

Proteinlerin İşlevsel Enerji Yüzeylerinin ve Dinamiğinin Moleküler Simülasyon ve Atomik Kuvvet Mikroskobu ile İncelenmesi

Proje No: 115M418

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Türkan HALİLOĞLU

Danışmanlar:

Doç. Dr. Hamdi TORUN

Doç. Dr. Bora GARİPCAN

Bursiyer(ler):

Burçin ACAR, Zeynep Erge AKBAŞ, Ayşe Burcu AYKAÇ FAS, Burcu ÖZDEN, Saliha Ece ACUNER ÖZBABACAN

ŞUBAT 2019

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Biyolojik süreçlerin vazgeçilmez bileşenleri olarak protein makromoleküllerinin işlev mekanizmalarının araştırılması son derece önemlidir. Amino asit dizilimleri ve üç boyutlu yapılarına ek olarak işlevsel mekanizmanın deşifre edilmesinde yapısal dinamik davranışlarının araştırılması ve belirlenmesi esastır. Dinamik davranışın incelenmesi için günümüzde pek çok hesaplamalı ve deneysel yöntem kullanılmaktadır. Ancak, geleneksel hesaplamalı moleküler dinamik simülasyon yöntemleri günümüzde hala bir proteinin biyolojik işlevini gerçekleştirdiği zaman ölçeğinde konformasyonel değişiklikleri ve dinamik davranışı gözlemleyebilmekten uzaktadır. Bu proje çerçevesinde elastik ağ yapı modelleri ile birleştirilmiş stokastik Langevin dinamiğine dayalı hibrid bir yöntem olan ANM-LD ((Anisotropic Network Model) Anizotropik Ağyapı Modeli modları ile yönlendirilmiş Langevin Dinamiği) moleküler simülasyon yöntemi başarı ile geliştirilmiştir. Konformasyonel değişiklikleri örnekleme ve yapı tahmini için Atomik Kuvvet Mikroskopisi ve benzeri görüntüleme teknikleriyle elde edilen yapısal bilgiler kolektif bir değişken olarak ANM-LD simülasyon yöntemine entegre edilebilmektedir. Bu entegrasyon, protein dinamiği sahasında, kullanım alanı globular proteinlerden membran proteinlerine ve monomerik yapılardan multimerik yapılara uzanan hibrid bir örnekleme yöntemi geliştirilmesini sağlamıştır. 115M418 nolu bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Hesapsal yöntem algoritmalarının oluşturulması ve geliştirilmesi	3
2.2 ABC Taşıyıcı Sistemi Üzerine Çalışmalar	4
2.3 GroEL-GroES Kompleksi Üzerine Çalışmalar	7
2.4 c-Src Kinaz Proteini Üzerine Çalışmalar	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1 Hesaplamalı Yöntemler.....	16
3.1.1 Elastik Ağyapı Modelleri	16
3.1.2 Moleküler Simülasyonlar.....	17
3.1.3 Açısız Uzayda Gaussian Ağyapı Modeli	20
3.2 Deneysel Yöntemler :.....	21
3.2.1 Atomik Kuvvet Mikroskobu Görüntüleme Deneyleri	21
3.2.2 Deney Protokolleri	24
3.3 Entegrasyon.....	27
4. BULGULAR.....	32
4.1 Hesapsal Yöntem Algoritmalarının Oluşturulması Ve Geliştirilmesi.....	32
4.1.1 ANM-LD Simülasyonları	33
4.1.2 ANM-LD Simülasyonlarının Deneysel Verilerle Birleştirilmesi	34
4.1.3. Metadinamik	42

4.1.4 Açısız Uzayda Gaussian Ağyapı Modeli	45
4.2. ABC Taşıyıcı Sistemi Üzerine Çalışmalar	45
4.2.1 Hesapsal Sonuçlar	45
4.2.2 AFM Görüntüleme Deneyi Sonuçları	52
4.3. GroEL-GroES Kompleksi Üzerine Çalışmalar	53
4.3.1 ANM-LD Simülasyonları:	53
4.3.2 Metadinamik Simülasyonları	56
4.3.3 AFM Görüntüleme Deneyi Sonuçları	59
4.4 c-Src Kinaz Proteinini Üzerine Çalışmalar	61
4.4.1 Hesapsal Çalışmalar	61
4.4.2 AFM Görüntüleme Deneyi Sonuçları	71
5. TARTIŞMA/SONUÇ	73
KAYNAKÇA.....	76

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. GroEL halkasının ATP/ADP veya GroES bağlanmasına göre isimlendirilmesi.....	9
Tablo 2. CM-BexMetaD yönteminde kullanılan simülasyon parametreleri.....	43
Tablo 3. ANM-LD GroEL simülasyonlarının sonuçları.....	54
Tablo 4. Metadinamik simülasyonlarında kullanılan parametreler	57
Tablo 5. c-Src kinaz proteini ile gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonlarının özeti.....	61

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. ABC BtuCD taşıyıcı proteininin bulunan kristal yapıları (a) BtuF (PDB ID: 1N4A) proteini periplazmadan getirdiği B₁₂ vitamin moleküllerini OF durumundaki BtuCD proteinine (b) (PDB ID: 1L7V) bağlanarak hidrofobik geçide transfer eder ve (c) ATP bağlı engelli (occluded) BtuCD-F kompleksini oluşturur (PDB ID: 4FI3). (d) B₁₂ transferi gerçekleşikten sonra BtuCD-F protein kompleksi kapalı-asimetrik apo (ATP yok) haline döner (PDB ID: 2QI9)..... 5
- Şekil 2. GroEL-GroES kompleks şaperon yapının T-R-R" evreleri (Lu ve Liang, 2009). 8
- Şekil 3. GroEL/GroES alosterik döngüsü. T yapı: mor, R yapı: turkuaz, R' yapı turuncu ve R" yapı: yeşil renk ile gösterilmiştir. Yanlış katlanmış proteinin şaperon kompleksine girişi ve doğru katlanmış olarak çıkışı yine şekil üzerinde gösterilmiştir. (Yang vd., 2009) 9
- Şekil 4. GroEL monomerinin bölgeleri; apikal: yeşil, ara: turuncu ve ekvatorial: mavi renk ile gösterilmiştir. (Ojha vd., 2016).....11
- Şekil 5. (a) c-Src kinazın serbest enerji profilinde, aktivasyonu doğuran fosforilasyon ve mutasyon olaylarının yarattığı olası değişiklikler. Doğal ve fosforlanmamış halinde proteinin aktif formu yüksek enerjiye sahip ve konformasyon kümesinde nadir görülürken, Y416 rezidüsünün fosforlanması ya da aktiviteyi artırıcı bir mutasyon geçirmesiyle düşük enerjili ve daha sık görülür hale geçer. Serbest enerji profilindeki bu değişikliğin aktivasyona yol açtığı düşünülmektedir. Bu mekanizma, diğer kinazların büyük bir çoğunluğu için geçerlidir. (b) c-Src tirozin kinazın inaktif ve aktif (c) konformasyonları.....13
- Şekil 6. c-Src kinaz enziminin aralarında 23.3 Å RMSD fark bulunan inaktif (PDB: 2SRC) ve aktif (PDB: 1Y57) yapılarının ve olası işlevsel bölgelerinin gösterimi. C-sarmalı (304-316), katalitik bölge (303-308) ve aktivasyon bağlacı (404-435) sırasıyla pembe, turuncu ve yeşil renk ile gösterilmiştir.....15
- Şekil 7. Sapma değişim (bias-exchange) yaklaşımının şematik gösterimi20
- Şekil 8. AFM düzeneğinin kavramsal şeması.23
- Şekil 9. Agar Scientific firmasından satın alınan ve AFM temas modu deneylerinde kullanılan 20mm çap ölçüsündeki taze kesilen (freshly cleaved) mika yüzeyler.....24
- Şekil 10. AFM deneylerinde çalışılan sistemlerin mika yüzeyinde olası konumlanması ve elde edilen görüntülerden ANM-LD simülasyon yöntemi içine kısıt olarak eklenmesine uygun olanların seçilmesi ve deneysel kısıtların hesaplanması.....30

Şekil 11. GroEL kompleksinin elektrostatik potansiyel ile renklendirilmiş yüzey gösterimi. Mavi yüzeyler pozitif yüklü rezidüleri gösterirken, kırmızı yüzeyler negatif renkli rezidüleri göstermektedir. GroEL yüzeyinin çoğunlukla negatif yüklü olduğu anlaşılmaktadır ve bu mika yüzeyle etkileşimini sağlayabilir.	35
Şekil 12. c-Src kinaz proteininin, protein yüzeyindeki pozitif rezidüer baz alınarak gösterilmiş, mika üzerinde olası yerleşimleri. Proteinlerin yüzey renklendirmeleri -2 ve 2 değerleri arasında elektrostatik potansiyel (kcal/(mol•e)) baz alınarak yapılmıştır. Kırmızı ve mavi bölgeler sırasıyla negatif ve pozitif bölgeler işaret eder. Solda proteinin mika altından bakılarak elde edilebilecek olası görüntüsü, sağda ise mika 90 derece döndürülerek, karşıdan bakılarak elde edilebilecek olası görüntüsü yer almaktadır. Deneysel olarak gözlenmesi beklenen büyüklük değerleri protein gösterimlerinin yanında verilmiştir. a) Aktif c-Src kinaz proteini (1Y57) mikaya proteinin kinaz bölgesinin yüzeyi üzerindeki pozitif rezidüer aracılığıyla tutunabilir. b) Aktif c-Src kinaz proteini mikaya proteinin SH2 bölgesinin yüzeyi üzerindeki pozitif rezidüer aracılığıyla tutunabilir. c) İnaktif c-Src kinaz proteini (2SRC) mikaya proteinin kinaz bölgesinin yüzeyi üzerindeki pozitif rezidüer aracılığıyla tutunabilir. .	36
Şekil 13. BtuCD-F membran kompleksinin elektrostatik potansiyel ile renklendirilmiş yüzey gösterimi. Mavi yüzeyler pozitif yüklü rezidüleri gösterirken, kırmızı yüzeyler negatif renkli rezidüleri göstermektedir. BtuC'nin N-terminalindeki -His işaretleri yeşil renkle gösterilmiştir. Asimetrik elektrostatik potansiyele sahip BtuCD-F membran proteininin BtuC yüzeyinin pozitif yüklü olduğu anlaşılmaktadır ve bu mika yüzeyle etkileşimini arttırabilir.	37
Şekil 14. Oluşturulan yapılar ile hedef yapı SAXS profilleri arasındaki χ^2 değerini ve RMSD'yi ANM-LD simülasyonu boyunca gösteren grafik.	39
Şekil 15. Literatürde aktif-inaktif yapı geçişini özetlediği gösterilmiş uzaklıkların kolektif değişken olarak kullanılarak simülasyon boyunca gösterdikleri değişimi ortaya koyan şekil. 40	40
Şekil 16. c-Src kinaz proteini üzerinde koşulan, deneysel kısıtlarla yönlendirilmiş ANM-LD simülasyonlarıyla elde edilen RMSD grafiği.	41
Şekil 17. AdK proteininin CM-BexMetaD yöntemi ile elde edilen farklı replikalarının LID-CORE (rezidü 179-185 (CORE), 115-125 (CORE-LID) ve 125-153 (LID) arasındaki psödo açı) ve NMP-CORE (rezidü 115-125 (CORE-LID), 90-10 (CORE) ve 35-55 (NMP) arasındaki psödo açı) ve NMP-CORE (rezidü 115-125 (CORE-LID), 90-10 (CORE) ve 35-55 (NMP) arasındaki psödo açı) açılarının, deneysel yapılardakilerle birlikte gösterimi (açı değerleri simülasyon boyunca renklendirilmiştir).	44

