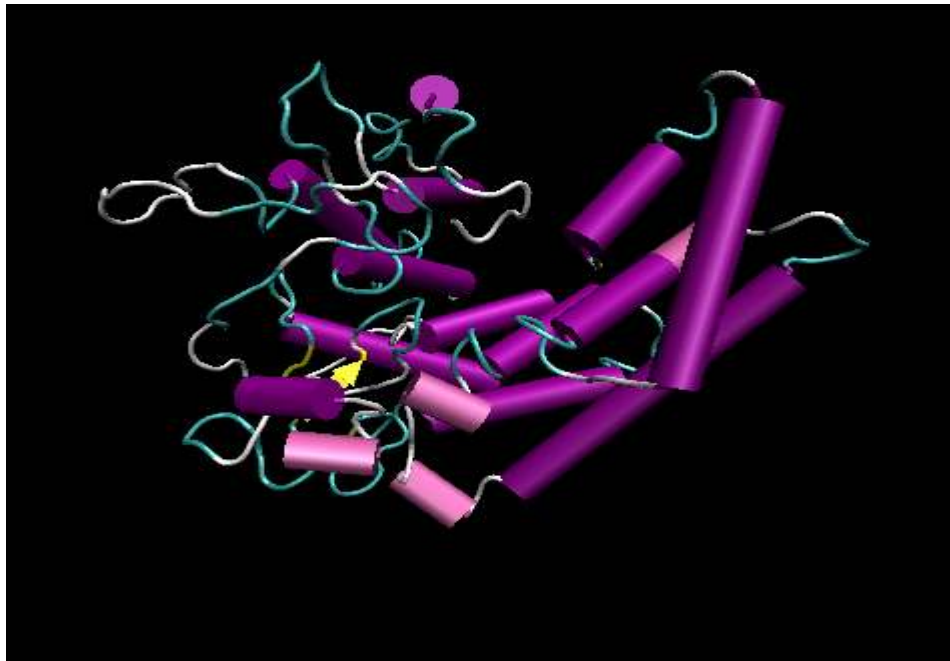


Şekil 4.24. 1LP9_E protein modeli

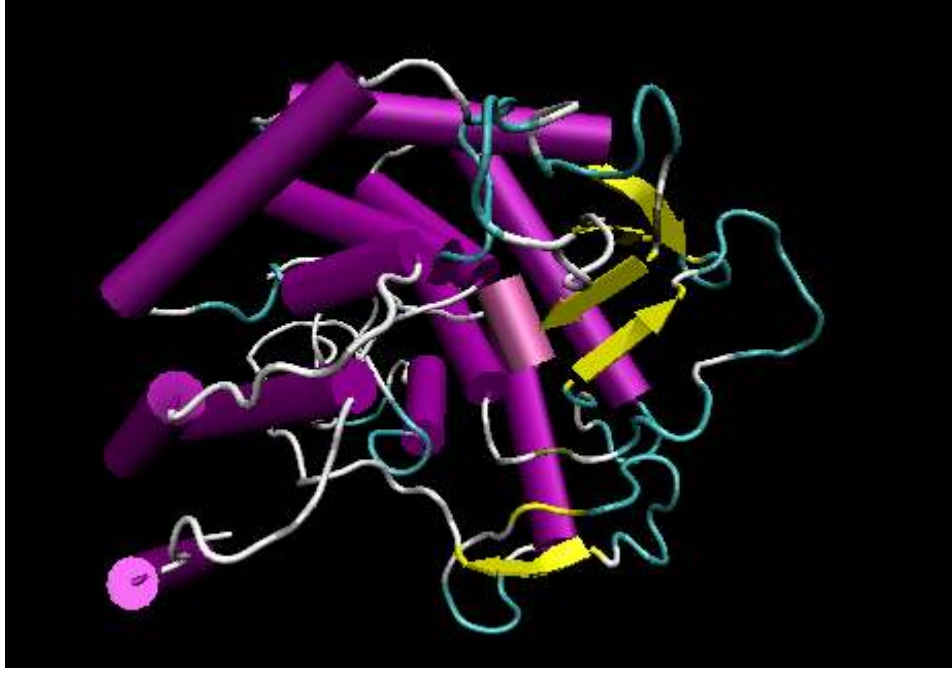


Şekil 4.25. 1UP6_E protein modeli

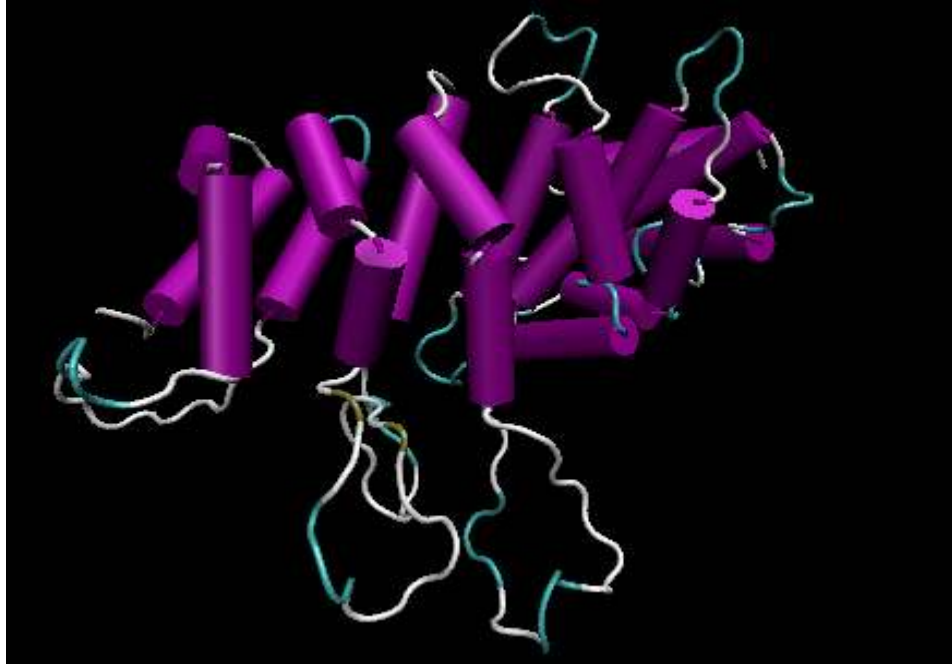
Proteinin üçüncü 400 amino asitlik bölümü için gelen en iyi beş sonuç: 2GO2_A (Şekil 4.26), 1X9D_A (Şekil 4.27), 1EE5_A (Şekil 4.28), 1Y2A_C (Şekil 4.29) ve 1Q1S_C (Şekil 4.30) proteinleridir.



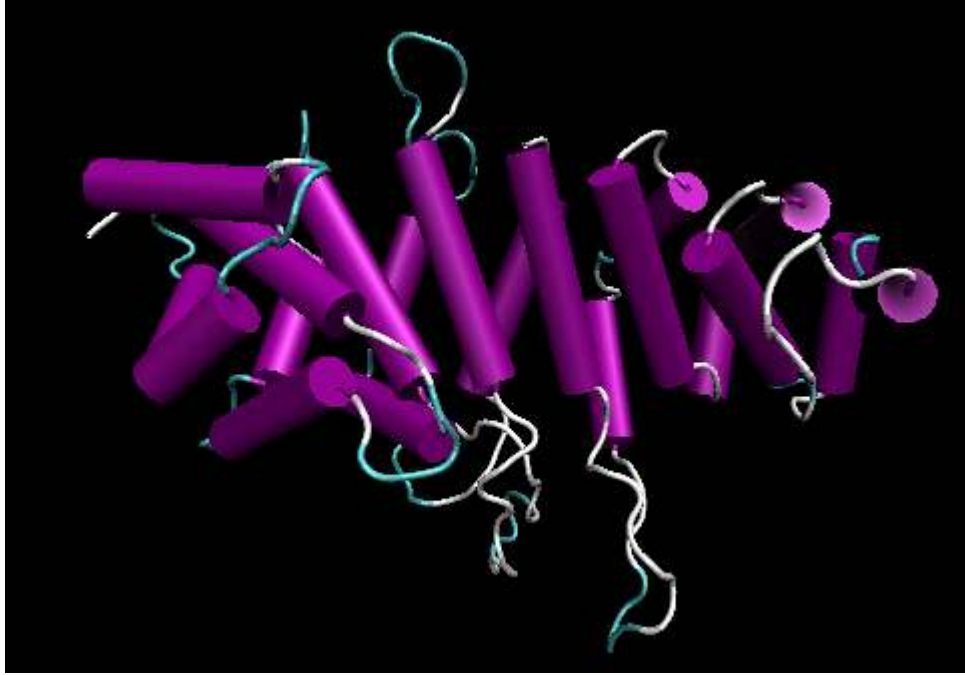
Şekil 4.26. 2GO2_A protein modeli



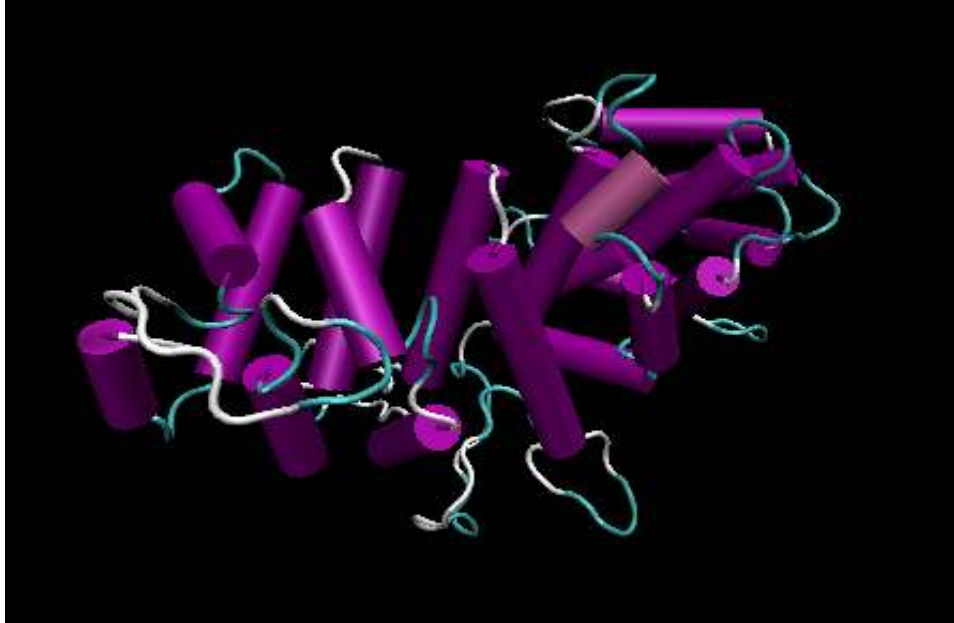
Şekil 4.27. 1X9D_A protein modeli



Şekil 4.28. 1EE5_A protein modeli

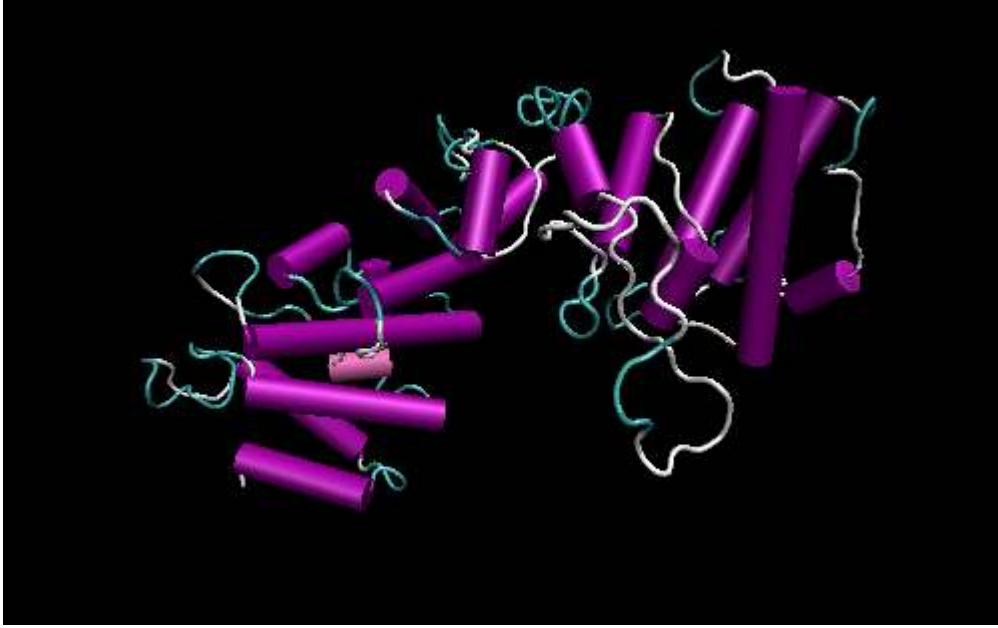


Şekil 4.29. 1Y2A_C protein modeli

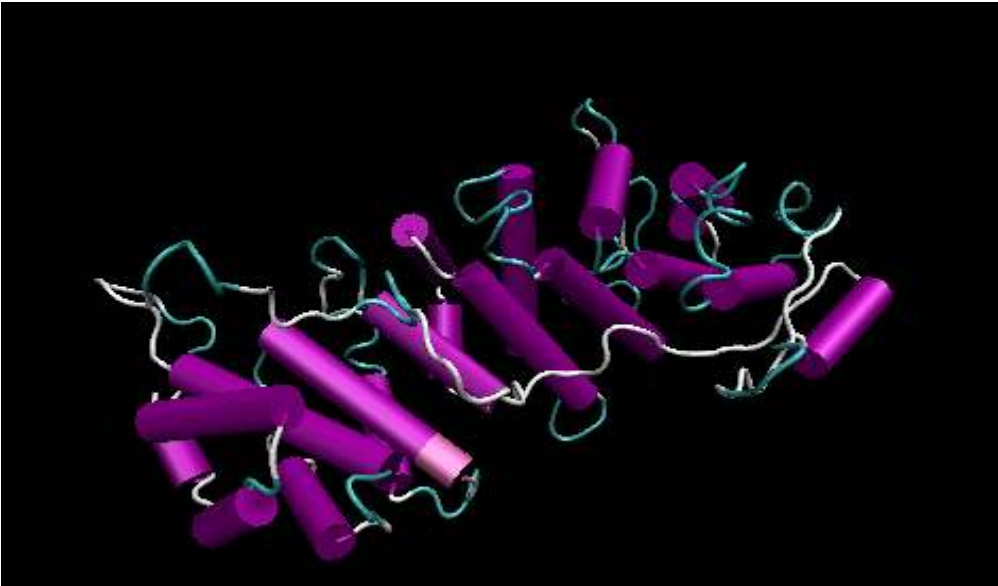


Şekil 4.30. 1Q1S_C protein modeli

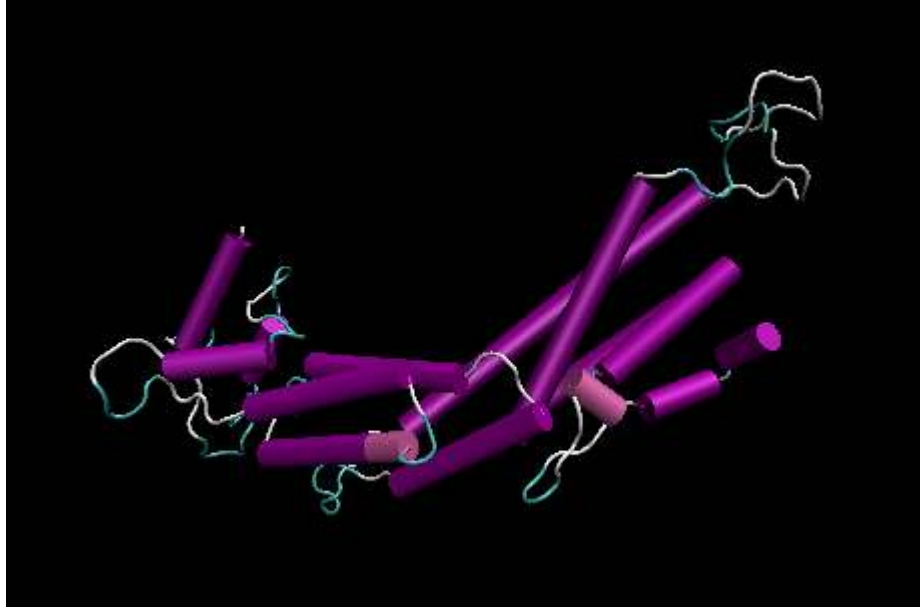
Proteinin dördüncü 400 amino asitlik bölümü için gelen en iyi beş sonuç: 1EE5_A (Şekil 4.31), 1WA5_B (Şekil 4.32), 2F6H_X (Şekil 4.33), 2GO2_A (Şekil 4.34) ve 2F5U_A (Şekil 4.35) proteinleridir.



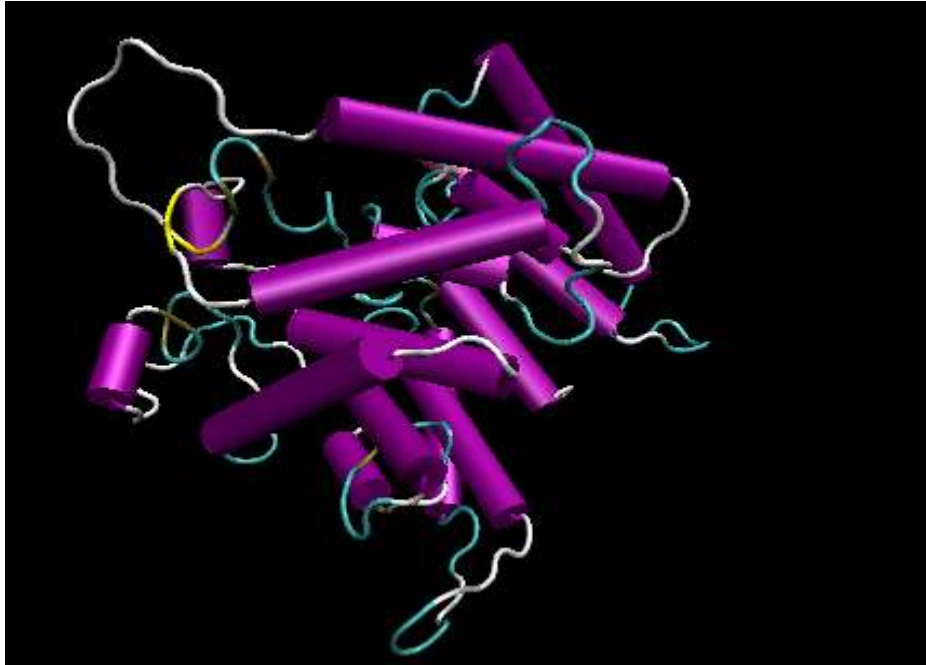
Şekil 4.31. 1EE5_A protein modeli



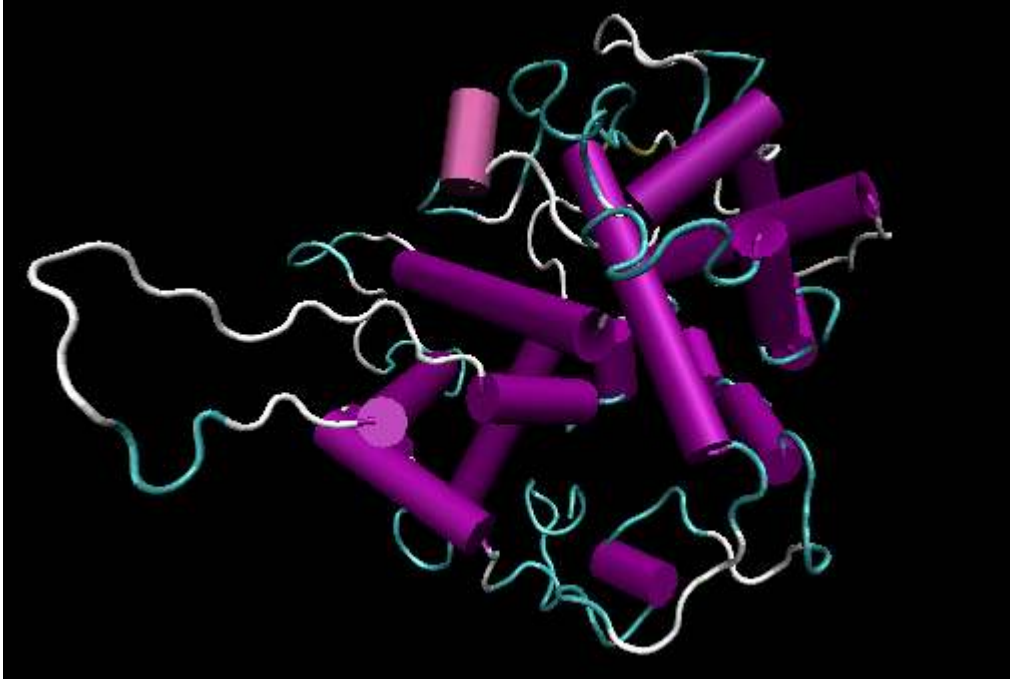
Şekil 4.32. 1WA5_B protein modeli



Şekil 4.33. 2F6H_X protein modeli

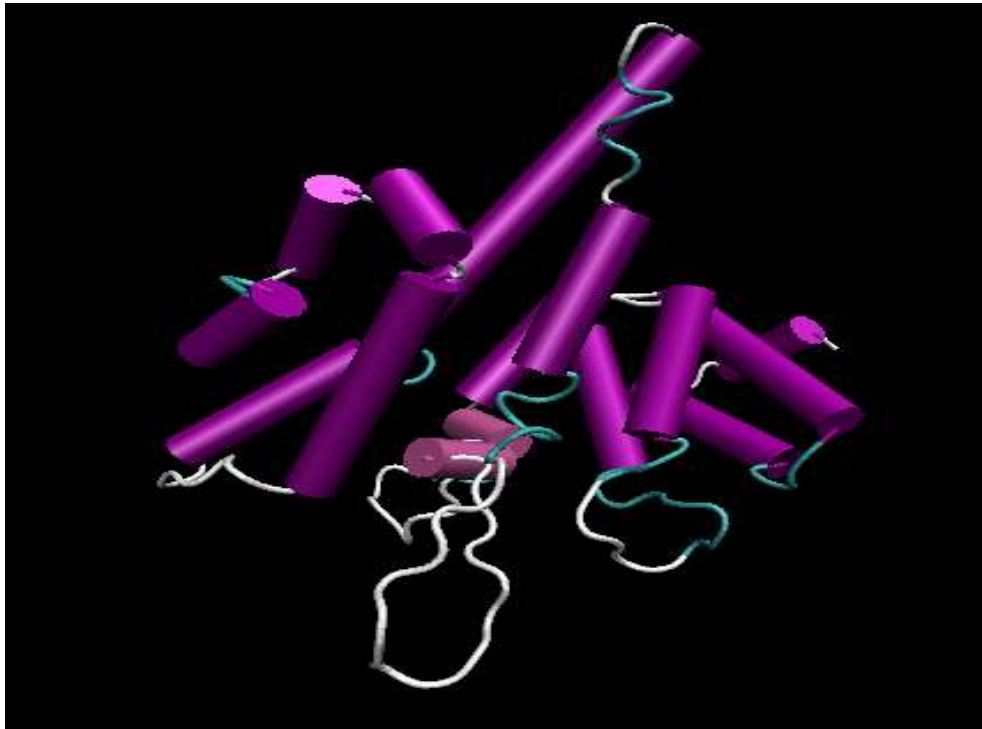


Şekil 4.34. 2GO2_A protein modeli

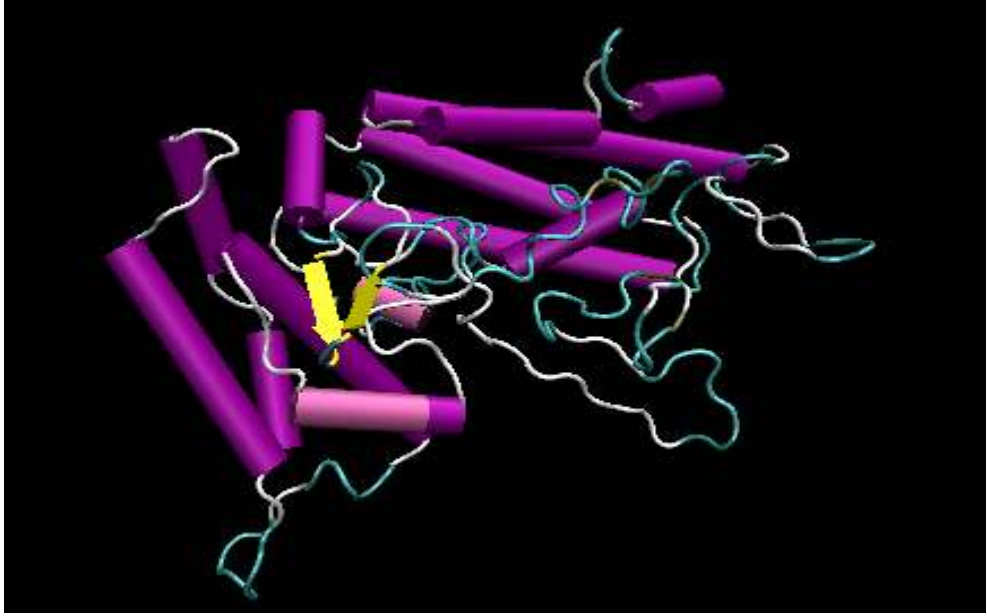


Şekil 4.35. 2F5U_A protein modeli

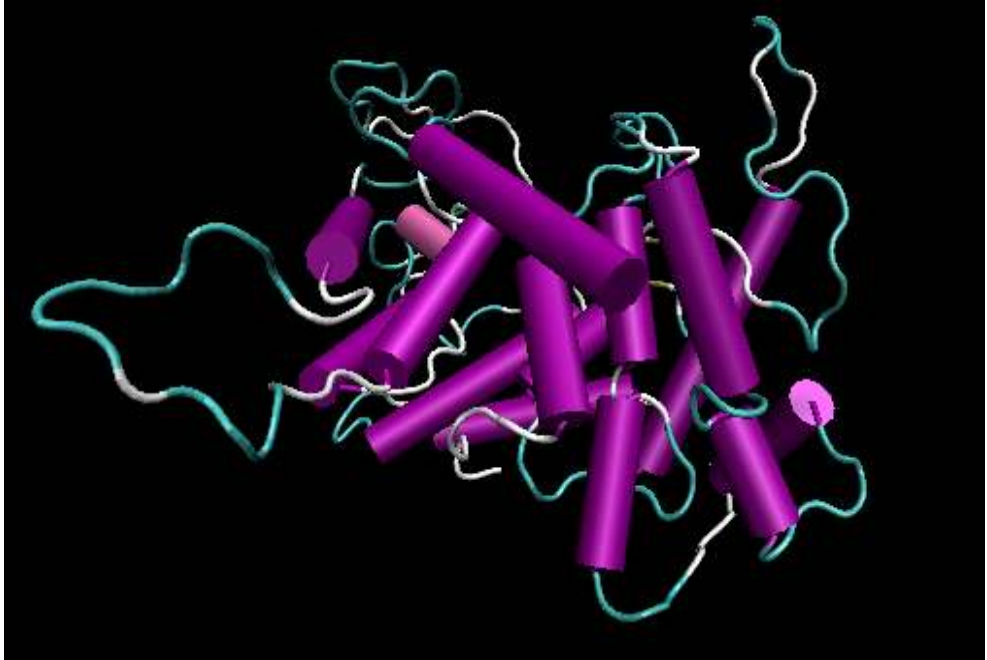
Proteinin beşinci 400 amino asitlik bölümü için gelen en iyi beş sonuç: a.118.1.14.3_A (Şekil 4.36), 1ZEE_A (Şekil 4.37), 1GAI (Şekil 4.38), 1Y2A_C (Şekil 4.39) ve 1Q1S_C (Şekil 4.40) proteinleridir.