Şekil 18. APO>ATP-bağlı yapı arasındaki geçişte, elde edilen yapılar ile hedef yapı arasındaki RMSD değişiminin normal (kırmızı) ve kısıtlanmış (yeşil) simülasyonlar için gösterimi.....46

Şekil 19. APO>ATP-bağlı yapı arasındaki geçişe karşılık gelen ortalama kare dalgalanmalar (MSF). Normal simülasyon değerleri kırmızı ile 6 ve 7. ANM modları kısıtlanmış simülasyon değerleri yeşil ile gösterilmiştir.....47

Şekil 20. Normal ve kısıtlanmış APO>ATP simülasyonları ile normal APO>ATP/BtuF simülasyonundan elde edilen dinamik çapraz korelasyon haritaları. Çapraz korelasyon değerlerinin hesabı için RMSD değerinin sabitlendiği döngü sayısına kadar elde edilen patika, geçişin tamamı olarak değerlendirilmek üzere, ilk üçte birlik kısımdaki yapılar kullanılmıştır. Özellikle iki bölgenin korelasyonlarının APO>ATP ve APO>ATP/BtuF geçişleri arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. 1) TM3-4 sarmalının (92-139 rezidüer – A&B zincirleri) altta kalan ATPaz bölgesiyle korelasyonu 2) A&B zincirlerindeki TM5 sarmallarının periplazmik bölgelerinin (155-166 rezidüer) birbiriyle gösterdiği korelasyon. Kısıtlanmış simülasyonlarda yalnız 6. yavaş ANM modunun kısıtlandığı durumda normal APO>ATP davranışından sapma belirgin değildir. Ancak yalnızca 7. yavaş ANM modu ve 6 ile 7. yavaş ANM modlarının birlikte kısıtlandığı simülasyonlarda korelasyon davranışlarının APO>ATP/BtuF geçişine benzediği saptanmıştır.48

Şekil 21. APO yapısı üzerinde, 92-139 bölgelerinin (TM3-4 sarmalı, siyah elips ile işaretlenmiştir) A ve B zinciri için ayrı ayrı, diğer rezidüer ile ortalama çapraz korelasyon değerleri renklendirilmiştir. Kırmızı bölgeler yüksek pozitif korelasyon gösteren, mavi bölgeler ise güçlü negatif korelasyon gösteren bölgelere karşılık gelmektedir. Yeşil bölgeler korelasyonun zayıf olduğu bölgelere işaret eder. TM3-4 sarmalı APO>ATP geçişinde altındaki ATPaz bölge ile korelasyon göstermezken, APO>ATP/BtuF geçişinde göstermiştir. Bu açıdan yalnızca 6. yavaş ANM modunun kısıtlandığı simülasyonlar normal APO>ATP geçişiyle benzerlik gösterirken, yalnızca 7. yavaş modun ve 6. ile 7. yavaş modlarının birlikte kısıtlandığı APO>ATP simülasyonları normal APO>ATP/BtuF geçişiyle benzerlik göstermiştir.49

Şekil 22. APO yapısı üzerinde, 155-166 bölgelerinin (TM5 sarmalı) A ve B zinciri için ayrı ayrı, diğer rezidüer ile ortalama çapraz korelasyon değerleri renklendirilmiştir. Kırmızı bölgeler yüksek pozitif korelasyon gösteren, mavi bölgeler ise güçlü negatif korelasyon gösteren bölgelere karşılık gelmektedir. Yeşil bölgeler korelasyonun zayıf olduğu bölgelere işaret eder. APO>ATP geçişinin normal simülasyonlarında A ve B zincirinin karşılıklı TM5 sarmalları arasında gözlemlenen pozitif korelasyon APO>ATP/BtuF geçişinin normal

simülasyonlarında negatif korelasyona dönüşmüştür. APO>ATP'nin tüm kısıtlanmış simülasyonlarında ise yine bu korelasyonun kaybolduğu ve daha çok APO>ATP/BtuF geçişine benzer bir davranış gözlenmektedir.....	50
Şekil 23. APO>ATP geçişi için yalnızca 143A-143B CA uzaklığıyla verilen BtuCD simülasyonundan elde edilen RMSD grafiği.	51
Şekil 24. BtuCD sistemi üzerinde, mavi küreler 38C ve 129D rezidülerini, yeşil küreler ise 143A ve 143B rezidülerini göstermektedir. Aralarındaki uzaklık sarı ile Å cinsinden verilmiştir.	51
Şekil 25. BtuCD kompleks membran proteinin LDAO deterjan ve Tris tampon çözeltisi içerisinde alınan AFM topografik görüntüleri ve BtuF eklenmesi ile oluşan BtuCD-F kompleksine ait yükseklik profilleri değişimi.....	53
Şekil 26. GroEL'in 1GRU (açık, R ^{''}) ve 1KP8 (kapalı, T) yapılarının 14'ler ve monomer yapıları verilmiştir, monomer üzerinde açık hal mavi renkle kapalı hal kırmızı ile verilmiştir. .	54
Şekil 27. ANM-LD simülasyonlarındaki ilk 30 ve ilk 100 yavaş ANM modundan elde edilen RMSD ve örtüşme/kolektivite grafikleri.	55
Şekil 28. Hedefli ANM-LD simülasyonlarının ilk 100 döngü için RMSD ve Mod grafiği simülasyondan alınmış ara yapılar (Döngü # 1, 20, 48, 60, 100), başlangıç (mavi) ve hedef (kırmızı) yapılar ile birlikte verilmiştir. (DF=0.8 Å).	56
Şekil 29. GroEL kompleksi (PDB ID: 1GRU), A) GroES yardımcı şaperonu bağlı ikili GroEL heptamer halkaları, B) GroEL heptamerinin GroES'e bağlanan halkası (açık yapı). C) GroEL heptamerinin bağlı olmayan hali (kapalı yapı). D) GroEL monomerinin R ^{''} (açık) ve T (kapalı) yapılarının üst üste hizalanması sonucu elde edilen görüntü (RMSD = 11.45 Å)	58
Şekil 30. GroEL monomerinin açık yapıdan başlayarak kapalı yapıyı hedeflediği MetaD simülasyonlarının sonuçları (20 ns'lik simülasyonun son 10 ns'lik bölgesi) A) RMSD sonucu, B) Serbest enerji yüzeyi (30 ns) C) RMSD sonucu, D) Serbest enerji yüzeyi.....	59
Şekil 31. GroEL kompleks şaperon proteinin AFM topografik görüntüleri ve GroES/ATP eklenmesi ile oluşan GroEL/ES kompleksine ait yükseklik profilleri değişimi	60
Şekil 32. 1. mod yönünde oluşan dalgalanmaların 1Y57 yapısının o mod yönünde deforme edilmiş yapılarıyla gösterilmesi. Modun aktif>inaktif yapıları arasındaki geçişe yaptığı etki ok ile gösterilmiştir	62