Şekil 4.36. a.118.1.14.3_A protein modeli



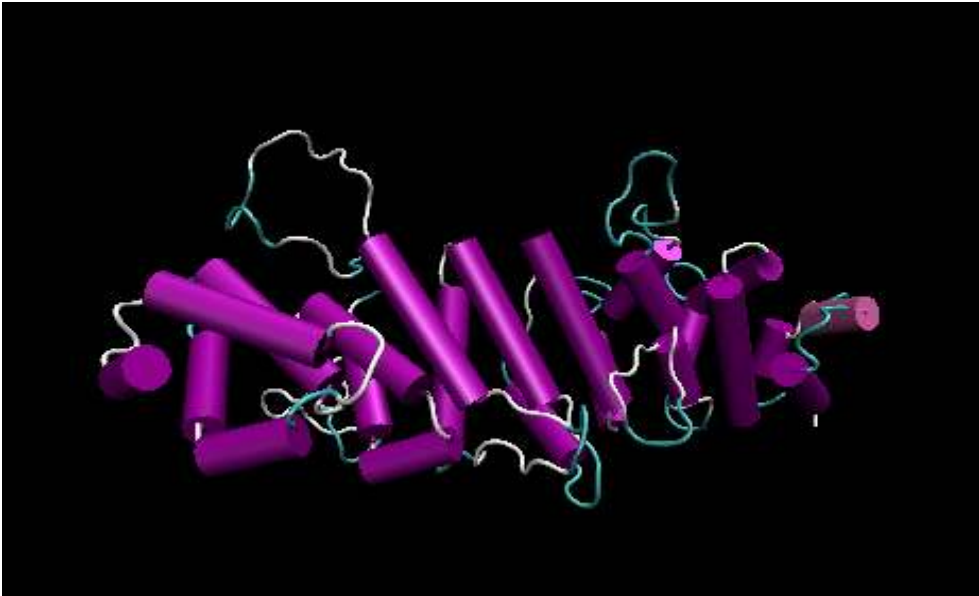
Şekil 4.37. 1ZEE_A protein modeli



Şekil 4.38. 1GAI protein modeli

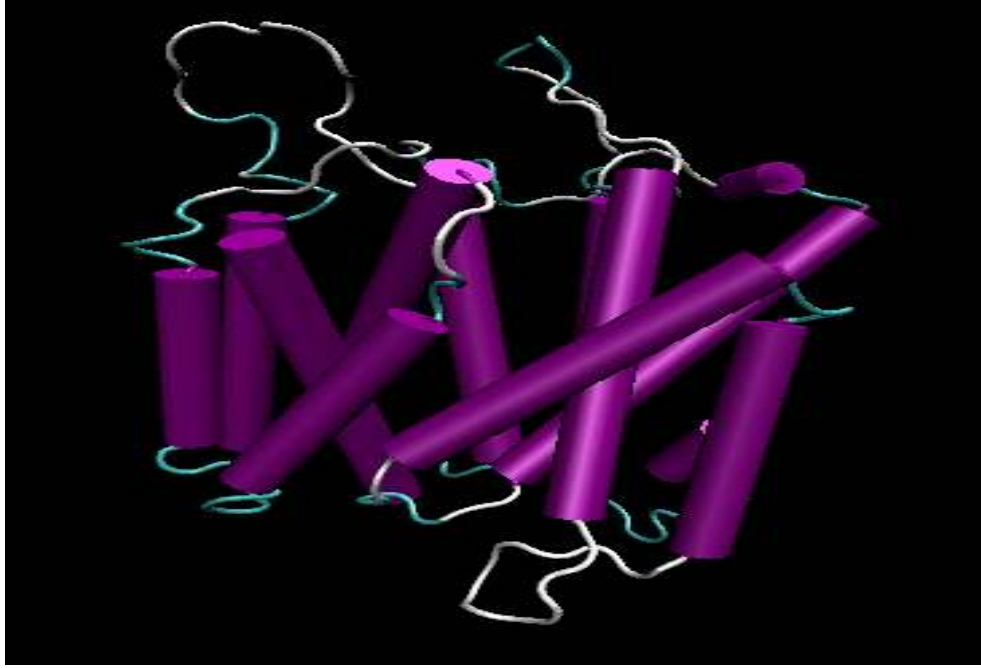


Şekil 4.39. 1Y2A_C protein modeli

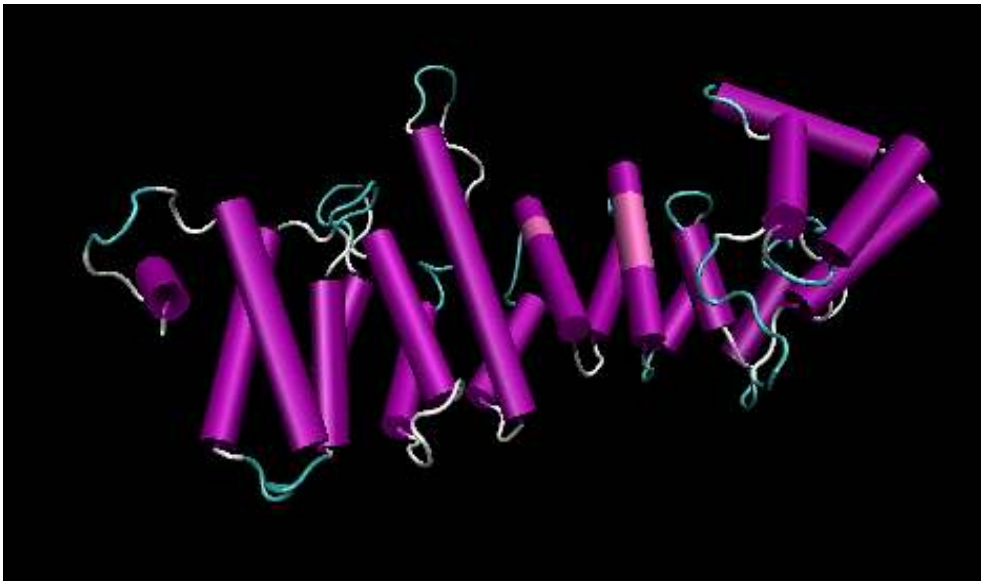


Şekil 4.40. 1Q1S_C protein modeli

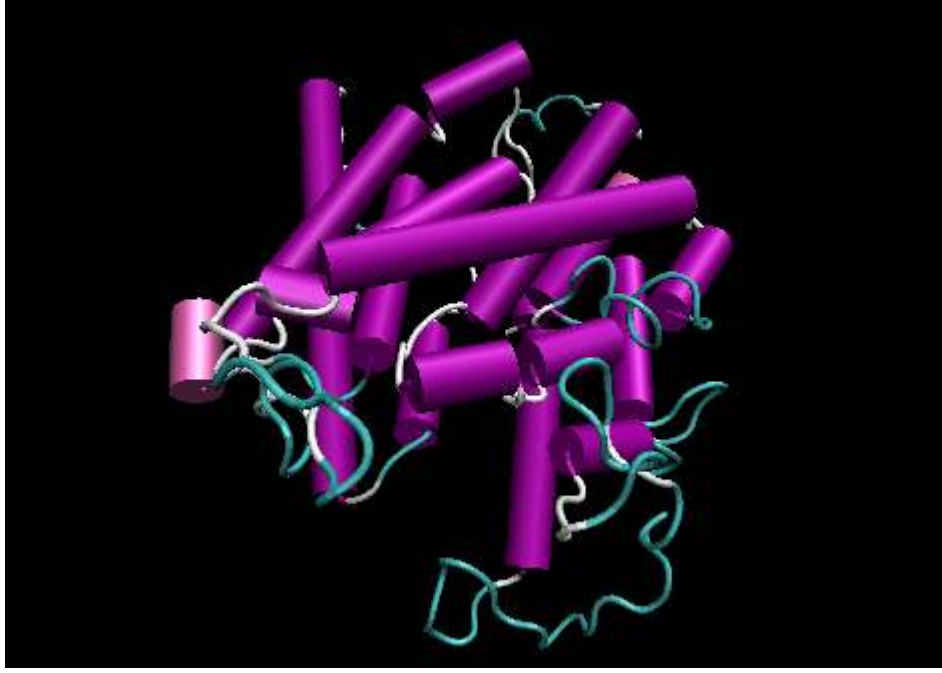
Proteinin altıncı 400 amino asitlik bölümü için gelen en iyi beş sonuç: 2GFP_A (Şekil 4.41), 1IBR_B (Şekil 4.42), 1U7G_A (Şekil 4.43), a.118.5.1.1_A (Şekil 4.44) ve 1Y2A_C (Şekil 4.45) proteinleridir.



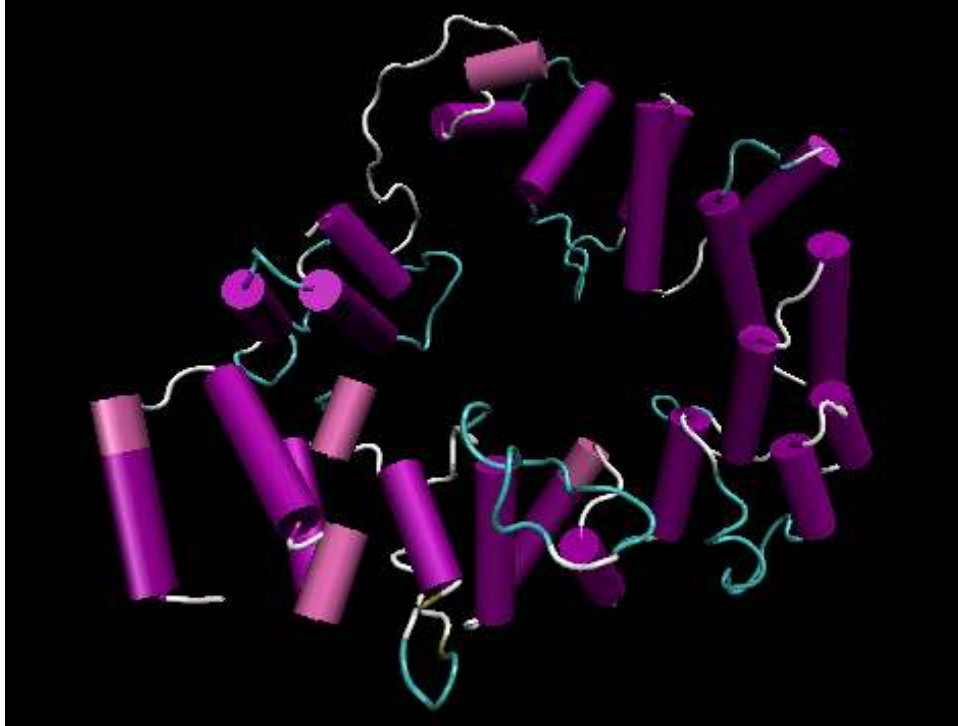
Şekil 4.41. 2GFP_A protein modeli



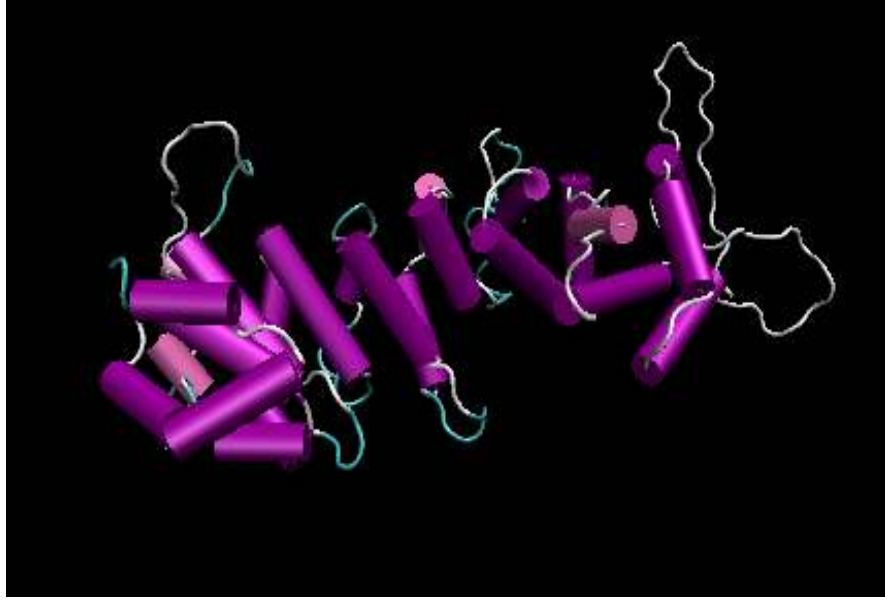
Şekil 4.42. 1IBR_B protein modeli



Şekil 4.43. 1U7G_A protein modeli

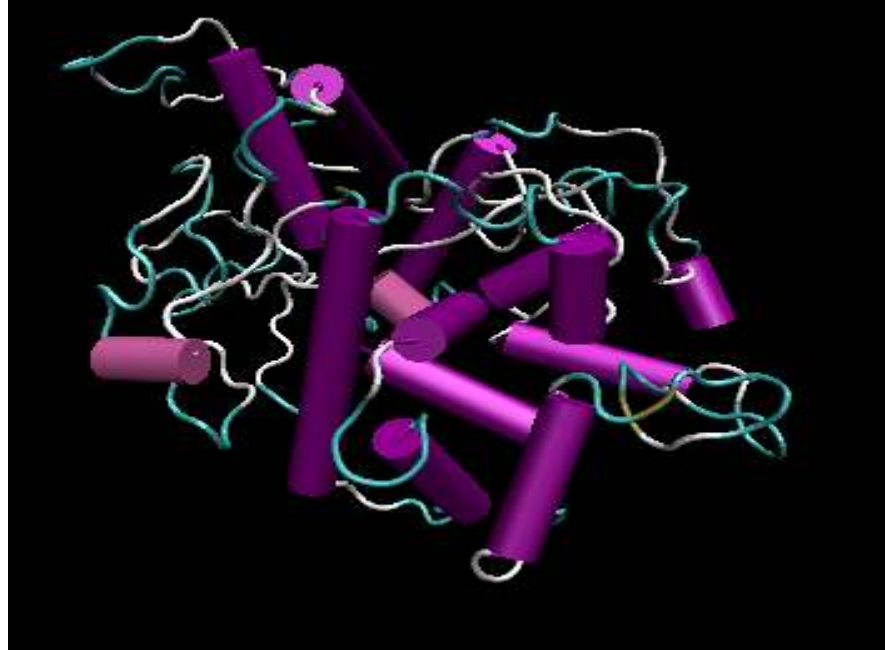


Şekil 4.44. a.118.5.1.1_A protein modeli

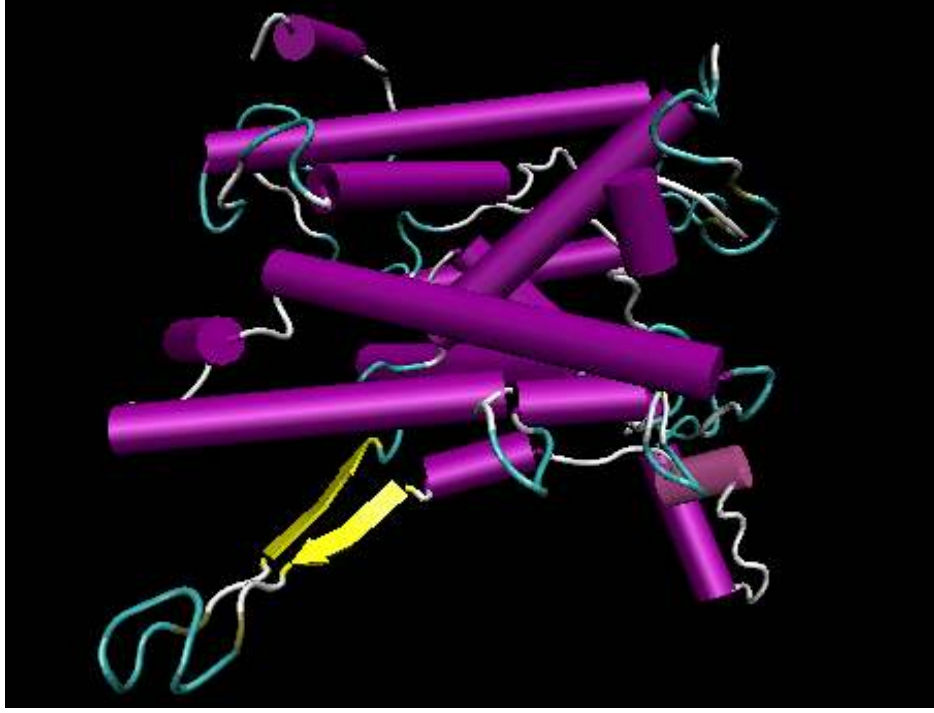


Şekil 4.45. 1Y2A_C protein modeli

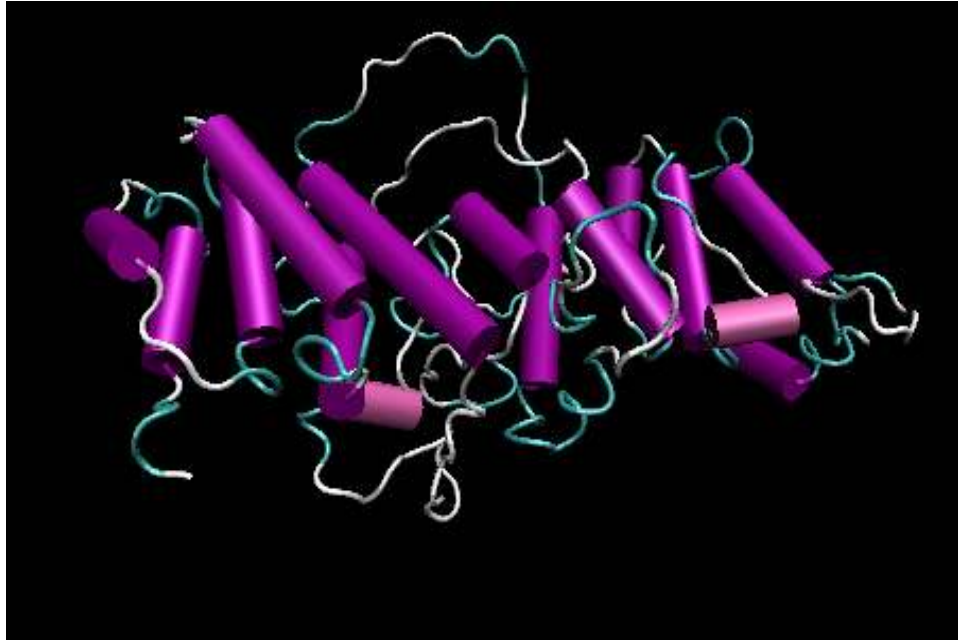
Proteinin yedinci 400 amino asitlik bölümü için gelen en iyi beş sonuç: 2F5U_A (Şekil 4.46), 1RH5_A (Şekil 4.47), 1IBR_B (Şekil 4.48), 1YFM (Şekil 4.49) ve 1C3C_A (Şekil 4.50) proteinleridir.



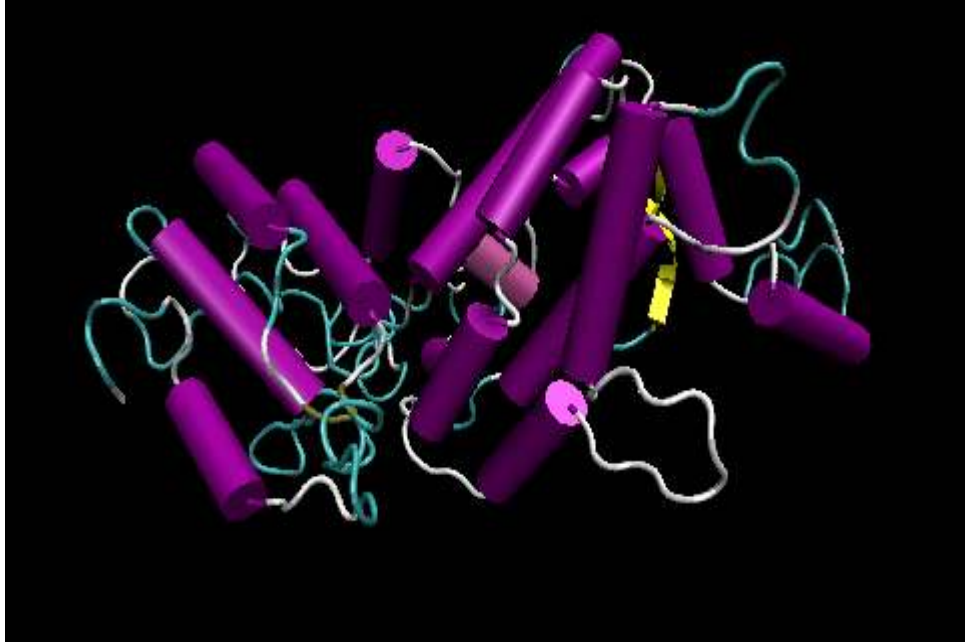
Şekil 4.46. 2F5U_A protein modeli



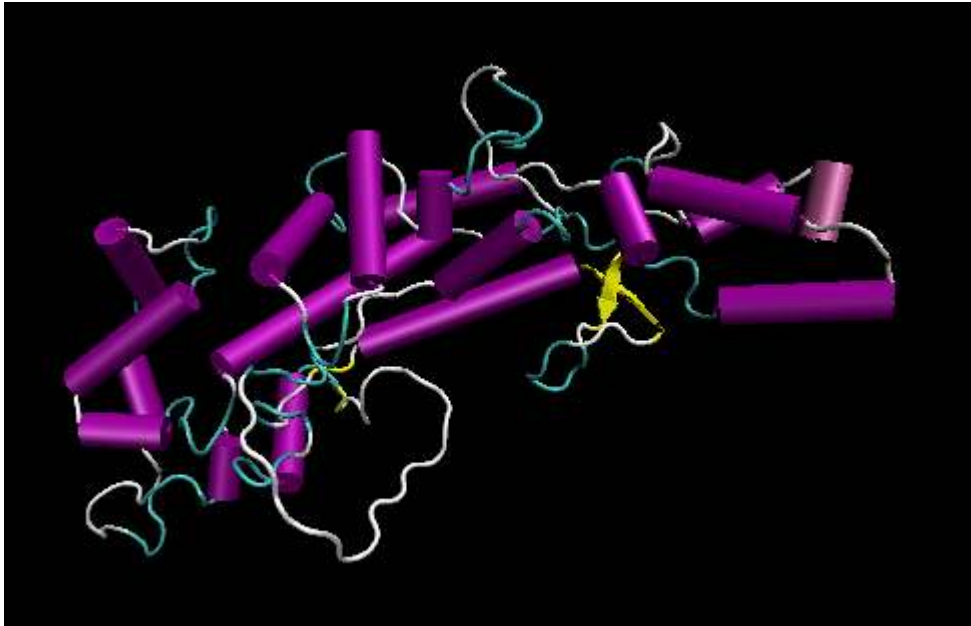
Şekil 4.47. 1RH5_A protein modeli



Şekil 4.48. 1IBR_B protein modeli

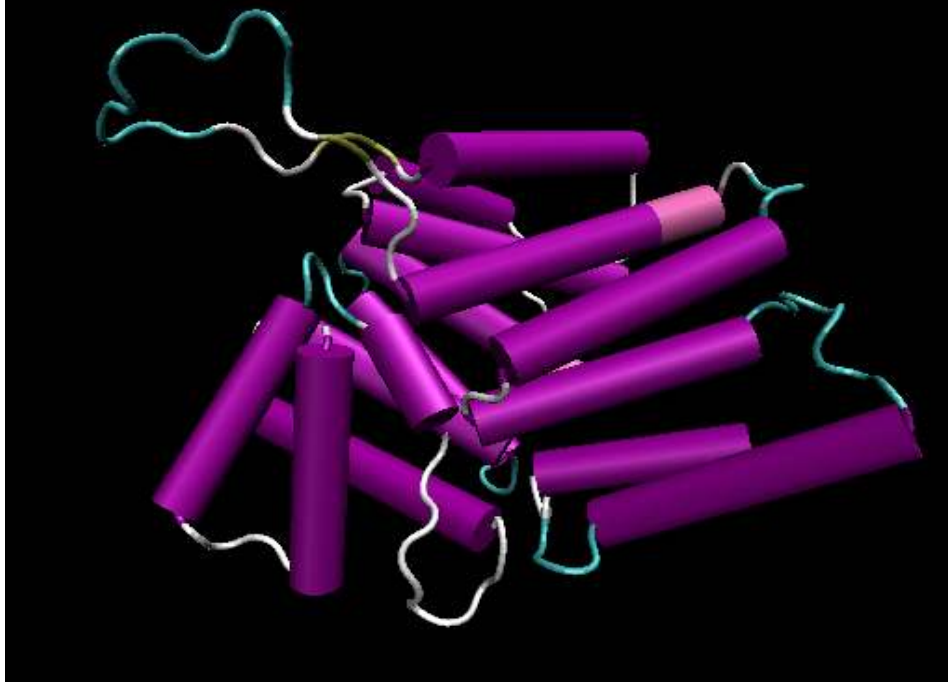


Şekil 4.49. 1YMF protein modeli

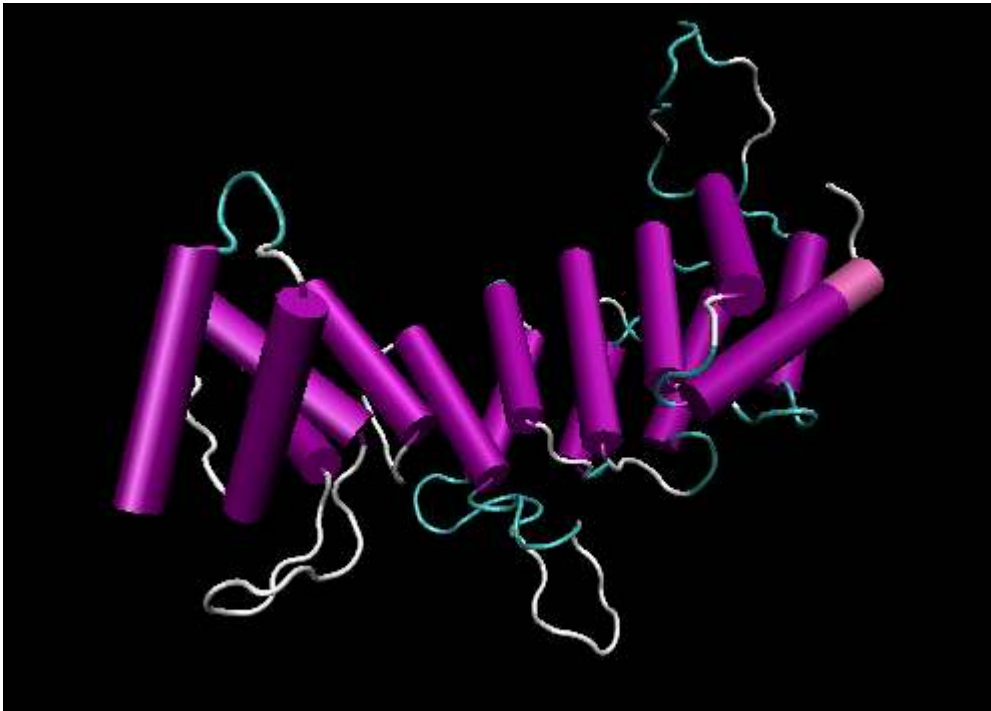


Şekil 4.50. 1C3C_A protein modeli

Proteinin son 344 amino asitlik bölümü için gelen en iyi beş sonuç: 1HZ4_A (Şekil 4.51), a.118.4.1.1_A (Şekil 4.52), 1XM9_A (Şekil 4.53), 1N4M_A (Şekil 4.54) ve 1Y2A_C (Şekil 4.55) proteinleridir.



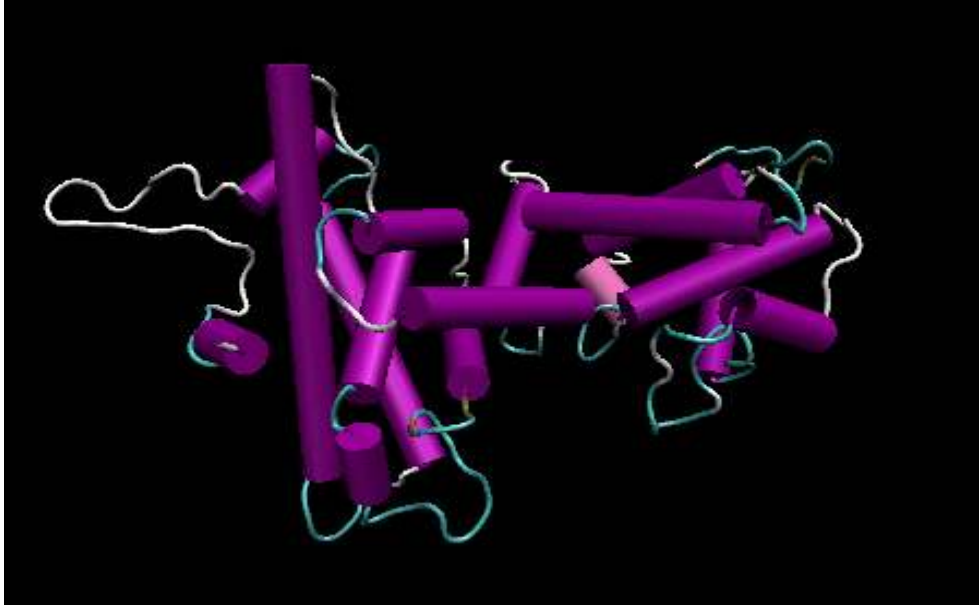
Şekil 4.51. 1HZ4_A protein modeli



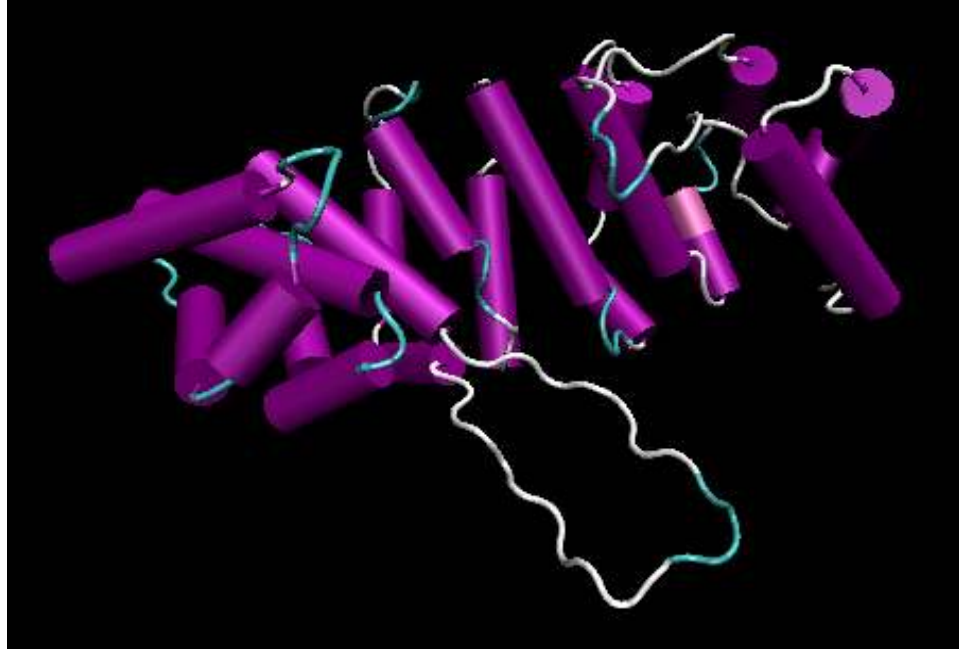
Şekil 4.52. a.118.4.1.1_A protein modeli