Şekil 33. c-Src kinaz sisteminde inaktif>aktif geçişinin normal ve kısıtlanmış ANM-LD yöntemiyle simülasyonundan elde edilen RMSD değerleri.	63
Şekil 34. c-Src kinazın doğal (WT) ve mutant formları (R95W, R95W&D117N, R95W & D117N & L124V) ile ANM-LD kullanılarak elde edilen RMSD değerleri.	64
Şekil 35. c-Src kinaz proteinin aktif (inaktif)>inaktif (aktif) yapıya geçişinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenen E310 α C atomunun R409 ve K295 α C atomları arasındaki uzaklık sırasıyla D1 ve D2; D413 - T417, N414 - A418 ve E415 - R419 α C atomları arasındaki uzaklık sırasıyla D1 ve D2; D413 - T417, N414 - A418 ve E415 - R419 α C atomları arasındaki ortalama uzaklık D3 olarak hesaplanmıştır. Aktif>inaktif simülasyonu boyunca D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azaldığı gözlemlenmiştir. (a) D1 ve D2 uzaklıkları arasındaki fark (b) ortalama D3 uzaklıklığı	65
Şekil 36. Aktif>inaktif simülasyonunda jirasyon yarıçapının açık (aktif) yapıdan kapalı (inaktif) yapıya geçerken düştüğü gözlemlenmiştir.....	66
Şekil 37. Aktif>inaktif simülasyonunda seçilen modlar ve elde edilen RMSD değerleri.	66
Şekil 38. Aktif yapıdan başlayarak jirasyon yarıçapının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonundan elde edilen jirasyon yarıçapı sonuçları.....	67
Şekil 39. Aktif yapıdan başlayarak jirasyon yarıçapının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonu ile elde edilen ara yapıların hedef yapı ile arasındaki RMSD değerleri ve geçiş patikasında seçilen modlar.	67
Şekil 40. Aktif yapıdan başlayarak D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonu ile elde edilen (a) D1 ve D2 uzaklıkları arasındaki fark (b) ortalama D3 uzaklıklığı.....	68
Şekil 41. Aktif yapıdan başlayarak D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonundan elde edilen jirasyon yarıçapı sonuçları.....	68
Şekil 42. Aktif yapıdan başlayarak D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonu ile elde edilen ara yapıların hedef yapı ile arasındaki RMSD değerleri ve geçiş patikasında seçilen modlar.	69
Şekil 43. En yavaş üç mod için c-Src kinaz Gaussian ağyapı modeli sonuçları. (a) c-Src kinaz açık (1y57) ve kapalı (2src) kristal yapılara ait 1., 2. ve 3. mod sonuçları. (b) c-Src kinaz kristal yapıları ve ANM-LD programından elde edilen ara yapıları 1. mod sonuçları (c) c-Src	

kinaz kristal yapıları ve ANM-LD programından elde edilen ara yapıları 2. mod sonuçları (d)
c-Src t kinaz kristal yapıları ve ANM-LD programından elde edilen ara yapıları 3. mod
sonuçları70

Şekil 44. c-Src kinaz proteinin AFM topografik görüntüleri ve yüzeye fiksleme çözeltisi
eklendiği ve eklenmediği durumlara ait yükseklik profilleri değişimi72

ÖZET

Proteinlerin farklı kararlı durumlarında (states) ve kararlı durumları arasındaki geçişlerde (transition) işlevsel enerji yüzeyleri (energy landscape) doğrultusunda gösterdiği dinamik davranışlarının anlaşılması, protein fonksiyonunun moleküler mekanizmasının deşifre edilebilmesi için esastır.

Hem hesaplamalı hem de deneysel alanda yapılan çalışmalar uzun zaman ölçeğinde gerçekleşen konformasyonel değişimleri ile ilgili bilgileri açığa çıkarmayı hedeflemektedir. Son derece güncel ve giderek önemi artan bu alan çerçevesinde, bu projede globular ve membran proteinlerin büyük ve karmaşık dinamik geçişleri ve süreçlerini incelemek için ANM-LD hibrid yöntemi (Anizotropik Ağ Modeli modları güdümlü Langevin Dinamiği) geliştirilmiştir. ANM-LD yapıları bilinen iki kararlı durum arasındaki konformasyonel geçiş yollarını tek başına öngörme ve modüle etme kapasitesine sahip olmasının yanısıra, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve diğer görüntüleme tekniklerinden gözlemlenen topolojik değişkenleri de kısıt olarak kullanabilmektedir. Bu amaçla, AFM görüntüleme deneyleri ve ANM-LD simülasyonları üç farklı sistemde ayrı ayrı ve birlikte kullanılarak gerçekleştirilmiştir: BtuCD membran sistemi, GroEL/ES şaperon kompleksi ve c-Src kinaz globular sistemi. Bunlardan c-Src kinaz, ANM-LD simülasyonlarına farklı kolektif değişkenlerin entegrasyonunu test etmek için model sistem olarak kullanılmıştır.

Hedef yapıların AFM görüntülerinden hesaplanan ilk iki temel bileşen eksenini, ANM-LD sırasında dinamik modların hedef yapıya yönlendirilmesinde c-Src kinaz ve BtuCD için denenmiştir. GroEL şaperon sistemi için ise AFM görüntülerinden elde edilen başlangıç ve hedef yapılar arasındaki hacim oranı kolektif değişken olarak kullanılmıştır. Büyük bir konformasyonel değişiklik gösteren c-Src kinaz için başarılı sonuç elde edilmiştir. Ancak BtuCD ve GroEL/ES için daha iyi bir sonuç elde edilebilmesi için birden fazla global yapısal kısıtın kullanılması ile ilgili protokollerin oluşturulması gerektiği sonucu çıkarılmıştır.

AFM sonuçları veya diğer deneysel veriler ile beraber veya yalnız başına ANM-LD, çalışılan sistemlerin her birinin işlevselliklerinin altında yatan temel fonksiyonel mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunabilecek önemli dinamik davranış bilgileri açığa çıkarmıştır. Sistemlerin geçiş dinamiklerini kendine özgü hareket modlarına ayırarak her birinin ileriki çalışmalarda manipüle edilebilecek hedef yapısal ve dinamik birimleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Konformasyonel Değişimler, Protein Dinamiği, Geçiş Patikaları, Alosteri, Moleküler Simulasyonlar, Langevin Dinamiği, Gaussian Ağyapı Modeli, Anizotropik Ağyapı Modeli, Atomik Kuvvet Mikroskobu, ABC Taşıyıcı BtuCD, GroEL-GroES, c-Src Tirozin Kinaz.

ABSTRACT

Protein dynamics is of significant interest recently due to its possible contribution to the understanding of molecular mechanisms underlying functionality. Current methods, both computational and experimental, cover various aspects of protein dynamics despite of leaving gaps in the understanding of long-term and large scale conformational changes. In this project, a hybrid method ANM-LD (Anisotropic Network Model modes driven Langevin Dynamics) has been advanced to study large and complex dynamic transitions. ANM-LD has the capacity to predict and modulate the conformational transition pathways as stand alone and further the ability to use topological variables observed from Atomic Force Microscopy (AFM) and other imaging techniques as restraints to be integrated.

With this aim, the AFM imaging experiments and ANM-LD simulations as individually and integratively performed on three different systems: membrane system BtuCD, large chaperon complex GroEL/ES and globular c-Src kinase. c-Src was used as a case study to test different collective variables for leading ANM-LD simulations. First two principal component axes of target conformations' AFM images were the collective variables with the best results, shown to lead the ANM-LD simulations with smallest RMSDs from the target conformation. For GroEL the volume ratio between initial and target states was used as the collective variable obtained from AFM images. c-Src with the large conformational changes was the most successful case. For BtuCD and GroEL/ES a combination of more than one collective variables is seen to be needed to drive the conformational changes.

With AFM and other experimental data as well as on its own, ANM-LD has disclosed dynamic behavior for each of three systems that plausibly contributes to the understanding of key functional mechanisms underlying their functionality. Dissecting their transition dynamics into idiosyncratic modes of motion, each system was provided with target structural and dynamical units of interest to be manipulated in further studies.

Keywords: Computational Sampling, Large Conformational Changes, Protein Dynamics, Transition Pathways, Allostery, Molecular Simulations, Brownian Dynamics, Langevin Dynamics, Gaussian Network Model (GNM), Anisotropic Network Model (ANM), Atomic Force Microscopy (AFM), ABC Transporter BtuCD, GroEL-GroES Complex, c-Src Tyrosine Kinase

1.GİRİŞ

Proteinler canlılığın devam etmesini sağlayan biyokimyasal süreçlerin yürütücüsü olarak doğada vazgeçilmez bir role sahiptir. Yapısal bileşen olarak organizmanın oluşmasına katkı sağlamaktan gerekli biyokimyasal tepkimeleri hızlandırmaya, ya da hücre içi/dışı arasında geçirgenliği kontrol etmeye kadar, pek çok hücrenel faaliyette yer alırlar. Proteinlere bu işlev çeşitliliğini kazandıran yirmi amino asitlik bir alfabeyle oluşturdukları farklı dizilimlerdir. Her bir farklı dizilim, proteine farklı bir üç boyutlu yapı ve farklı bir işlevsel özellik kazandırabilir. Ancak proteinlerin işlevlerini belirleyen fizikokimyasal özellikler, amino asit dizisi ve üç boyutlu yapı gibi statik bileşenlerle sınırlı değildir. Doğada yer alan tüm moleküller gibi, proteinler de buldukları çevreyle enerji alışverişi içindedir ve bu termal etkileşimler proteinlerin farklı zaman ölçeklerinde hareket halinde olmalarına neden olur. Bu hareketler ile proteinin işlevsel özellik ve mekanizmalarını yakından ilişkilidir. Özellikle iki kararlı yapı arasında gözlenen uzun süre ve büyük yapısal değişiklikler gerektiren dinamik konformasyonel geçişler geleneksel moleküler simülasyon yöntemleri ile görülmesi kolay olmayan zaman ölçeklerine gerçekleşmektedir. Protein dinamiğinin ve allosterik etkileşimlerin kapsamlı çalışılabilmesi için moleküler simülasyon yöntemlerinin zenginleştirilmiş örnekleme olarak sağlayacak yaklaşımlar ile birleştirilmesi son dönemlerde giderek önemi artan bir gerekliliği göstermektedir. Ayrıca konformasyonel örnekleme kollektif değişken olarak kullanılacak deneysel verilerin kullanılması biyolojik gerçeklikte etkin simülasyonların gerçekleştirilmesi açısından son derece önemlidir. Bu proje kapsamında kararlı yapılar arasında gerçekleşen büyük ve kompleks değişimleri/geçişleri ve geçişlerin işlev ile ilgili bağlantılarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, proteinlerin farklı konformasyonları arasındaki geçiş patikalarının tahmin edilmesi ve daha sonra da bu patikaların işlev mekanizmalarını deşifre etmek üzere araştırılabilmesine olanak sağlayacak ANM (Anistropik Ağ Yapı Modeli/ Anistropic Network Model) - LD (Langevin Dinamiği/ Langevin Dynamics) yönteminin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi hedeflenmiştir.