Şekil 4.53. 1XM9_A protein modeli



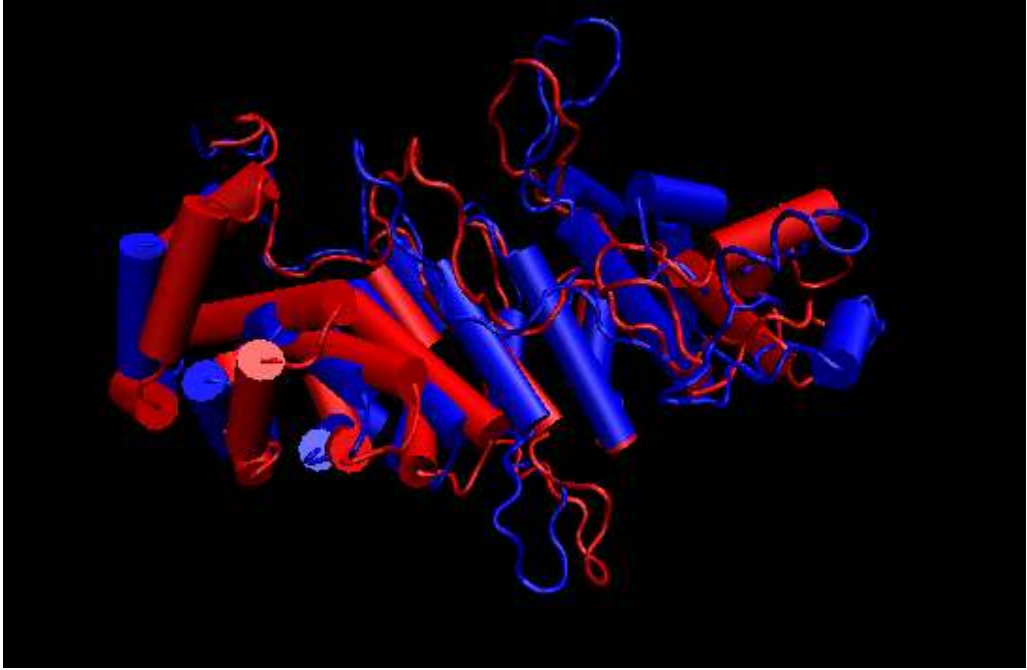
Şekil 4.54. 1N4M_A protein modeli



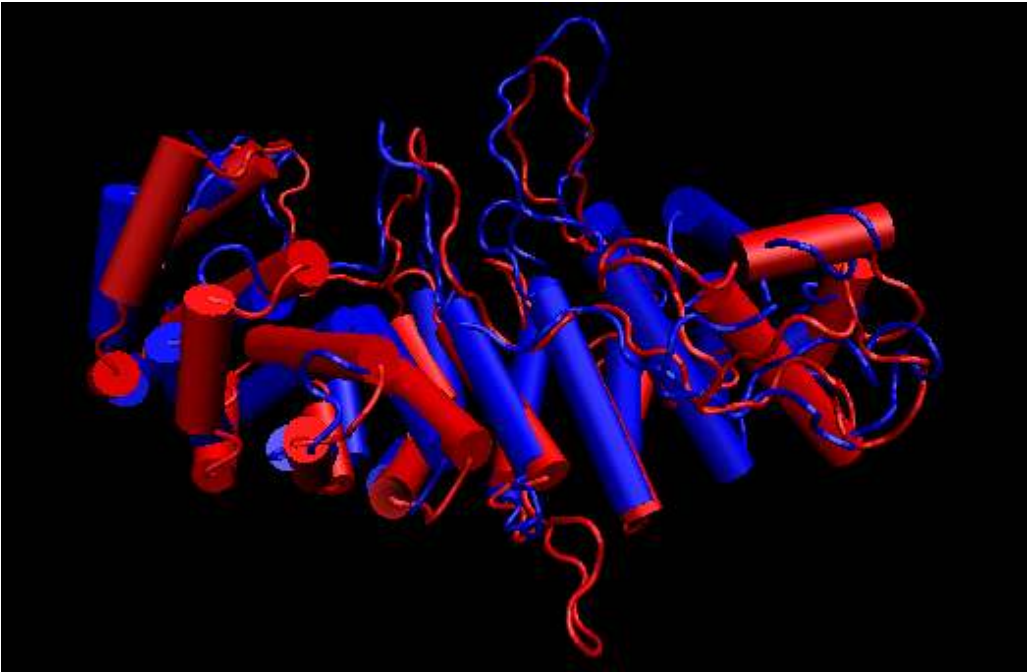
Şekil 4.55. 1Y2A_A protein modeli

4.2.3. Mutasyonların Modellenmesi

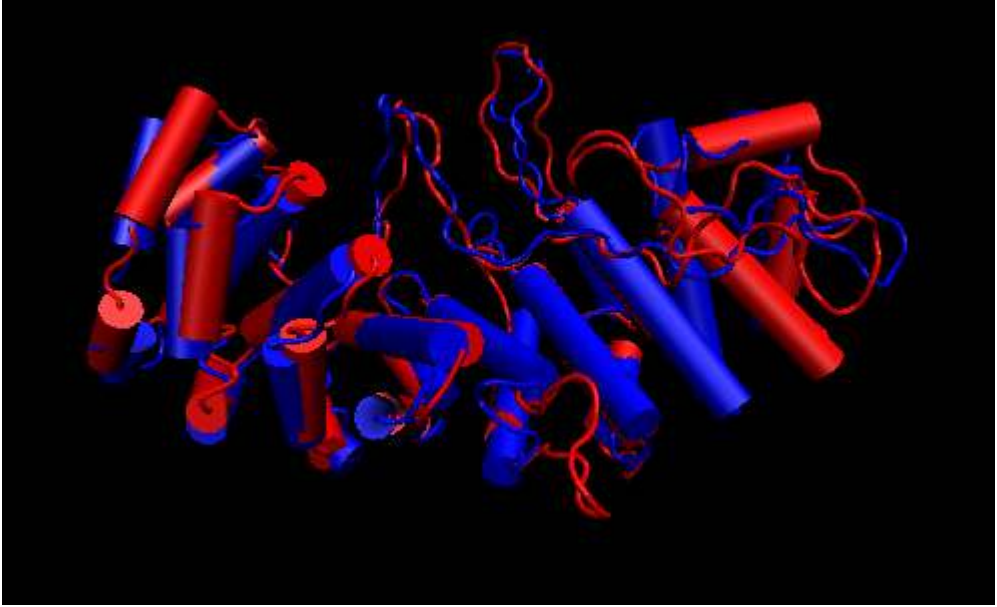
Huntingtin proteininin ilk 400 amino asitlik bölümüne CAG tekrarları eklenerek mutasyon oluşturuldu. Proteinin poliQ bölgesine sırasıyla 10,13, 14, 15, 16, 20, 25 ve 30 CAG tekrarları eklendi ve modeli çıkarıldı. Çıkan mutant modeller, huntingtin proteininin ilk 400'lük amino asit bölgesine en çok benzeyen protein sonuçlarından yola çıkarak 1WA5_B proteini ile karşılaştırıldı. Kırmızı ile gösterilen protein 1WA5_B, mavi ile gösterilen protein CAG tekrar sayıları artırılmış mutant proteindir (Şekil 4.56, 4.57, 4.58, 4.59, 4.60, 4.61, 4.62, 4.63).



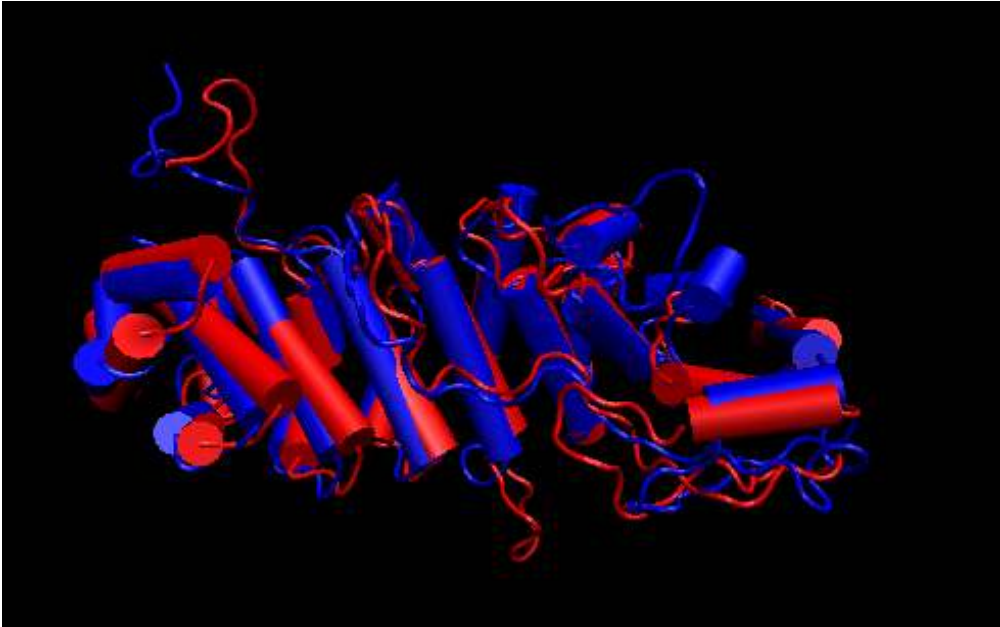
Şekil 4.56. 1WA5_B-Mutant 10 proteinlerinin karşılaştırılması



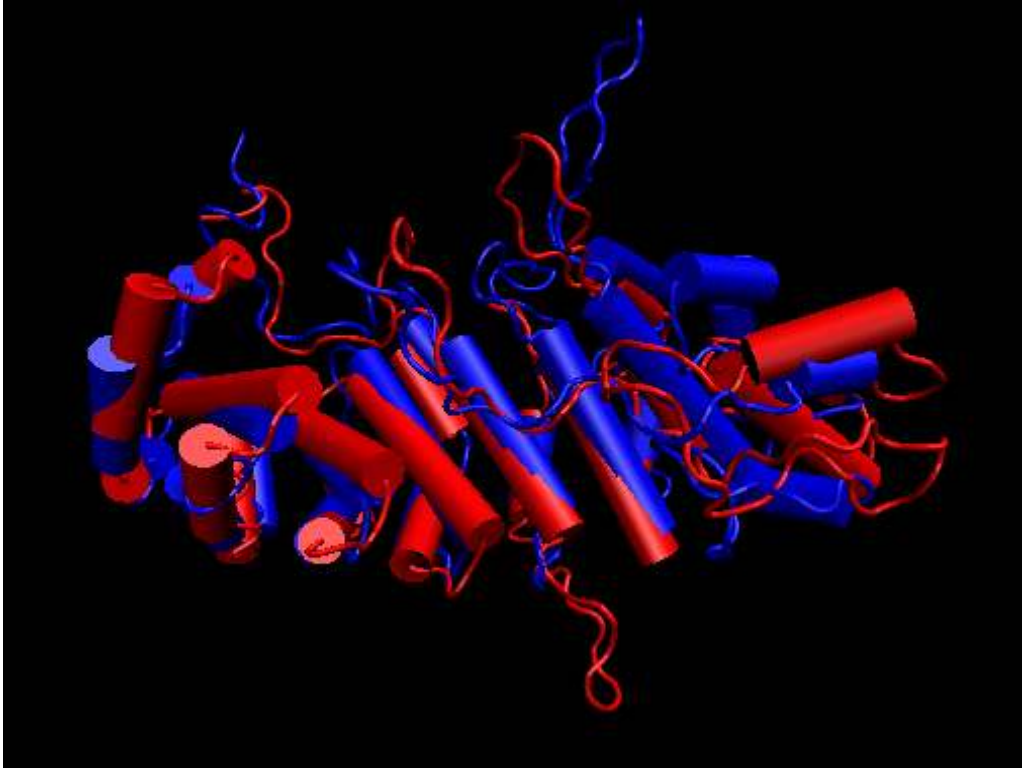
Şekil 4.57. 1WA5_B-Mutant 13 proteinlerinin karşılaştırılması



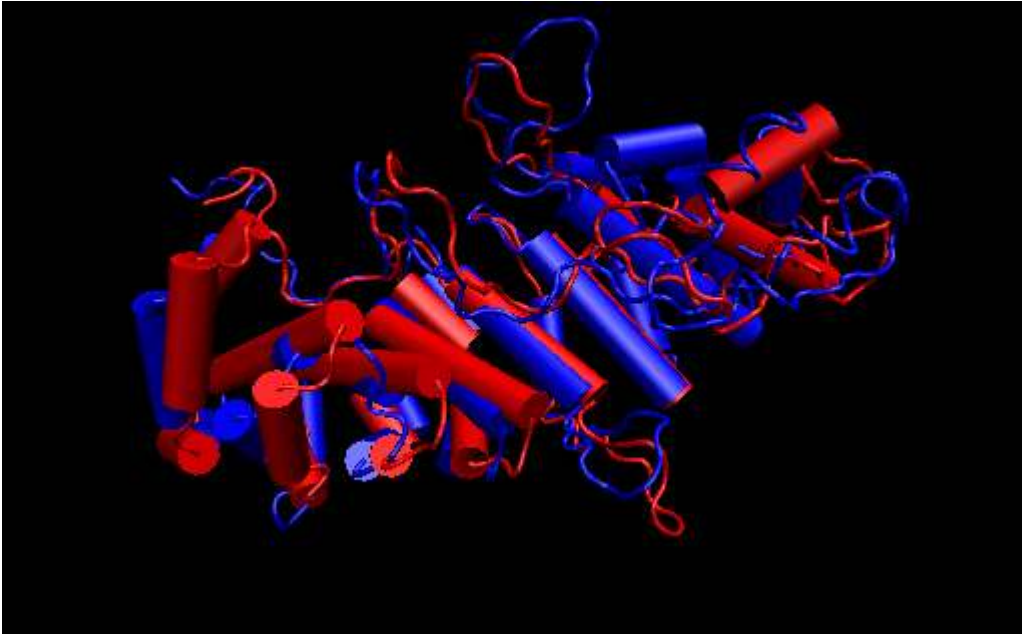
Şekil 4.58. 1WA5_B-Mutant 14 proteinlerinin karşılaştırılması



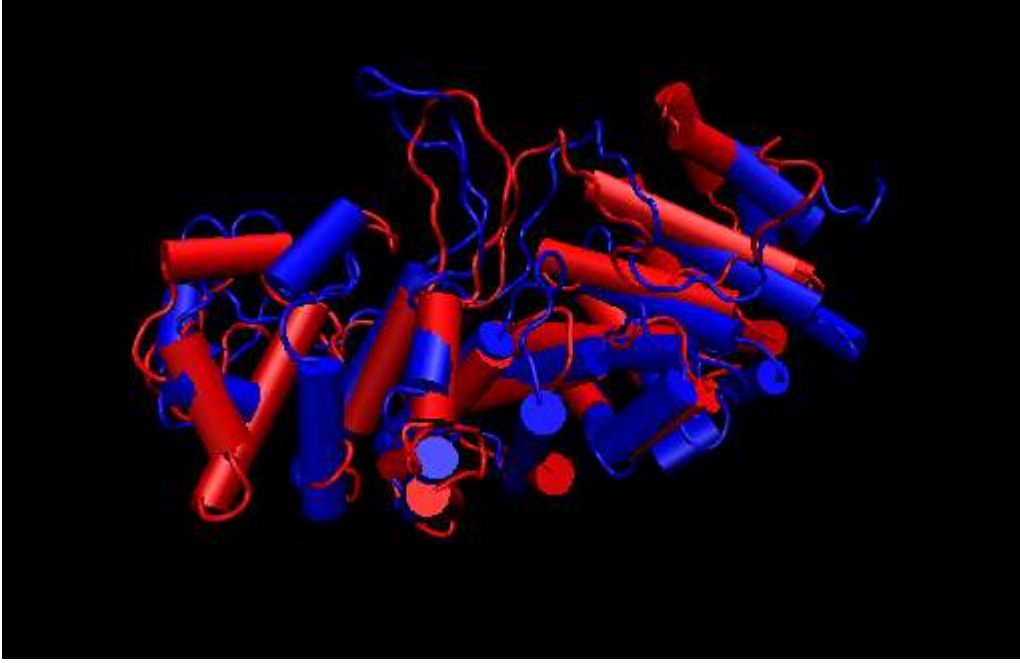
Şekil 4.59. 1WA5_B-Mutant 15 proteinlerinin karşılaştırılması