Geliştirilen ANM-LD AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopu/ Atomic Force Microscopy/ AFM) topoğrafik görüntüleme deneyleri ve SAXS (Küçük Açılı X-ışını Saçılması/ Small Angle X-ray Scattering) verilerinden elde edilen kollektif değişkenlerin kısıt olarak entegrasyonu ile desteklenmiştir

Yukarıda bahsi geçen çalışmalar, ana olarak üç farklı biyolojik sistem üzerinde gerçekleştirilmiştir: bir membran proteini olan ATP bağlı kaset (ATP-binding cassette, ABC) taşıyıcı BtuCD proteini, oldukça büyük bir sistem olan GroEL-GroES şaperon kompleksi ve

boyutu ve özellikleriyle daha standard bir globular sistem olan c-*Src* kinaz proteini. Seçilen biyolojik sistemler; projenin farklı açılardan değerlendirilebilmesine, proteinlerin çalışma ön koşullarının ve AFM çalışmalarına uygunluklarının belirlenebilmesine olanak sağlayacak şekilde, inaktif/aktif gibi en az iki ana kararlı duruma, büyük ve küçük konformasyonel değişimlere ve bir veya birden fazla geçiş/ara duruma (transition/intermediate state) sahip olan transmembran proteinler, moleküler şaperonlar ve kinazlar gibi farklı protein türlerinden seçilmiştir.

Proje süresince yapılan çalışmalar dört çalışma paketi altında toplanmıştır.

P1 iş paketi hesapsal yöntem algoritmalarının oluşturulmasını, geliştirilmesini ve deneysel kısıtlarla birleştirilmesini içermektedir. ANM-LD metodunun geliştirilmesi sırasında farklı özellikteki sistemlere uygulanabilirliği göz önünde tutulmuştur. Bunun için farklı özelliklerdeki sistemlerde ANM-LD simülasyonları koşturulmuştur. Proteinin içsel dinamik yapıtaşlarının geçiş dinamiğindeki rolünün belirlenmesi için, hedefli kısıtlanmış (targeted restrained) simülasyonlar hedef yapı bilgisi korunarak konformasyonel geçişleri belirleyen global dinamik modların seçici olarak filtrenmesiyle koşturulmuştur. Ayrıca proteinde oluşan mutasyon gibi değişikliklerin dinamik üzerindeki etkisinin ANM-LD yöntemi ile çalışılabilirliği değerlendirilmiştir. Farklı koşullarda (ligand bağlanması, fosforlanma vs gibi) yapısı bulunmayan sistemler için ise, hedefsiz kısıtlanmış (untargeted restrained) simülasyonlar belirli uzaklıklar ve jirasyon yarıçapı gibi proteinin konformasyonel değişikliğini tarif edebilecek kolektif değişkenler çerçevesinde koşturulmuştur. Ayrıca AFM görüntülerinden elde edilen yükseklik ve hacim bilgileri, SAXS eğrisinden sağlanan parametrelerin kullanılmasıyla simülasyonlar hedef yapı olmadan ANM-LD simülasyonları koşturulmuştur. Bu farklı yöntemlerle BtuCD, GroEL/ES ve c-*Src* kinaz proteinleri üzerinde çalışılmıştır.

P2 iş paketi kapsamında, BtuCD membran proteini üzerinde P1 paketi dahilinde geliştirilmiş klasik, kısıtlanmış ve deneysel gözlemlerle yönlendirilmiş ANM-LD simülasyonları koşturulmuştur. Böylece, BtuCD örneği ile geliştirilen hibrid yöntemin membran proteinleri için uygun hale getirilmesi amaçlanmıştır. Simülasyonları yönlendirmek amacıyla kullanılan deneysel veriler (gözlenen yükseklik değişkeni gibi) proteinin His ile etiketlenmiş yapılarından alınan AFM şekillerinden elde edilmiştir. Ayrıca işbirliği dahilinde çalışılan grup tarafından elde edilen FRET uzaklıkları da simülasyonlarda deneysel kısıt olarak kullanılmıştır. Diğer yandan, işbirliği dahilinde ANM-LD ile konformasyonel geçişleri kontrol etmede mekanistik açıdan önemli olan rezidüer belirlenmiş ve fiziksel ve biyolojik gerçekliği mutasyonlar ile test edilmiştir.

P3 iş paketinde GroEL/ES kompleksi üzerinde yine P1 iş paketi çerçevesinde geliştirilen klasik, kısıtlanmış ve deneysel sonuçlarla yönlendirilmiş ANM-LD simülasyonları verilmiş, simülasyonları yönlendirmede kullanılacak deneysel veriler (GroEL proteinin iç ve dış halka çapları, GroEL/ES kompleksinde dış halka çapı olmak üzere) kompleksin AFM görüntülerinden elde edilmiştir. Böylece, GroEL/ES örneği ile geliştirilen hibrid yöntemin büyük biyolojik sistemler için uygun hale getirilmesi amaçlanmıştır. İlâveten, sistem özelinde dinamik özelliklerin anlaşılması amacıyla GroEL sisteminde ANM-LD simülasyonları verilmiştir.

P4 iş paketi kapsamında, büyüklük, şekil ve fizikokimyasal özellikleriyle diğer iş paketlerinde çalışılan sistemlere nazaran daha standard özelliklere sahip c-Src kinaz proteini, bilhassa hibrid metodolojinin geliştirilmesi için hedef sistem olarak kullanılmıştır. SAXS datasından elde edilen deney profillerinin üretilen yapılarla benzerliği bir kısıt olarak değerlendirilmiş, ayrıca AFM görüntülerinden elde edilen hedef yapının (düşük çözünürlüklü de olsa) temel bileşenleri (principal component) ANM-LD simülasyonlarını yönlendirmek için kullanılmıştır.

Yukarıda bahsi geçen **P2-P4** iş paketleri kapsamında ayrıca sistemlerin dinamik özellikleri incelenmiş, proteinin topolojisi tarafından belirlenen içsel dinamik davranışın, iki kararlı yapı arasındaki geçiş dinamiği bu sistemler özelinde nasıl belirdiği araştırılmıştır. Elde edilen dinamik bileşenler, gelecek çalışmalarda ve ilaç geliştirme gibi bu sistemlerle alakalı hastalıklarla moleküler mücadele talep eden araştırmalarda protein üzerinde bu dinamik davranışları belirleyen hedef bölgeler sağlamaktadır. Bu hedef bölgelerin tayini, geliştirilmiş olan hibrid metodolojinin en önemli kullanım alanlarından biridir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu çalışmada proteinlerin işlev mekanizmalarının ve dinamik özelliklerinin incelenmesi için odaklanılan üç protein sistemin (BtuCD membran sistemi, GroEL/ES şaperon kompleksi ve c-Src kinaz globüler sistemi) literatürde yer alan özellikleri ve yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

2.1 Hesapsal yöntem algoritmalarının oluşturulması ve geliştirilmesi

Makromoleküler yapı ve dinamik çalışmalarında, dinamiğin işlev ile ne şekilde bağıntılı olduğunun anlaşılmasında etkin örnekleme metodları giderek önem kazanmaktadır.

Bu kapsamda, çok farklı yaklaşımlar kullanılmakta ise de büyük ve kompleks konformasyonel değişiklikleri belirleyen etkin örnekleme moleküler simülasyon yöntemleri hala yeterli verimlilik ve fiziksel/biyolojik gerçeklikte değildir. Bu sebeple bu konu hesapsal olarak önemli çabaların gösterilmesinin gerektiği bir alandır. Deneysel çalışmalardan alınabilecek kısıtlı bazı bilgilerin hesapsal yaklaşımlar içerisinde birinci prensipten moleküllerin davranışını tam olarak belirleyemediğimiz veya tahmin edemediğimiz durumlarda en etkin şekilde kullanımı da önem taşımaktadır. Bu alandaki son zamanlardaki en geniş literatür taraması yakın zamandaki bir makalede yapılmıştır Maximova vd. (2016). Ayrıca Bernardi vd. (2015) makalesi de bu alanda kapsamlı bir değerlendirmeye sahiptir.

Bu iş paketi çerçevesinde birbirinden ayrılan ve dolayısıyla farklı avantajları ve kısıtları bulunan birden fazla hesapsal yöntemin paralel geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ağırlık ANM-LD yönteminin geliştirilmesi ve olası deneysel kısıtlarla birleştirilmesi en önemli odak olmuştur. Ayrıca CM-BexMetaD (Collective Modes Driven Bias Exchange Metadynamics) metadinamik yönteminin geliştirilmesi de bazı örnekler çerçevesinde çalışılmıştır. Açısız uzayda Gaussian Ağyapı Modeli yönteminin iyileştirilmesi ve simülasyon programlarında kolektif bir değişken olarak kullanılması da çalışmalar arasında yer almıştır.

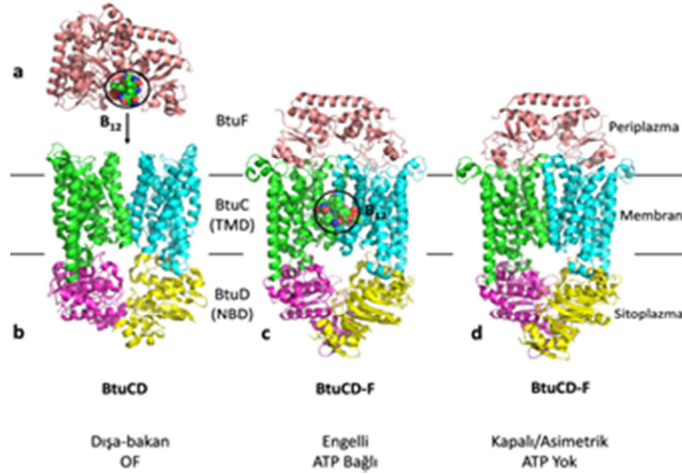
2.2 ABC Taşıyıcı Sistemi Üzerine Çalışmalar

ABC (ATP binding cassette) taşıyıcı proteinleri, en büyük membran üst ailelerinden birini oluşturur ve metal, vitamin, ilaç ve çeşitli karbon kaynaklarının periplazmadan sitoplazmaya taşınımından, zehirli maddelerin hücreden atılmasına kadar birçok farklı biyolojik süreçte ve organda yer alırlar. Geçirdikleri konformasyonel değişiklikler işlevlerini belirlerken, yapıların iki dinamik altbirimi arasındaki allosterik etkileşmeyi de tanımlar (Moradi ve Tajkhorshid, 2013; Wen ve Tajkhorshid, 2011). Bu konu hakkında birçok çalışma olmasına rağmen, bu geçişlerin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır ve nasıl bir kolektif hareket ile bu geçişlerin sağlandığı sorusunun cevabı açık değildir. Taşınma mekanizması, taşınma döngüsünü (ATP bağlama, hidroliz, substrat bağlanması) ve konformasyonel değişiklikleri içerir. Protein ailesinin içinde benzer motiflere sahip olan yapılar olmasına rağmen, her taşıyıcı proteinin işleyiş mekanizması farklılık gösterir (Higgins, 2001; Hollenstein vd., 2007; Locher, 2009).

BtuCD kompleks proteini, *E. Coli* bakterisinde B₁₂ vitaminin metabolize olmasından sorumludur ve taşımakla yükümlü olduğu substratın (B₁₂) nadir bulunması sebebiyle bir fırsat bulduğunda B₁₂'ye yüksek bağlanma eğilimiyle (high affinity) bağlanır. Karbon kaynaklarının

taşınmasından sorumlu diğer ABC proteinlerinin bu kaynakların bolca bulunmasından dolayı yüksek bağlanma eğilimine ihtiyaçları yoktur, çünkü her protein spesifik fonksiyonuna göre kendini mekanik olarak adapte etmiştir.

BtuCD kompleksi (yaklaşık 1100 amino asit), 20 transmembran sarmaldan oluşan transmembran altbirimi (TMD) BtuC ve nükleotide (ATP) bağlanan iki sitoplazmik zincirden ibaret (NBD) BtuD'den meydana gelir (Klein ve Lewinson, 2011). Bu kompleks ön yüzeyinden bakıldığında 90 Å uzunluğunda, 60 Å genişliğinde ve 30 Å kalınlığındadır (Locher vd., 2002). B₁₂'yi periplazmada saptayıp, bağlanarak getiren BtuF proteini (PDB ID: 1N4A), membranda dışa-bakan (outward-facing, OF) konformasyonda bekleyen BtuCD kompleksi (PDB ID: 1L7V), ATP bağlı engelli (occluded) BtuCD-F kompleksi (PDB ID: 4FI3) (Korkhov vd., 2012) ve ATP bağlı olmayan (apo) kapalı/asimetrik BtuCD-F kompleks kristal yapıları BtuCD proteiniyle ilgili bilinen yapılarıdır (Şekil 1). Kristal yapısı eksik olan içe-bakan (inward-facing, IF) konformasyonu ise proteininin homologu olan HI1470 proteini için belirlenmiştir (PDB ID: 2NQ2) ve bazı çalışmalarda BtuCD IF modelleri oluşturulmasında kullanılmıştır (Korkhov vd., 2012; Weng vd., 2012). Ca atomlarının kök ortalama kare sapması değerleri (RMSD) engelli yapının yapısal kararlılığını dışa bakan yapı baz alınarak hesaplanmasında kullanılır. BtuCD-F-ATP sistemi için daha önceki çalışmalarda bu değer 1.9 Å ile 1.7 Å arasında bulunmuştur (Pan vd., 2016).



Şekil 1. ABC BtuCD taşıyıcı proteininin bulunan kristal yapıları (a) BtuF (PDB ID: 1N4A) proteini periplazmadan getirdiği B₁₂ vitamin moleküllerini OF durumundaki BtuCD proteinine (b) (PDB ID: 1L7V) bağlanarak hidrofobik geçide transfer eder ve (c) ATP bağlı engelli (occluded) BtuCD-F kompleksini oluşturur (PDB ID: 4FI3). (d) B₁₂ transferi gerçekleştikten

sonra BtuCD-F protein kompleksi kapalı-asimetrik apo (ATP yok) haline döner (PDB ID: 2QI9).

BtuCD taşıyıcı proteininin yer değiştirme döngüsü (translocation cycle) sırasında NBD ile TMD'nin beraber hareketi ile yer değiştirme yolağı (translocation pathway), OF konformasyonundan IF konformasyonuna geçer. Bu konformasyonel değişim, B₁₂'nin geçitte değişik hidrofobik etkileşimlere girerek ilerlemesi ve tek yönlü taşımının (unidirectional transport) sağlanması için fonksiyonel bir gereksinimdir. Bu konformasyonel değişimin detaylı mekanizmasını ve geçiş patikalarını açığa kavuşturabilmek için, OF ve IF ana konformasyonları arasındaki ara durumları (intermediate states) belirlemek gerekmektedir. BtuCD taşıyıcı proteini daha önce kMD ile birkaç nanosaniye (ns) zaman ölçeğinde çalışılmıştır (Oloo ve Tieleman, 2004), fakat gerçek zaman ölçeğinde 1 sn süresince devam eden yer değiştirme döngüsünün kMD ile gözlemlenmesi mümkün değildir. Bu sebepten ötürü, bu açığı kapatacak yöntemlerin geliştirilmesi büyük bir önem taşımaktadır. BtuCD ve homologu olan HI1470 proteininin deneysel olarak elde edilmiş çeşitli konformasyonları, değişken geçiş (alternating access) mekanizmasını destekler. Transmembran bölge, substratın yer değiştirme yolağı aktif olduğunda OF ve IF konformasyonları arasında geçiş yapar. Bu geçişin, ATP hidrolizi ile aktif olan nükleotit bağlanma bölgesinin konformasyonel değişikliği tarafından tetiklendiği simülasyon çalışmaları ile önerilmiştir (Weng vd., 2012). Ayrıca aynı çalışmada, kristal yapısı belirlenmiş olan asimetrik apo BtuCD-F kompleksinin, IF-OF konformasyonel değişim yolağında ara bir yapı olabileceği önerilmiş ve bu öneri BtuCD ve HI1470 proteinlerinin elastik ağyapı modelleri ile analizleriyle desteklenmiştir (Weng vd., 2009; Bahar vd., 2010).

NBD alt biriminde bulunan iki ATP bölgesi arasındaki haberleşme ve hidroliz mekanizmasındaki rolü, *E. coli* tip II ABC B₁₂ taşıyıcı BtuCD proteini üzerinde mutasyon çalışmaları ile araştırılmıştır ve iki ATPaz bölgesine sırayla tek tek ve beraber olmak üzere aktiflikleri bozulacak şekilde mutasyon yapılmıştır (Tal vd., 2013). Bu çalışmalara göre, ATPaz bölgelerinden sadece biri aktif olduğunda, ATP hidrolizi ve BtuCD vitamin B₁₂ taşımıcılığının %95 oranında azalmaktadır, fakat hücre canlı içinde vitamin B₁₂ kullanma yeteneğini sürdürmektedir. Ayrıca iki ATPaz bölgesi arasındaki kooperativite belirlenmiştir. Bu özelliklerin hepsi tip I ABC taşıyıcı ABC maltoz taşıyıcı proteininde de tespit edilmiştir. Bu sonuç, tip I ve tip II ABC taşıyıcıları arasındaki birçok farklılıklara rağmen, temelde ATP hidroliz mekanizmasının korunmuş olduğunu göstermektedir (Locher, 2009; Tal vd., 2013).

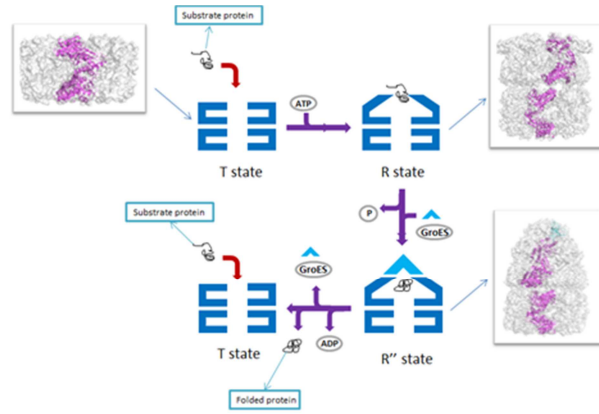
Bakterilerdeki ABC taşıyıcı proteinlerinin çalışma mekanizmasına ve proteinlerin iç dinamiğine dair elde edilecek yeni ipuçları, mikrobiyal patojenlerdeki ilaç ve antibiyotik

direncine ışık tutabileceği gibi, mekanizmalarında ortak noktalar bulunan ökaryot ABC taşıyıcı sistemlerdeki mutasyonların yol açtığı kistik fibrozis veya Tangier hastalığı gibi genetik hastalıklara karşı ilaç tasarımlarına yönelik faydalar da sağlayabilir. Buna ek olarak, toksik maddelerin hücreden dışarı atımında görev alan ABC taşıyıcı sistemlerin (P-glycoprotein, P-gp, vb.) kanser hücrelerinde yüksek miktarda üretilmesinden kaynaklanan kemoterapi ilaçlarına direnç probleminin inhibitörler yardımı ile engellenebilmesi ve direnci ortadan kaldırarak kanser tedavisine devam edilmesi konusunda, klinik araştırma aşamasında olmasına rağmen, ilaç araştırmaları da mevcuttur (Szakács vd., 2006; Locher, 2009).

Hedefe yönlendirilmiş alternatif bir moleküler simülasyon yönteminin hibrit bir karışımının geliştirilmesi ile eksik olan ara konformasyonların ve büyük konformasyonel değişimlerin belirlenmesi ve bu sayede ABC taşıyıcı proteinlerinin her birinin çalışma mekanizmalarına dair elde edilecek yeni bulgular, ilaç tasarım çalışmaları alanında da fayda sağlayabilecektir.