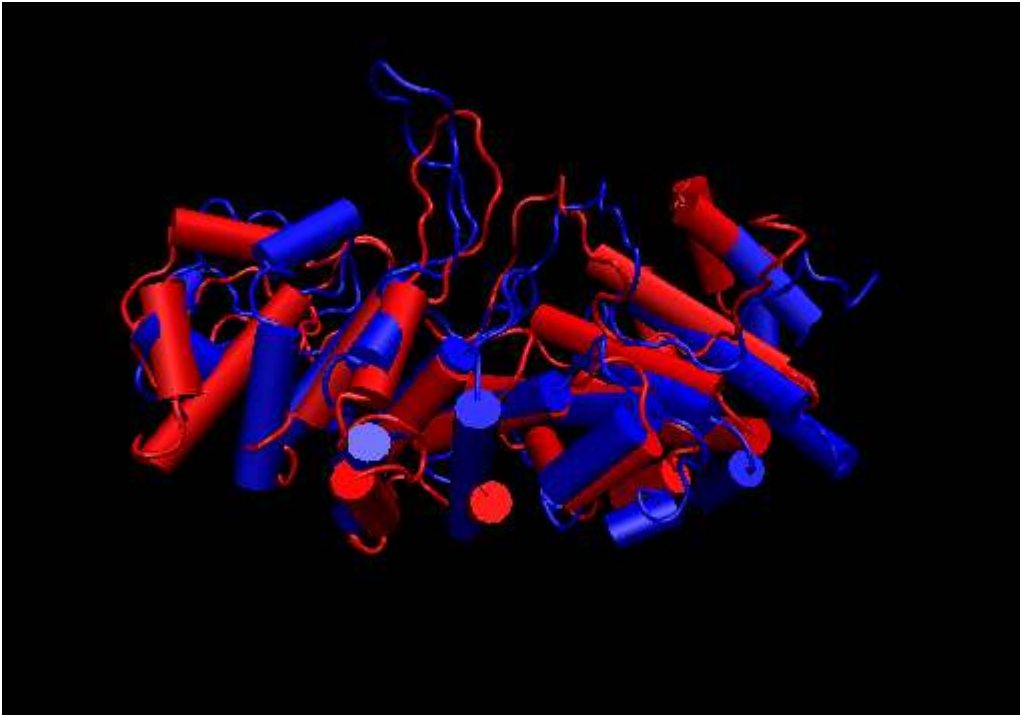
Şekil 4.60. 1WA5_B-Mutant 16 proteinlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.61. 1WA5_B-Mutant 20 proteinlerinin karşılaştırılması

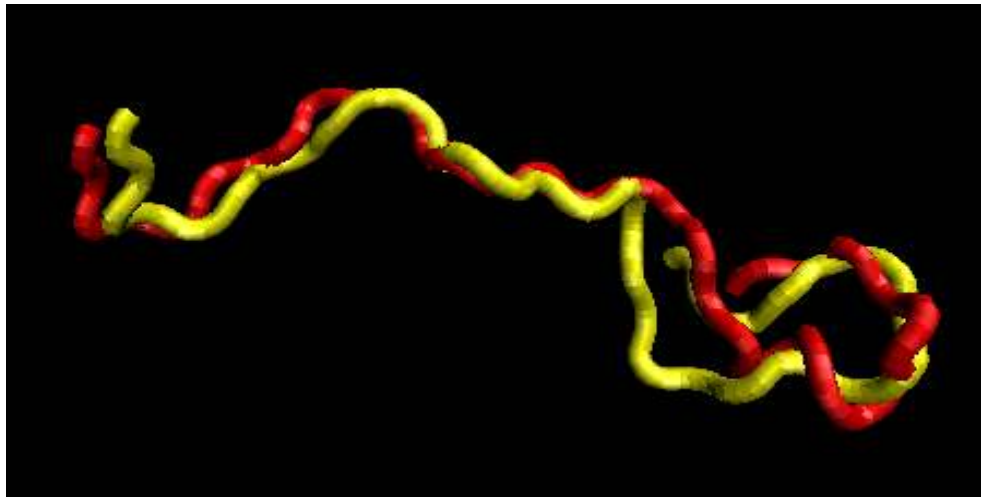


Şekil 4.62. 1WA5_B-Mutant 25 proteinlerinin karşılaştırılması

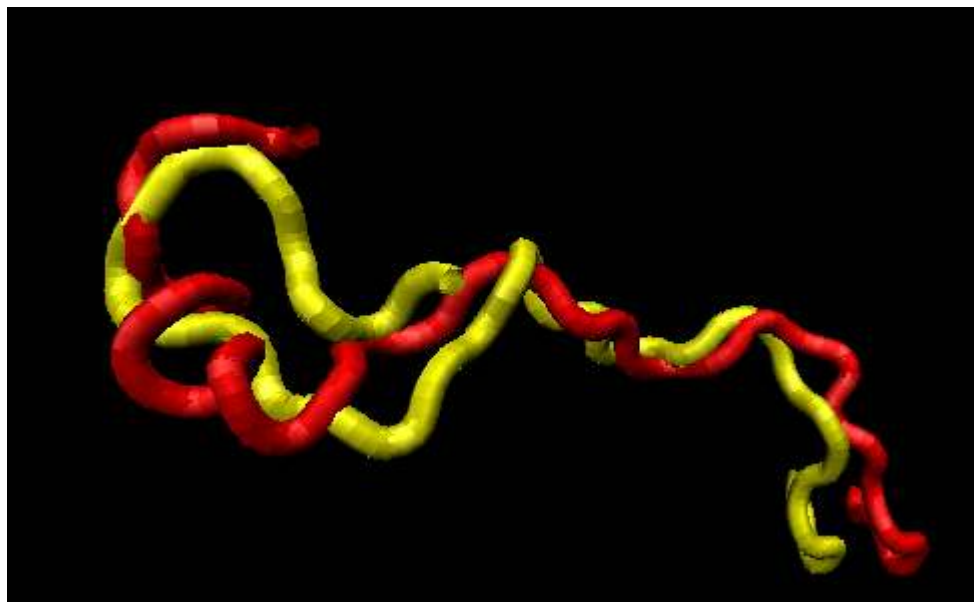


Şekil 4.63. 1WA5_B-Mutant 30 proteinlerinin karşılaştırılması

Huntingtin proteininin ilk 400 amino asitlik bölümüne CAG tekrarları eklenerek oluşturulan mutant proteinlerin poliQ bölgesinde bazı değişimler gözlemlendi. Proteinin poliQ bölgesine 13 ve 30 CAG tekrarları eklenerek modeli çıkarıldı. Çıkan mutant modellerin poliQ bölgeleri, huntingtin proteininin ilk 400 amino asitlik bölgesine en çok benzeyen protein yapısı olan 1WA5_B modelinin poliQ bölgesi ile karşılaştırıldı. 1WA5_B proteininin poliQ bölgesi sarı renk ile, CAG tekrar sayıları arttırılmış, mutant 13 (Şekil 4.64) ve mutant 30 (Şekil 4.65) proteinlerinin poliQ bölgesi ise kırmızı ile gösterilmiştir.



Şekil 4.64. 1WA5_B-Mutant 13 proteinlerin poliQ bölgesinin karşılaştırılması



Şekil 4.65. 1WA5_B-Mutant 30 proteinlerin poliQ bölgesinin karşılaştırılması

6. TARTIŞMA

Biyolojik fonksiyonları açısından çok fazla çeşitlilik gösteren proteinler, genetik bilginin ifadelendiği makromoleküllerdir. Bir proteinin yapısındaki atomların uzaysal düzenimi proteinlerin konformasyonu olarak adlandırılır. Proteinler için birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül olmak üzere dört yapı düzeyi tanımlanmıştır. Süper ikincil yapılar olan motifler veya basitçe katlanmalar, ikincil yapıda bulunan elemanların ve bunlar arasındaki bağlantıların ifadeleridir. Motifler bazen basitten karmaşığa kadar uzanan, bazen de tekrarlayan birimler ya da bileşimler şeklinde görülürler. Polipeptitlerin katlanması hem fiziksel hem de kimyasal sınırlamaların düzenlenmesine bağlıdır. Motiflere dayalı protein organizasyonu genel olarak dört sınıfa ayrılabilir: tümü α , tümü β , α/β ve $\alpha+\beta$.

Bir proteinin yapısı ve fonksiyonu arasında çok sıkı bir ilişki vardır. Bu nedenle, özellikle moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmamış hastalıklarda sorumlu olduğu düşünülen proteinlerin yapılarının ayrıntılı olarak incelenmesi, bu proteinlerin fonksiyonlarının ve dolayısıyla hastalık patogenezinin aydınlatılmasında yol gösterici olacaktır.

Tüm proteinlerin yapı ve fonksiyonları ile ilgili gerekli bilgi amino asit dizilerinde mevcuttur. Protein yapılarının aydınlatılması için kullanılan spektroskopik teknikler, X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans gibi geleneksel teknikler oldukça güçlü yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin uygulanması ve sonuç elde edilmesi oldukça uzun zaman almakla birlikte, deneyimli personel ve teknik donanımlı laboratuvar şartlarını gerektirir. Bu nedenle sekansları belirlenmiş olan proteinlerin sayılarıyla, yapıları belirlenmiş protein sayıları arasında büyük uçurum vardır. Bu açığın kapatılması, protein yapı tahmini metodları üzerinde çalışılması ile mümkün olabilir. Bu verilerin laboratuvar deneylerine destek olması ya da yönlendirmesi ile protein yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılması daha hızlı ve daha güvenilir bir şekilde gerçekleşecektir.

Yeni bulunmuş bir proteinin ya da fonksiyonu bilinmeyen bir gen ürününün analizi için yapılması gereken ilk işlem veritabanlarının taranması ve karşılaştırma yapılmasıdır. Araştırılan proteine benzer başka bir protein bulunmaması halinde

amino asit dizisinin α -heliks ve β -tabakaları oluşturabilme eğilimlerini tahmin eden metodlar kullanılabilir. Amino asitlerin büyük bölümünün hidrofobik yan grupları bulunmaktadır, fakat omurga hidrofiliktir. Görünürde birbirine ters düşen bu kuvvetler arasındaki dengenin oluşturulması özgün ikincil yapısal elementlerin formasyonu ile mümkün olur (Pauling ve Corey, 1951). Omurga her amino asitin CO grubu ile kendinden sonra gelen dördüncü amino asitin NH grubu arasında oluşan hidrojen bağları ile stabilize olur ve oldukça sıkı, çubuksu bir yapı meydana gelir. β -tabakası ise daha uzamış bir yapıdadır, ikincil yapı içinde hidrojen bağları oluşmasından ziyade, stabilizasyon bir ya da daha fazla komşu β -tabakalarının birbirine bağlanması ile gerçekleşir. Bu şekilde, bireysel β -tabakalarının birbirleri ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan yapıya β -pileli tabaka adı verilir. Bu tabakalar paralel ya da antiparalel olabilir. Bir proteindeki ikincil yapıların sıralanışına göre bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur (Levitt ve Chohia, 1976). Bu sisteme göre, alfa yapısı primer olarak α -helikslere, beta yapısı ise β -tabakalarından oluşur. Kombinasyon sınıfı alfa/beta genel olarak araya alfa helikslerin girdiği β -tabakalarından oluşur.

Dizi bilgisine dayalı yapı tahmininde diğer önemli bir ayrıntı da, dizinin konformasyonu belirlediği, ancak aynı konformasyonun birçok farklı dizi ile de oluşturulabileceğidir. Yapının diziden daha çok korunduğu ve sınırlı sayıda omurga motiflerinin varlığı göz önünde tutulduğunda (Chothia ve Lesk, 1986; Chothia, 1992) proteinler arası benzerliğin sadece geleneksel diziye dayalı metodlarla belirlenemeyeceği açıktır. Dizi ve yapı arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılmasının temelinde protein katlanması yatmaktadır (Bryant ve Altschul, 1995; Eisehaber vd., 1995; Lemer vd., 1995).

Yapı analizi metodları ile proteinlerin 3D yapılarını belirlemek için üç önemli tahmin yöntemi bulunmaktadır. Bunlar homoloji modellemesi, hizalama ve *ab initio* tahminleridir. Hizalama, yapısı bilinmeyen proteine herhangi bir homolog proteinin bulunmaması durumunda yine de işaretlenmemiş (etiketlenmemiş) dizi benzerlikleri bulunan proteinlerin 3D yapılarından yola çıkarak gerçekleştirilen analiz olduğu için daha çok kullanılır. Bu metod, incelenecek ve yapısı bilinmeyen diziyi alır ve yapısı bilinen bir hedef proteinin koordinatlarına hizalar.

Bu tez çalışması çerçevesinde, Huntington Hastalığı'nda rol oynayan huntingtin proteininin yapısı analiz edilmiş ve modeli oluşturulmuştur. Huntington Hastalığı, günümüzde görülme sıklığı giderek artan nörodejeneratif hastalıklar grubuna dahildir. Tüm bu hastalıklar mutasyon sebebiyle proteinde yanlış katlanmaya sebep olarak nöron ölümünü başlatırlar. Bu nedenle, protein yapılarının aydınlatılması ve katlanmaların anlaşılması önemlidir.

Huntington Hastalığı, ilgili genlerdeki CAG tekrarlarının sayısındaki artış ile ortaya çıkan dokuz poliglutamin hastalığından biridir. Normal bireylerde onsekizinci amino asitten başlayan 6-35 CAG tekrar sayısı görülürken, Huntington Hastalığı olan bireylerde 36-250 tekrar sayısı görülür. Henüz işlevi bilinmeyen 348 kDa büyüklüğündeki huntingtin proteini 3144 amino asitten oluşur.