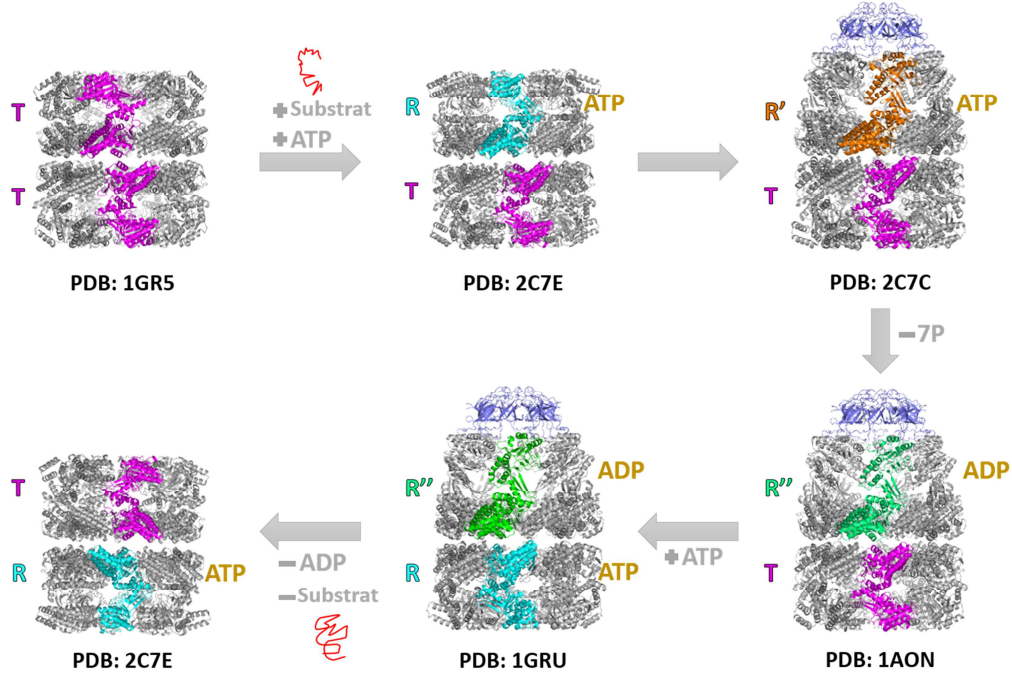
2.3 GroEL-GroES Kompleksi Üzerine Çalışmalar

Proteinlerin, işlevlerini gerçekleştirebilmeleri için kararlı üç boyutlu yapılarına katlanmaları gerekir. Bu işlemin hatasız gerçekleştirilebilmesi için proteinin yanlış/eksik katlanması durumunda, katlanma prosesinin tekrarlanması için şaperonlar görev alır ve bu şaperonlar, proteinlerin ATP-destekli katlanmasına yardım ederler. Hücrede, yapısal olarak birbirinden farklı birçok şaperon vardır. Bu proteinler ısı-şoku proteini (heat-shock protein, HSP) olarak adlandırılırlar ve molekül ağırlıklarına göre farklı sınıflarda incelenebilirler (HSP40, HSP90, HSP100 vb.) (Hartl vd., 2011). Bu bağlamda, *E. coli* bakterisinde, şaperon GroEL ve yardımcı şaperon GroES kompleks bir yapı oluşturarak ilgili proteinlere, katlanmaları sırasında yardımcı olurlar. GroEL (HSP60) şaperonu, çeşitli allosterik iletişim yollarına sahip çift halka yapısındadır (Xu vd., 1997). Kristal yapısı ilk kez 1994 yılında, 2.8 Å çözünürlükte belirlenmiştir (PDB ID: 1GRL) (Braig vd., 1994). *E. coli* GroEL proteininin kristal yapısı iki ayrı heptamerden, toplam 14 alt birimden (subunit) oluşmaktadır. GroES (HSP10) ise heptamer yapıdadır. GroEL şaperon proteininin mutant kristal yapıları da bulunmaktadır (PDB ID: 2EU1, GroEL-E461K). GroEL/ES kompleks yapısı, proteinin katlanmasına yardım ederken sırasıyla T, R ve R'' evrelerini geçirir (Lu ve Liang, 2009) (Şekil 2). Bu evrelerin GroEL/ES kompleksi için sırasıyla 1OEL, 2C7E (ATP bağlı) ve 1AON (GroEL/ES/ADP) kristal yapıları bulunmuştur.



Şekil 2. GroEL-GroES kompleks şaperon yapının T-R-R'' evreleri (Lu ve Liang, 2009).

Eksik ya da yanlış katlanmış olan protein, GroEL şaperonuna, GroEL T kararlı durumundayken bağlanır; 7 tane ATP molekülünün bağlanması ile kompleks konformasyon değişikliğine uğrar ve R evresine geçer. ATP bağlı GroEL bundan sonra GroES'e bağlanır ve protein içeride oluşan boşluğa (nano-cage) geçer ve ATP-ADP dönüşümü ile birlikte içerideki proteinin katlanması gerçekleşir ve kompleksin bu evreleri R'' olarak adlandırılır. R'' evresine kadar olan geçişlerde GroEL şaperonu saat yönünde dönerek cis ve trans yapıları oluşturmaktadır (Thirumalai ve Lorimer, 2001). GroES bağlı yapı cis, GroES bağlı olmayan yapı trans olarak isimlendirilir. İşlem tamamlandıktan sonra GroEL, tekrar T evresine dönerek, aynı proteinin ya da başka proteinlerin katlanmalarına yardım etmek üzere hazır hale gelmiş olur. Özetlemek gerekirse, T kararlı durumundaki kompleks yapının içinde oluşan boşluğa (nano-cage) giren yanlış/eksik katlanmış protein, sırasıyla T-R-R''-T değişimini geçiren şaperon kompleksinden doğru katlanmış olarak çıkar. Bu şaperon kompleks yapının olası ara yapıları ve geçiş patikaları ile işlevsel rezidülerinin belirlenmesi GroEL şaperonun çalışma prensibinin anlaşılması açısından önemlidir. GroEL/ES kompleksinin alosterik döngüsü esnasında geçirdiği yapısal değişimler ve GroEL halkasının isimlendirmeleri Şekil 3 ve Tablo 1'den incelenebilir.



Şekil 3. GroEL/GroES alosterik döngüsü. T yapı: mor, R yapı: turkuaz, R' yapı turuncu ve R'' yapı: yeşil renk ile gösterilmiştir. Yanlış katlanmış proteinin şaperon kompleksine girişi ve doğru katlanmış olarak çıkışı yine şekil üzerinde gösterilmiştir. (Yang vd., 2009)

Tablo 1. GroEL halkasının ATP/ADP veya GroES bağlanmasına göre isimlendirilmesi

GROEL states	ATP/ADP bağlı	GroES bağlı
T (mor)	Hayır	Hayır
R (turkuaz)	ATP	Hayır
R' (turuncu)	ATP	Evet
R'' (yeşil)	ADP	Evet

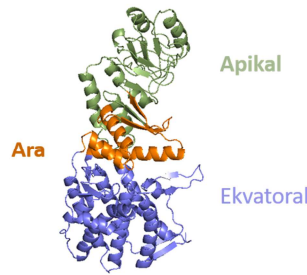
GroEL/ES şaperon sistemi üzerinde yapılan Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları, R evresinin, kapalı ve açık durumlar arasında yarı evrede yer aldığını göstermektedir. Hedefe yönlendirilmiş MD simülasyonları ile GroEL şaperonunun cis yapıda olan parçasının, protein varlığında kapalıdan açık yapıya geçişi incelenmiştir (Van der Vaart vd., 2004). Kristal yapıları bilinen T, R ve R'' evrelerindeki proteinlerin MD simülasyonları ile, alosterik geçişler modellenmeye çalışılmış ve enerji fonksiyonları hesaplanmıştır. Bu geçişlerin birden fazla ve

birbirleriyle koordineli çalışan tuz köprüsü anahtar mekanizmaları ile gerçekleştiği gözlenmiştir (Hyeon vd., 2006; Piggot vd., 2012). Bu yapıyı modellemedeki en büyük problemlerden biri konformasyon değişikliklerinin kMD yöntemleri ile belirlenmesinin zor oluşudur. Bu nedenle farklı yöntemlere ihtiyaç duyulur. Literatürde, yapılan çalışmalarda, komşu alt ünitelerin (subdomain) merkezlerinin kartezyen koordinatları kolektif değişken olarak seçilerek bu değişkene göre sıcaklıkla hızlandırılmış simülasyonlar (temperature accelerated molecular dynamics (TAMD)) gerçekleştirilmiştir. Bu metot ile, T → R" değişimi tekrarlanmış ve hızlandırılmamış moleküler dinamik simülasyonlarında görülmeyen, apikal bölgenin, ekvatorial bölgeye göre 90°'lik dönme ile 30 Å yer değiştirdiği ve R" durumuna göre RMSD'sinin 13'ten 5 Å düştüğü gözlenmiştir. Bu durum kolektif değişken (colvar) kullanımı ile simülasyonların, göreceli olarak daha yüksek tahmin kapasitesine ulaştığını göstermektedir (Abrams vd., 2010).