Huntingtin proteinini biyoinformatik açıdan incelemek ve yapısını aydınlatmak üzere, öncelikle amino asit dizisi bulunmuş ve bilinen diğer proteinlerle olan homolojisi araştırılmıştır. Bu araştırma neticesinde bugüne kadar literatürde belirtildiği gibi huntingtin proteinine homoloji gösteren başka bir proteine rastlanmamıştır. P42858 kodu ile tanımlanan huntingtin proteinindeki HEAT motifleri incelendiğinde yine literatürle uyumlu olarak beş HEAT tekrarı bulunmuştur. HEAT tekrarlarının hidrofobik yapısı bu tekrarların sıkıca paketlenerek birbirlerine karşı korunduklarına işaret edebilir. Aynı zamanda HEAT tekrarları yapısında buldukları proteinin diğer proteinlerle olan etkileşimlerine katkıda bulunur. HEAT tekrarları barındıran ve fonksiyonları belirlenmiş olan proteinlerin genellikle sitoplazmik transport proteinleri oldukları saptanmıştır. Huntingtin proteininde de HEAT tekrarlarının bulunması bu proteinin bir transport proteini olabileceğine işaret eder. Bu durum yakın zamanlarda yapılan laboratuvar çalışmalarıyla da desteklenmiştir (DiFiglia vd.,1995). Huntingtin proteininin sarılmış sarmal bölgeleri araştırıldığında beş farklı sarılmış sarmal bölgesi tespit edilmiştir. Özellikle proteinin 1-41. amino asitleri arasındaki bölgede çok kuvvetli bir sarılmış sarmal yapısı olduğu belirlenmiştir. Sarılmış sarmal bölgeleri proteinlerdeki potansiyel protein-protein etkileşim bölgelerini göstermekte kullanılır. Proteinin glutamin tekrarları içeren ilk 41 amino asitlik bölümünde sarmal yapıların bulunması huntingtinin diğer proteinlerle olan etkileşimini büyük oranda bu bölge vasıtasıyla gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bu durum da protein etkileşimlerinin N- terminal ucuyla yapıldığını gösteren laboratuvar deneyleriyle uyumludur. TMAP programıyla

huntingtinin transmembran bölgeleri araştırıldığında 13 adet transmembran bölgesi bulunmuştur ve bu bölgelerin 311-3078 amino asitleri pozisyonları arasında rastgele dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu şekilde bir protein yapısında birçok transmembran bölgenin bulunması o proteinin kanal yapısı oluşturabileceğine işaret eder.

Huntingtin proteini modeli oluşturulurken, protein dizisi çok uzun olduğu ve bu nedenle yapı analizinin detaylı ve sağlıklı sonuçlar vermeyeceği düşünülerek, FASTA formatındaki amino asit dizisi 400'lük parçalara bölünmüştür. Her bir 400'lük bölüm için formasyon olasılığı en fazla olan beş model çıkarılmıştır.

Modelleme tüm proteinlerin anlaşılması açısından çok önemlidir. Üç boyutlu yapıyı belirleyebilmek için bir çok programın var olması, modellemenin önemini vurgulamaktadır. Proteinlerin 3 boyutlu yapısının belirlenmesi için Jmol, Opendx, Rasmol, VMD ve XCrySDen modelleme programları bulunmaktadır. Bu programlardan Jmol, java işletim sisteminde çalışan molekülü modelleyen serbest ücretsiz bir programdır. Opendx (Open Source Visualization Data Explorer) programı verilerin modellenmesi, analiz ve interaksyonlar için geniş imkanlar sağlar. Rasmol programı protein, nükleik asit ve küçük moleküllerin modellenmesini gerçekleştirir. VMD (Visual Molecular Dynamics) interaktif modellemeyi, protein ve nükleik asit gibi polimerlerin analizini yapar. Son olarak XCrySDen programı kristalize ve moleküler yapı modellemesi yapar (<http://www.tu-chemnitz.de/stud/studium/amd/links.php>).

Bu araştırmada VMD programı kullanılmıştır çünkü kompleks proteinlerin moleküler 3D yapılarının çıkarılması ve yapıların incelenmesi oldukça basittir. VMD bunun yanı sıra protein içinde yer alan α -heliks, β -tabaka, sarmal, dönüş ve van der Waals bağları gibi bir çok özelliğin de gösterimini gerçekleştirir. Bunun yanı sıra proteinin sekans bilgilerini, hidrojen atomu içerip içermediğini, atomların dizilişini ve proteinin mikromoleküler ayrıntıları gibi daha birçok özelliğin gösterimini de mümkün kılar. VMD'nin kullanımının diğer programlar gibi karmaşık olmaması tercih sebebidir. VMD'nin kolay ve basit kullanımı sayesinde protein yapısı, immün sistemde rol oynayan antikorlar, ribozom kompleksleri ve daha birçok özellik rahat bir şekilde görüntülenebilmektedir (http://www.iphtjena.de/BEREICH_3/lectures/biovis.html). Protein modelinin gösterimi aşamasında protein üzerinde istenilen özelliklerin gösterilmesini ve

proteinin birçok özelliğinin keşfedilmesini sağlaması programın kullanımını oldukça zevkli bir hale getirmiştir.

Çıkan modeller doğrultusunda proteinde α -heliks, dönüş ve sarmal yapıları çoğunlukta olmak üzere kıvrımlı β -tabakalarına da rastlanmıştır.

400 amino asitlik ilk bölümün yapı analizinde ortaya çıkan modeller doğrultusunda yapının birbirine paralel şekilde sıra sıra dizilmiş, yer yer uzun α -helikslerden oluştuğu gözlemlenmiştir. Normal poliQ dizisine sahip proteinin ilk bölümünde β -tabakalarına rastlanmazken, dönüş ve sarmal yapıları da normal uzunluktadır. LOOPP programının verdiği en iyi beş sonuç arasından oluşma olasılığı en yüksek olan 1WA5_B modeli seçilmiştir.

Proteinin ikinci 400 amino asitlik bölümünde α -heliks sayısında bir azalma gözlenirken β -tabakalarında bir artış gözlemlenmiştir. Dönüş ve sarmal yapıları da ilk bölüme göre oldukça uzundur.

Üçüncü 400 amino asitlik bölümde ortaya çıkan sonuçlarda uzun α -helikslere ve yer yer β -tabakalarına rastlanmıştır. Dönüş ve sarmal yapıları bazı bölgelerde oldukça uzun bir yapı oluşturmaktadır ve bu bölümde α -heliksler yumak oluşturacak şekilde bir model oluşturmaktadır.

Proteinin dördüncü 400 amino asitlik bölümü, birinci bölüm ile oldukça benzerlik göstermektedir. Bu bölümde de yine yoğun ve birbirine paralel sıralanmış uzun α -helikslere rastlanırken, β -tabakalara rastlanmamaktadır. İlk bölümden farklı olarak dönüş ve sarmal yapıları oldukça uzundur.

Proteinin beşinci 400 amino asitlik bölümünde ilk bölümden çok daha az ama çok daha uzun α -heliks yapılarına rastlanmıştır. α -heliksler yumak şeklinde bir yapı oluşturmuşlardır. Dönüş ve sarmal yapılarının ikinci bölümdeki gibi oldukça uzun olduğu gözlenmiştir. Beşinci bölümde ortaya çıkan beş modelin sadece bir tanesinde β -tabakasına rastlanmıştır.

Altıncı 400 amino asitlik bölümde, birbirine paralel sıralanmış yoğun α -heliks yapıları ön plana çıkmaktadır. Bazı modellerin bazı bölgelerindeki α -helikslerin oldukça uzun olduğu gözlemlenmiştir. β -tabakasına hiç rastlanılmayan modellerin dönüş ve sarmal yapıları normal düzeydedir.

Proteinin yedinci bölümünde α -heliks oranında bir azalma söz konusudur. Oldukça uzun α -helikslerden oluşan yapı yumak şeklinde organize olmuş, bazılarında β -tabakalarına rastlanmıştır. Dönüş ve sarmal yapıları diğer bölümlere

göre oldukça uzundur.

Proteinin son bölümünde ise α -heliksler normal yoğunlukta ve dönüş ve sarmal yapıları çok uzun değildir.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda huntingtin proteininin genelde birbirine paralel sıralanmış α -helikslerden oluştuğu ortaya çıkmaktadır. Proteinin α -heliks yapılarının az yoğun olduğu bölgelerde az miktarda da olsa β -tabakalarına ve uzun dönüş ve sarmal yapılarına rastlanmıştır.

Normal huntingtin proteininde yer alan tüm bu yapılar proteinin kararlı bir yapıya sahip olmasına ve normal fonksiyonlarını yerine getirmesine neden olur. CAG tekrar sayılarının belli bir eşik değerinin (40 ve üzeri) üstüne çıkması durumunda poliQ bölgesi uzar ve nesilden nesile aktarıldığında uzunluk stabil kalmaz ve genellikle artar. Bu eşik değerini aşan uzunluğa sahip huntingtin proteininin kazanılan glutaminle doğru orantılı olarak artış gösteren bir fonksiyonellik kazandığı saptanmıştır (Housman, 1995). Bu problem üzerine ışık tutmanın yollarından biri normal proteinde daha kısa olan poliglutamin uzantısının özel fonksiyonunu tanımlamak olacaktır.

Normal huntingtin proteinin poliQ bölgesi 23 glutamin tekrarı içerir ve mutant protein glutamin sayısı arttıkça yeni bir konformasyona sahip olur. Proteinde anlamlı poliQ mutasyonu oluşturmak üzere, VMD programı kullanılarak proteinin ilk 400 amino asitlik bölümüne sırasıyla 10, 13, 14, 15, 16, 20, 25 ve 30 CAG tekrarları eklenmiştir. Bu sayede 33, 36, 37, 38, 39, 43, 48 ve 53 glutamin tekrarlı mutant proteinler modellenmiştir. Her bir mutant protein, normal huntingtin proteini modeli olarak kabul edilmiş olan 1WA5_B modeli ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta 33,36,37 ve 38 CAG tekrarı içeren mutant proteinlerde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuç daha önce yapılmış olan çalışmalarla ile desteklenmektedir. Örneğin yapılan bir araştırmada mayotik instabilite aralığındaki bireylerde Huntington Hastalığı gözlemlenmemiştir (Telenius vd., 1995). 39 ve üzeri CAG tekrar sayısı içeren mutant huntingtin proteininde bir takım konformasyon değişimine rastlanmıştır. Bu konformasyon değişiminde özellikle dönüş ve sarmal yapılarının belirgin olarak uzayarak arttığı, bazı α -helikslerin de daha kısa olduğu belirlenmiştir. Marchut ve Hall yaptıkları araştırmada poliQ dizisindeki eşik değerini geçen artış ile orantılı olarak sarmal ve tabaka yapısında artış olduğunu göstermişlerdir (Marchut ve Hall, 2007). Bu artış agregat oluşturma eğilimi ile ilişkilendirilmiştir.

CAG tekrarlarının artışı ile proteindeki bu konformasyon değişimi mutant proteine toksik işlev kazandırarak hücre içinde toksisiteye neden olur. Dolayısıyla mutant huntingtinin toksik işlev kazanması hücre içinde toksisitenin artması ile diğer normal huntingtin proteinlerinin normal işlevlerini yerine getirememesi de olası sonuçlardandır. Nörodejenerasyona sebep olan bu toksisite kazanımı ve işlev kaybı mekanizmaları diğer poliQ hastalıklarında da etkindir. Konformasyon değişimi, Cattaneo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada toksisite kazanımı ve işlev kaybı mekanizmalarının aynı anda etkili olarak nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Cattaneo vd., 2001). Diğer bir araştırma ise proteinin konformasyon değişimi ile işlev kaybına uğradığı ve agregasyona sebep olduğu yönündedir (Chen, 2002).

Mutant proteindeki dönüş ve sarmal yapılarının artması ve α -heliks yapılarının kısalması proteinin kendi içinde katlanmasına ya da değişen yapıdan dolayı hücre içinde başka bir glutamin tekrarlı proteinle etkileşime girip β -kıvrımlı tabaka halinde çökmesine neden olur. Yapılan çalışmalarda *in vitro* ve Huntington beyinlerinde kıvrımlı tabaka yapısında agregatlar görülmektedir. Polar Zipper modeli de bunu desteklemektedir (Perutz vd., 1995). Yapılan çalışmada poliglutamin bölgelerinin amidler arasındaki hidrojen bağlarından oluşan polar zipper oluşumu ile kıvrımlı β tabakaları şeklinde birikime neden olarak agregat oluşturduğu gösterilmiştir. Scherzinger ve arkadaşları bu model doğrultusunda huntingtinin mutasyondan dolayı değişen konformasyonu ile oluşan protein agregatlarının hastalık patolojisinde etken olduğunu göstermişlerdir (Scherzinger vd., 1997).

Bunun yanı sıra α -heliks yapısının bozulması ile β tabaka konformasyonu oluşumu *in vitro* çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada diğer bir nörodejeneratif hastalık olan Parkinson Hastalığında etken α -sinüklein geninde bulunmuş mutasyonların da, proteinin α -heliks yapısını bozduğu ve β tabaka konformasyonu kazandırarak proteinin “toksik işlev kazanımı” ile bağlantılı olduğu varsayımı desteklenmiştir (Başak ve Ozansoy, 2004). Diğer bir çalışma ile de β tabaka yapısının agregat oluşturmaya yatkın olduğu ispatlanmıştır (Goedert, 1999; Murray, 2001).

Dönüş ve sarmal yapılarının uzaması, α -helikslerin kısalması konformasyonu önemli ölçüde değiştirmekle korunmuş protein bölgelerinin yeni proteazlar tarafından tanınarak, proteolizin artışına ve dolayısıyla toksik fragmanın fazla

miktarda oluşmasına neden olur. Bu da bölgesel patolojiye sebep olur. Bunun yanı sıra değişen konformasyon ile normal huntingtin proteininde olması gereken proteoliz gerçekleşmeyebilir, bu da yıkılması gereken proteinlerin yarı ömrünü uzatarak toksisiteye neden olur.

Poirier ve arkadaşları N-terminal huntingtin kullanarak memeli hücre kültüründe ve kültürlenmemiş murin ana kortikal nöronlarda hem agregasyon hem de nörotoksisite üzerine çalışmalar yapmışlar ve agregat oluşturan huntingtin proteinin değişken β -tabaka/ β dönüş modeli ile uyumlu olduğunu ispatlamışlardır (Poirier, 2005). Bu da yapının hem memeli hücreleri hem de ana nöron hücreleri açısından toksik olduğunu gösterir. Bu bulgular huntingtinin toksik yapıya dönüşmesinde yatan yapısal düzenlemeleri açıklar.

Buna karşıt bir görüş olarak serbest halde toksisiteye neden olan proteinlerin, bir arada çökerek hücre için koruyucu bir önlem oluşturduğu fikri ortaya atılmıştır. Diğer bir deyişle bu hücre-içi agregatların toksisiteye karşı koruyucu olduğu da düşünülmektedir (Rajagopalan ve Andersen, 2001).

Mutant proteinlerin yapısındaki artmış poliQ tekrarları, proteinde, dönüş ile sarmal yapılarının uzaması ve α -heliks yapılarının kısalmasıyla konformasyon değişimine neden olarak yanlış katlanmaya ve dolayısıyla degradasyona direnç göstererek hücrede protein birikimine neden olur. Hücre-içi konsantrasyonları önemli olan ve mutasyondan dolayı degradasyonu gerçekleşmemiş proteinlerin birikmesi sonucu apoptoza neden olabilir.