Diğer yandan, AFM kullanılarak elde edilen görüntülerde GroEL/ES kompleks yapısının mermi şekline ve GroEL/ES₂ kompleks yapısının ise amerikan futbolu topuna benzediği belirlenmiştir (Müller vd., 2011). AFM çalışmaları ile GroES yardımcı şaperonunun GroEL şaperonuna bağlanması ve ayrılması da incelenmiştir ve GroEL şaperonunun açılma-kapanma sırasındaki konformasyonel değişimleri ile ilgili öngörüler elde edilmiştir (Yokokawa vd., 2006). Yüksek hızlı Atomik Kuvvet Mikroskobu (HS-AFM) ile yapılan bu deneylerde substrat varlığında GroEL ve GroES proteinlerinin dinamik etkileşimleri ile simetrik GroEL/ES₂ (futbol topu) ve asimetrik GroEL/ES₁ (mermi) kompleks yapılarının oluşumları gözlemlenmiştir. Diğer deneylerden farklı olarak iki boyutlu streptavidin kristalleri kullanılarak, GroEL halkalarının yan yüzü streptavidin-biotin bağı üzerinde sabitlenmiştir. Doyma noktasına yakın konsantrasyonda GroES molekülü sayesinde, her iki GroEL heptamer halkasından da GroES ayrılması ve birleşmesi AFM görüntüleme deneyleriyle incelenmiş ve komplekslerin oluşumlarının olasılık değerleri çıkartılmıştır. Buna göre GroEL/ES₂ oluşum olasılığı %67 olurken, %33 oranında GroEL/ES₁ oluşumu gözlemlenmiştir (Yamamoto ve Ando, 2016). Buna ek olarak mermi yapı başlangıç kabul edilerek, GroES'in dinamik ayrılma birleşme olayları incelenmiş ve bu değişimler esnasında oluşan ara yapılar da olasılık değerleri ile beraber verilmiştir. Başka bir çalışmada, cis yapıdaki GroEL halkasının bilinen açık (R"; PDB: 1GRU) ve kapalı (T, PDB: 1KP8) yapılarının bir monomeri kullanılarak ANM modları güdümünde açık yapıdan hedef olarak belirlenen kapalı yapıya gidişi incelenmiştir (Uyar vd., 2014).

Mutant GroEL şaperonları (R452E, E461A, S4623A ve V464A) ile yapılan bir başka çalışmada ise GroES yardımcı şaperonunun, GroEL ve ATP ya da GroEL ve ADP olan ortamda şaperona nasıl bağlandığının anlaşılması amaçlanmıştır (Schiener vd., 2005).

Literatürde ortaya konan tüm çalışmalar neticesinde, her GroEL monomerinin, Şekil 4'de de görüldüğü üzere, Ekvatorial (E: Equatorial (A2-A133 E409-P525)), Ara (I: Intermediate (L134-V190 A377-E408)) ve Apikal (A: Apical (E191-V376)) olarak adlandırılan 3 ayrı bölgeden oluştuğu; ekvatorial GroEL halkasını oluşturan her bir monomerin alosterik etkileşim içinde olduğu ve konformasyonel değişiklikler sırasında GroEL apikal bölgesinin (GroEL-AD) (rezidü 191-376) kararsız yapıdaki proteini tanıyan ve bağlanan bölge olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu değişiklikler esnasında görev alan ve GroEL monomerini farklı bölgelere ayırdığı bilinen rezidüler sırasıyla, yukarı ve aşağı dayanak olarak adlandırılan P137,G410 ve G192,G375 rezidüleridir (Skjaerven vd., 2010). Ayrıca R452 ve E461 rezidülerinin GroEL ikili halkasının stabilizasyonunu sağlayan tuz köprüsü oluşumunda rol aldığı bilinmektedir (Meena ve Saxena, 2016). GroEL/GroES kompleks yapısının, doğal olmayan yapıdaki polipeptidlerin doğru katlanmasını sağlarken kompleksin iç duvarında polipeptidin bağlanmasını sağlayan rezidüler, insan homoloğunda Y233, Y237, F238, V268, L271, L293, V297 ve L298'dir (Chow vd., 2009). Bunlara ek olarak, apikal bölgede yer alan iki ayrı halka sarmal yapısının (Sarmal H: rezidü Leu234-Ala243 ve Sarmal I: rezidü Gly256-Arg 268; PDB:1SVT), katlanmamış protein ve yardımcı şaperon GroES için bağlanma ara yüzünü oluşturduğu saptanmıştır (Ojha vd. 2016). Mini-şaperon da denilen GroEL-AD asıl GroEL oligomerinin yapısal ve işlevsel özelliklerinden bağımsız olarak içsel şaperon aktivitesine sahip olduğu ve izole haldeki GroEL-AD'nin çözelti içinde kendi yapısal bütünlüğünü ve işlevselliği koruduğu görülmüştür (Ojha vd. 2016).



Şekil 4. GroEL monomerinin bölgeleri; apikal: yeşil, ara: turuncu ve ekvatorial: mavi renk ile gösterilmiştir. (Ojha vd., 2016)

GroEL/ES şaperonları oldukça çalışılmış bir sistem olmasına rağmen kararlı yapılarının arasındaki konformasyonel geçişler ve bu geçişlerde kararlı konumlarındaki dayanak

noktalarının ve yapıda oluşan kolektif hareketlerin önemi yeterince belirlenememiştir ve çalışma mekanizması ile ilgili tartışmalı noktalar açıklanamamıştır (Moparthi vd., 2013). Bunun yanında, GroEL ve GroES proteinlerinin insandaki homologlarına bakıldığında sırasıyla bu proteinlere denk gelen 60 kDa heat shock protein (şaperon 60) ve 10 kDa chaperonin (şaperon 10) proteinlerinin üç boyutlu yapılarının bilinmediği ve insandaki ve *E. coli* bakterisindeki protein sekansları karşılaştırıldığında GroEL için %50.55 (bir ya da daha fazla fonksiyonel bölge paylaşıyorlar) GroES için ise %35.05 (birbirleriyle alakalıdır) benzerlik görülmektedir. Tüm bunlar GroEL/GroES sisteminin çalışılma mekanizmasının deşifresini önemli kılan unsurlardır.

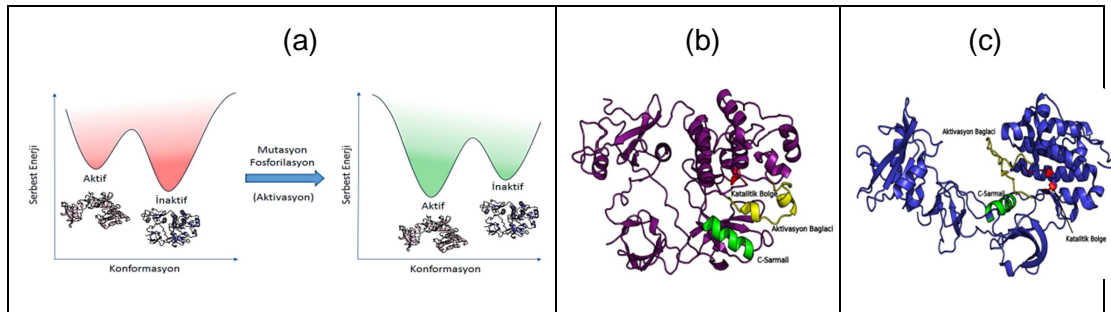
2.4 c-Src Kinaz Proteini Üzerine Çalışmalar

Kinazlar, hücrede sinyal iletiminde rolü olan ve işlev mekanizmaları evrimsel olarak korunmuş proteinlerdir. İşlevlerini, hedef proteinlerin serin, treonin ve tirozin rezidülerini fosforlayarak gösterirler. Kinazların işlevsel/yapısal geçişleri, ligand bağlanmalarına veya translasyon sonrası modifikasyonlara bağlıdır. Bu geçiş, kinazların hücrel sinyal yollarında bir devre anahtarı olarak iş görmesini sağlar (Blume-Jensen vd., 2001). Kinazlar mutasyon varlığında devamlı aktif hale gelirler ve pek çok kanser türünde kinazların kontrolsüz çoğalması görülür. Bu nedenle, kinazlar kansere karşı mücadelede uygun bir hedeftir (Zhang vd, 2009). Bu çalışmada c-Src kinaz örnek sistem olarak ele alınmıştır. c-Src kinaz, Src ailesine bağlı bir proteindir ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre ölümü (apoptoz), farklılaşması ve çoğalmasından sorumlu yollarda görev alır (Aleshin vd., 2010). Aktivitesi fosforilasyonuna bağlıdır ve fosforilasyon hücrede sinyal iletim yollarının aktivitelerinin düzenlenmesinde kullanılır (Blume-Jensen vd., 2001). Fonksiyonel bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar kanser hücrelerinin oluşmasına neden olduğundan proto-onkogen olarak adlandırılır. Olası inhibitörlerin ve kanser ilaçlarının geliştirilebilmesi için c-Src kinaz üzerine çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir (Aleshin vd., 2010; Sakkiah vd., 2014).

c-Src kinaz; SH3 (T84-A145), SH2 (G151-S248) ve protein-tirozin kinaz (E270-T523) (Roskoski vd., 2004) adı verilen üç temel bölgesi olan 536 amino asitlik büyük bir proteindir. İki kararlı konformasyonu vardır: 2SRC (inaktif) ve 1Y57 (aktif) (Şekil 5.b,c). Bu yapılar arasındaki en belirgin fark, C-sarmalının (P304-K315) konformasyonunda ve aktivasyon bağlacının (A-loop, D404-F424) yapısında görülür. Aktivasyon bağlacı, fosforlandığında proteinin aktivitesini etkileyen Y416 rezidüsünü içerir. Bu rezidü fosforlanmadığında, aktivasyon bağlacı aktif bölgeye substratın girişini engeller. DFG bölgesi (D404-G406) proteinin dışına yönelir; bu nedenle inaktif yapıya DFG-out denir. Y416 rezidüsü

fosforlandığında ise, aktivasyon bağlacının yapısı düzensizleşir ve aktif bölgeden uzaklaşarak, substrat geçişine izin verir. Aktivasyon bağlacındaki DFG bölgesi içeriye yöneldiğinde oluşan aktif yapıya DFG-in denir. Bu değişimler, C-sarmalını, aktif bölgeye ve proteinin katalitik aktivite için gerekli rezidülerini sağlayacak bir bölgesine taşır (Shukla vd., 2014). İki yapı arasında ince farklılıklar da vardır. İnaktif yapıdan aktif yapıya geçişte, E310'un R409 ile kurduğu hidrojen bağı K295'e kayar. Bu olay elektrostatik geçiş (switch) ve rezidülerin tamamı da elektrostatik ağ diye adlandırılır (Ozkirimli vd., 2009). L325, M314, F405 ve H384 rezidüleri aktivasyon sürecinde bir hidrofobik omurga oluştururlar (R-spine) (Taylor vd., 2011). Ayrıca aktif yapıya geçişin SH2 ve kinaz bölgeleri arasındaki bağlaç kısmında bulunan menteşe (hinge) rezidüleri aracılığıyla sağlandığı düşünülmektedir (Shukla vd., 2014).