Görüldüğü gibi poliQ tekrarlarının artması sonucu oluşan mutant proteindeki konformasyon değişimi, moleküler mekanizması henüz tam olarak açığa kavuşmamış nörodejenerasyonun, patogenez mekanizması hakkında ipucu verir.

Hastalığa neden olan mutant proteinlerin modellenmesi proteindeki mutasyonu belirlemek ve hangi moleküler mekanizma ile selektif nörodejenerasyona yol açtığını keşfetmek bu gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine ışık tutması beklenmektedir.

7. KAYNAKLAR

KİTAPLAR

BAXEVANİS,A.D.-Oulette,B.F.F., Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley-Interscience A John Wiley&Sons,INC.,Publication, 1998.

GİBAS,C.-Jambeck,P., Einführung in die Praktische Bioinformatik, O'Reilly Verlag GmbH&Co.KG,2002.

HANSEN, Andrea, Bioinformatik Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler, Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 2004.

HÜTT,M.T.-Dehnert,M., Methoden der Bioinformatik, Springer-Verlag Heidelberg, Berlin, 2006.

LESK, Arthur M, Bioinformatik Eine Einführung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 2003.

NELSON,D.L., LEHNİNGER,A.L., COX,M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, W.H.Freeman Company,2000.

RAUHUT,R., Bioinformatik Sequenz-Struktur-Funktion,Wiley-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim,2001.

SELZER,P.M., Marhöfer,R.J., Rohver,A., Angewandte Bioinformatik, Springer-Verlag Heidelberg, Berlin, 2004.

TORDA,A.E., The Proteomics Handbook, D-20146 Hamburg, 2003.

ÇEVİRİLER

CHAMPE,P.C.-Harvey,R.A., Biyokimya, Çev.Edi.Prof. Dr.Asuman Tokullugil-Uzm.Dr.Melahat Dirican-Uzm.Dr.Engin Ulukaya, Nobel Tıp Kitapevi,İstanbul,1997.

MAKALELER

ANDRADE,M.A., Bork,P., HEAT repeats in the Huntington's disease protein, Nature Genetics, volume 11, 1995.

BATES, G., Harper, P., Jones, L., Huntington' Disease. 3. Baskı Londra, Oxford Yayınları,2002.

BERMAN, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E., The protein data bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-42, 1994, 2000.

BORNBERG-BAUER, E., How are model protein structures distributed in sequence space? *Biophysical Journal* **73**, 2393-2403, 1997.

BRANDEN C., Tooze J., *Introduction to Protein Structure* 2nd ed. Garland Publishing: New York, NY, 1999

BROOKS, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. & Karplus, M., Charmm - a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187-217, 1983.

CATTANEO, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., SIPIONE, S., Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends in Neurosciences*;24(3):182-188, 2001.

CHAI, Y., Stacia, L.K., Bonini, N.M., Paulson, H.L., Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperons in polyglutamine disease. *Journal of Neuroscience*;19: 10338-10347, 1999.

CHAN, S.L., Mattson, M.P., Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res.* ;58:167-190, 1999.

CHEN, Y.W., Local Protein Unfolding and Pathogenesis of Polyglutamine-Expansion Diseases, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 51:68-73, 2003
CHICUREL, M., Structural Studies of Huntingtin, 2002.

CHOTHIA, C., Proteins - 1000 families for the molecular biologist. *Nature* **357**, 543-544, 1992.

CHUNG, K.K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders, *TINS*; 24:S7-S14, 2001.

CORNELL, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J. W. & Kollman, P. A., A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179-5197, 1995.

CRIPPEN, G.M. & Maiorov, V.N., How many protein-folding motifs are there. *J. Mol. Biol.* **252**, 144-151, 1995.

CUMMINGS, C.J., Zoghbi, H.Y., Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet*, 9(6):909-916, 2000.

DiFIGLIA, M. Et al. *Neuron* 14, 1075-1081, 1995

DING, Q., Lewis, J.J., Strum, K.M., Dimayuga, E., Bruce-Keller, A.J., Dunn, J.C., Keller, J.N., Polyglutamine expansion, protein aggregation, proteasome activity, and neural survival. *The Journal of Biological Chemistry*;277:13935-13942, 2002.

ENGLAND, J.L., Shakhnovich, B.E. & Shakhnovich, E.I., Natural selection of more designable folds: A mechanism for thermophilic adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8727-8731, 2003.

ERSOY, N., Başak, A.N., Huntington Hastalığı'nın Moleküler Biyolojisi, *Türk Nöroloji Dergisi*, Cilt:11 Sayı:1, 2005.

GAFNI, J.G., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., Ellerby, L.M., Inhibition of calpain cleavage of htt reduces toxicity, accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem.* ;279: 20211-20, 2004.

GOEDERT, M., Filamentous nevre cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and α - synucleinopathies. *Philosophical Transactions of Royal Society London B*; 354:1101-1118, 1999.

GONEN T, Cheng Y, Sliz P, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Harrison SC, Walz T., Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* 438(7068):633-8, 2005.

GOVINDARAJAN, S. & Goldstein, R.A., Why are some protein structures so common? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3341-3345, 1996.

GOVINDARAJAN, S., Recabarren, R., Goldstein, R. K., Estimating the total number of protein folds. *Proteins* **35**, 408-414, 1999.

GREN, H., Human genetic diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. *Cell*;74:955-956, 1993.

GUSELLA, J.F., Macdonald, M.E., *Seminars in Cell Biology*, 6: 21-28, 1995.
The American College of Medical Genetics / American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. *Am J Hum Genet.*, 62: 1243-1247, 1998.

GUSELLA, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease, *Nature*,306: 234-238, 1983.

HELLING, R., Li, H., Melin, R., Miller, J., Wingreen, N., Zeng, C., Tang, C., The designability of protein structures. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **19**, 157-167, 2001.

HO, L.W., Carmichael, J., Swarta, J., Wytenbach, A., Rankin, J., Rubinsztein, D.C., The molecular biology of Huntington's Disease. *Psychological Medicine*; 31: 3-14, 2001.

HOUSMAN, D., Gain of glutamines, gain of function?, *Nature Genetics*, volume 10, 1995.

HUMPHREY, W., Dalke, A., Schulten, K., "VMD. Visual Molecular Dynamics,, *J.Molec. Graphics*, 14.1:33-38, 1996

HUNTINGTON, G., *Med Surg Reporter*, 26: 317-321, 1872.

Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*; 971-983, 1993.

KAZANTSEV, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D., Housman, D., Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, 1999.

LEONOV, H., Mitchell, J.S.B., Arkin, I.T., Monte Carlo estimation of the number of possible protein folds: Effects of sampling bias and folds distributions. *Proteins* **51**, 352-359, 2003.

LÌ, H., Tang, C. & Wingreen, N.S., Designability of protein structures: A lattice-model study using the Miyazawa-Jernigan matrix. *Proteins* **49**, 403-412, 2002.

LI, S.H., Yu, Z.X., Shelbourne, P., Li, X.J., Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci*; 21: 8473-8481 2001.

MA, B., Nussinov, R., Simulations as analytical tools to understand protein aggregation and predict amyloid conformation, *Current Opinion in Chemical Biology*, 10:445-452, 2006.

MacKERELL, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D. & Karplus, M., All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586-3616, 1998.

MARCHUT, A.J., Hall, C.K., Effects of Chain Length on the Aggregation of Model Polyglutamine Peptides: Molecular Dynamics Simulations, *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 66:96-109, 2007.

MARTINDALE, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S.U., Bredesen, D.E., Tufaro, F., Hayden, M.R., Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates, *nature genetics* volume 18, 1998.

MILLER, J., Zeng, C., Wingreen, N.S. & Tang, C., Emergence of highly designable protein-backbone conformations in an off-lattice model. *Proteins* **47**, 506-512, 2002.

MURRAY, IVJ., Lee, VM.-Y., Trojanowski, JQ., Synucleinopathies: a pathological and molecular review. *Clin Neurosci Res*; 1:445-455, 2001.

OPAL, P., Zoghbi, H.Y., The role of chaperones in polyglutamine disease. *Trends in Molecular Medicine*; 8(5):232-236, 2002.

ORENGO, C., Classification of protein folds. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 429-440, 1994.

ORENGO, C.A., Jones, D.T. & Thornton, J.M., Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* **372**, 631-634, 1994.

OZANSOY, M., Başak, A.N., Parkinson Hastalığının Genetiği ve Nörodejenerasyonun Moleküler Biyolojisi, *Parkinson Hast.Hareket Boz. Der.*, 2004

PENNEY, J.B.JR., Young, A.B., Shoulson, I., Starosta-Rubenstein, S., Snodgrass, S.R., Sanchez-Ramos, J., Romos-Arroyo, M., Gomez, F., Penchaszadeh, G., Alvir, J., Esteves, J., Dequiroz, I., Marsol, N., Moreno, H., Conneally, P.M., Bonilla, E., Wexler, N.S., Huntington Disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Movement Disorders*, 5: 93-99, 1990.

PERUTZ, M.F., Polar zippers: their role in human disease, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 69:213-224, 1995.

PERUTZ, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., Finch, J.T., Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.91, pp.5355-5358, 1994.

PERUTZ, M.F., Pope, B.J., Owen, D., Wanker, E.E., Scherzinger, E., Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the amyloid β -peptide of amyloid plaques, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.99, pp.5596-5600, 2002.

POIRIER, M.A., Jiang, H., Ross, C.H., A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure, 2005.

QIN, Z.H., Gu, Z.L., Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington's Disease *Acta Pharmacol Sin.* ;25 (19): 1243-1249, 2004.

RAJAGOPALAN, S., Andersen, JK., Alpha synuclein aggregation: Is it the toxic gain of function responsible for neurodegeneration in Parkinson's disease? *Mechanisms of Ageing and Development*; 122:1499-1510, 2001

ROSS CA, Huntington's Disease: New paths to pathogenesis, *Cell*; 118:4-7, 2004.

RUBINSZTEIN, D.C., Lego, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J.J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., Curtis, D., Davidson, M.J., Differ, A.M., Dode, C., Dodge, A., Frontali, M., Ranen, N.G., Stine, O.C., Sherr, M., Abbott, M.H., Franz, M.L., Graham, C.A., Harper, P.S., Hedreen, J.C., Hayden, M.R., Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet.*,59: 16-22 1996.

SCHERZINGER, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., Wanker, E.E., Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo, *Cell* Vol.90:549-558, 1997.

SHAHREZAEI, V. & Ejtehad, M. R., Geometry selects highly designable structures. *J. Chem. Phys.* **113**, 6437-6442, 2000.

STOTT, K., Blackburn, J.M., Butler, P.J.G., Perutz, M., Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: Implications for neurodegenerative diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.92, pp.6509-6513, 1995.

TARLAC, V., Storey, E., Role of proteolysis in polyglutamine disorders, *J Neurosci Res.*; 74: 406-416, 2003.

TELENIUS, H., Almqvist, E., Kremer, B., Spence, N., Squitieri, F., Nichol, K., Grandell, U., Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)_n changes in Huntington disease. *Hum Mol Genet.*,4: 189-195, 1995.

THORNBERRY, N.A., Lazebnik, Y., Caspases: enemies within. *Science*, 281:1312-1316, 1998.

TONEFF, T., Mende-Mueller, L., Wu, Y., Hwang, S.R., Bunday, R., Thompson, L.M., Chesselet, M.F., Hook, V., Comparison of huntingtin proteolytic fragments in human lymphoblast cell lines and human brain. *J Neurochem*;82:84-92, 2002.

VAN DJIK, J.F., Van Der Velde, E.A., Roos, R.A.C., Bruyn, G.W., Juvenile Huntington's disease. *Human Genetics*, 73: 235-239, 1986.

VAN GUNSTEREN, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Huenenberger, P. H., Krueger, P., Mark, A., Scott, W. R. P. & Tironi, I. G., Biomolecular simulation: The gromos96 manual and user guide, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zurich and BIOMOS b.v., Zurich and Groningen, 1996.

WAELTER, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H., Wanker, E.E., Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Molecular Biology of the Cell* ;12:1393-1407, 2001.

WALIAN P, Cross TA, Jap BK., Structural genomics of membrane proteins *Genome Biol* 5(4): 215, 2004.

WANG, Z.X., A re-estimation for the total numbers of protein folds and superfamilies. *Protein Eng.* **11**, 621-626, 1998.

WANG, Z.X., How many fold types of protein are there in nature? *Proteins* **26**, 186-191, 1996.

WELLINGTON, C.L., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Huntington Disease: new insights on the role of huntingtin cleavage. *J Neural Transm Suppl*;58: 1-17, 2000.

WELLS, R.D., Warren, S.T., Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases. Academic Press Yayın, California, 1998.

WOLF, Y.I., Grishin, N.V. & Koonin, E.V., Estimating the number of protein folds and families from complete genome data. *J. Mol. Biol.* **299**, 897-905, 2000.

ZANUY,D., Gunasekaran,K., Lesk,A.M., Nussinov,R., Computational Study of the Fibril Organization of Polyglutamine Repeats Reveals a Common Motif Identified in β -Helices, *J.Mol.Biol* 358, 330-345, 2006.

ZHANG, C.O., DeLisi, C., Estimating the number of protein folds. *J. Mol. Biol.* **284**, 1301-1305, 1998.

ZHANG, C.T., Relations of the numbers of protein sequences, families and folds. *Protein Eng.* **10**, 757-761, 1997.

ZHANG Y, Skolnick J. (2005). The protein structure prediction problem could be solved using the current PDB library. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(4):1029-34.

WEB SİTELERİ

www.ncbi.nlm.nih

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein&cmd=search&term=p42858>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

www.expasy.org

<http://www.expasy.org/uniprot/P42858>

www.ca.expasy.org/tools/

<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>

www.ks.uiuc.edu/Research/vmd

http://en.wikipedia.org/wiki/Huntington's_disease

<http://www.etwinning.net/ww/en/pub/xplora/library/software/vmd.htm>

<http://www.tu-chemnitz.de/stud/studium/amd/links.php>

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

<http://www.metatag.de/~dhh/?newwebID=906&newwpID=24739>

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR000091>

http://www.ipht-jena.de/BEREICH_3/lectures/biovis.html

8. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Berlin’de dünyaya gelen Nergiz Hürrem Çatık ilkokul eğitimini Berlinde tamamladıktan sonra Türkiye’ye kesin dönüş yaparak orta ve lise eğitimini Yunus Emre Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 1999 yılında Goethe Institut’un açtığı Deutsche Sprachdiplom sınavını başarı ile tamamlayarak Alman Dili Diploması almaya hak kazanmıştır.

2000-2004 yılları arasında lisansını T.C. Haliç Üniversitesinde, Fen-Edebiyat Fakültesinin Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nü, bölüm üçüncüsü olarak bitirmiştir. Lisans eğitimi sırasında 2002-2004 yılları arasında Türkiye Biyoloji Öğrencileri Platformunda, Haliç Üniversitesi Öğrenci temsilciliğini üstlenmiştir. 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü- Tıbbi Genetik Bilim Dalı Prenetal Tanı Uygulama ve Araştırma Merkezi(PRETAM)’nde stajını başarı ile yapmıştır. 2004 yılında T.C. Haliç Üniversitesinin Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.