Proteinin aktivasyon mekanizmasının anlaşılması için dinamik bilgiye de ihtiyaç vardır. Proteinin global/lokal hareketlerini gerçekleştirmesinde, temelde iş gören rezidülerinin belirlenmesi ve inaktif yapıdan aktif yapıya geçişte oluşan ara yapıların tayini önemlidir. c-Src tirozin kinaz aktivasyonunun yukarıda bahsedilen dinamik temelleri üzerine son dönemde üç önemli çalışma göze çarpmaktadır (Shukla vd.,2014; Sakkiyah vd., 2014; Meng vd., 2014). Proteinin büyük olması ve aktif-inaktif yapı arasındaki geçişin uzun olması, klasik MD yöntemleriyle çalışılmasını zorlaştırır. Bu nedenle farklı hesapsal ve deneysel stratejiler geliştirilmektedir. Şekil 5.a'da c-Src tirozin kinazın aktivasyonunda serbest enerji profilinin olası rolü gösterilmiştir. Proteinlerin dinamiği bir konformasyon kümesi şeklinde ifade edilir. Bu kümede yüksek enerjili konformasyonlar az, düşük enerjililer ise sık görülür. Ancak proteinde kimyasal ve genetik değişiklikler nedeniyle, bazı konformasyonların enerjileri değişebilir. Bu değişim, fonksiyonel olarak aktif bir konformasyonun kararlı hale gelmesine ve aktivasyona sebep olabilir.



Şekil 5. (a) c-Src kinazın serbest enerji profilinde, aktivasyonu doğuran fosforilasyon ve mutasyon olaylarının yarattığı olası değişiklikler. Doğal ve fosforlanmamış halinde proteinin aktif formu yüksek enerjiye sahip ve konformasyon kümesinde nadir görülürken, Y416

rezidüsünün fosforlanması ya da aktiviteyi artırıcı bir mutasyon geçirmesiyle düşük enerjili ve daha sık görülür hale geçer. Serbest enerji profilindeki bu değişikliğin aktivasyona yol açtığı düşünülmektedir. Bu mekanizma, diğer kinazların büyük bir çoğunluğu için geçerlidir. (b) c-Src tirozin kinazın inaktif ve aktif (c) konformasyonları.

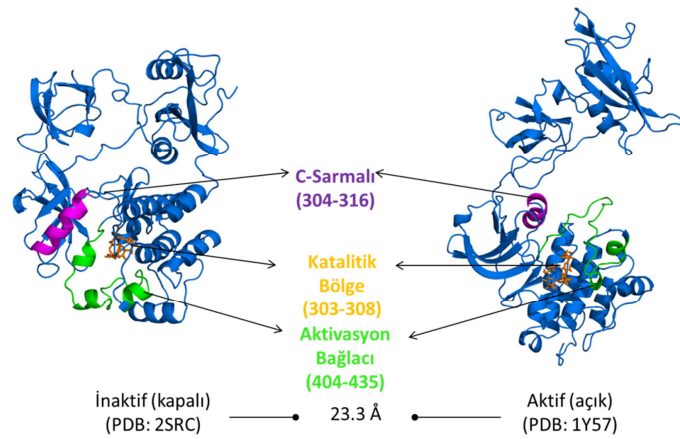
Şekiller sırasıyla 2SRC ve 1Y57 PDB kodlu yapılara karşılık gelmektedir. Her iki şekilde de katalitik bölge kırmızı ile, C-sarmalı yeşil ile ve aktivasyon bağlacı sarı ile gösterilmiştir. Aktivasyon bağlacının aktivasyon için daha düzensiz bir yapı kazandığı ve ters çevrildiği, C-sarmalının ise döndüğü gözlenmektedir. Katalitik bölge aktif formda, substrat için daha kolay ulaşılabilir bir hale gelmiştir.

Proteinin dinamik bilgisi, spesifik etkisi yüksek ve yan etkisi azaltılmış ilaçlar geliştirmek için de gereklidir. Çünkü yapısal ve dizisel olarak benzeyen olan proteinler, ancak dinamik özellikleri ile birbirinden ayrılabilir. Örneğin; piyasada gleevec isimli kanser ilacının, etken maddesi bir Abl tirozin kinaz inhibitörü olan imatinibdir. c-Src ve Abl tirozin kinazların aminoasit dizilimleri yüksek benzerliğe sahip olmalarına rağmen, bu inhibitörden etkilenmeleri açısından farklılık gösterirler. İmatinibin c-Src inhibisyonunda etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu farklılığın, iki proteinin esneklikleri arasındaki farktan kaynaklandığı gösterilmiştir (Lin vd., 2013; Lovera vd, 2012). Ayrıca c-Src'nin Y416 rezidüsünün fosforlanmaması durumunda bile az miktarda katalitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, c-Src'nin serbest enerji yüzeyinde yüksek enerjili bölgelere karşılık gelen, katalitik olarak aktif yapıların nadiren de olsa proteinin fosforlanmamış halde bulunmasıyla ilgili olabilir ve dinamik etkiyi gösterir. (Meng vd., 2014). c-Src üzerine yapılan dinamik çalışmalarda, aktivasyon sürecinde iki temel adım olduğunu görülmüştür: aktivasyon bağlacının açılması ve C sarmalının dönüşü (Gan vd., 2009). Saptanan iki ara geçiş yapısı bu gözlemi desteklemektedir (Shukla vd., 2014). Örneğin; Hck kinaz (tirozin kinazların Src ailesindedir) ve c-Src kinazdan sadece bu özellikleri göz önüne alınarak birinin spesifik olarak inhibe edilebilmesi zordur. Hck kinazın da inaktif ve aktif hali arasında iki ara yapısının bulunduğu gözlenmiştir (Yang vd., 2009). İki proteinin birinci ara yapıları birbirine çok benzer; fakat ikincil ara yapıları farklıdır ki bu fark c-Src'ye özgü inhibitörler geliştirilebilmesine imkan verir. Bu tarz inhibitörler ara yapıya bağlanıp onu stabilize ederek aktivasyonu engellerler. 8-anilino-1-napthalene sulphonate (ANS) potansiyel c-Src inhibitörlerinden biridir. ANS'nin kinaza bağlanması için aktivasyon bağlacının tamamen düzensiz yapıda olması gerekir. c-Src'nin ikincil ara yapısında böyleyken, Hck kinazında değildir. Ayrıca K295-E310 hidrojen bağı c-Src'de oluşmamışken, Hck'de oluşmuştur ve bu bağı ANS bağlanma bölgesini bloke

eder (Shukla vd., 2014). Bu sonuçlar inaktif ve aktif yapılar arasındaki geçiş yollarını ve ara yapıları çalışmanın önemini vurgulamaktadır.

Kolektif değişkenlerin belirlenmesi tüm proteinlerin dinamiğinin belirlenmesinde önemli rol oynadığı gibi c-Src kinase aktivitesinin anlaşılabilmesi için de gereklidir. Literatürde c-Src kinase üzerine yapılan dinamik çalışmalarda, kolektif değişkenleri belirlemek adına metadinamik simülasyonları yapılmıştır. Simülasyon sonuçlarıyla, c-Src kinase için kolektif değişkenlerin D404-K295, F405-L317, N381-H384, F278-P304, P304-E331 rezidüleri arasındaki mesafeler olduğu saptanmıştır

Bu çalışmada inaktif ve aktif yapılar arasındaki yollar proteinin düzenleyici bölgelerini de içeren yapının tamamı kullanılarak belirlenecektir. Ayrıca, proteinin içsel dinamiğini saptamada temel dayanak olarak görülen rezidülerin, inaktif/aktif yapılarda ve konformasyonel geçişlerdeki işlevi incelenecektir. Belirlenen dayanak noktaları mutasyonları hastalığa sebep olan rezidüer ile karşılaştırılacaktır. İşlevsel önemi belirlenmiş rezidüerlerin *in silico* mutasyonlarının c-Src kinazın aktif ve inaktif yapı arasındaki geçişe karşılık gelen serbest enerji yüzeyine etkisi araştırılacaktır. Çalışmadan elde edilmesi beklenen sonuç, Şekil 5.a'daki gibi aktif halden inaktif hale geçişte enerji yüksekliğinin düşmesidir. Daha sonra proteinin mutasyonsuz ve mutasyonlu halleriyle deneysel olarak da çalışma tekrarlanacaktır. Literatürde c-Src üzerine AFM ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer kinazlarla yapılan çalışmalar deney protokollerinin oluşturulması için kullanılacaktır (Hurth vd., 2007; Puchner vd., 2008). Son olarak, c-Src'den elde edilen sonuçlar Hck ve Abl kinazları gibi diğer kinazlarla karşılaştırılacak ve kinazlarda görülen ortak ve farklı dinamik özellikler belirlenecektir.



Şekil 6. c-Src kinaz enziminin aralarında 23.3 Å RMSD fark bulunan inaktif (PDB: 2SRC) ve aktif (PDB: 1Y57) yapılarının ve olası işlevsel bölgelerinin gösterimi. C-sarmalı (304-316),

katalitik bölge (303-308) ve aktivasyon bağlacı (404-435) sırasıyla pembe, turuncu ve yeşil renk ile gösterilmiştir.

Literatürde c-Src kinaz aktivitesini bozan mutasyonlar ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Örneğin, R95W, T96I, D117N, W260A ve R318Q mutasyonlarının enzim aktivitesinin normalin üzerinde artmasına, K295M ve Y527F mutasyonlarının ise kinaz aktivitesinin kaybedilmesine sebep olduğu ortaya konmuştur (Snyder vd., 1985; Griffiths vd., 2004; Miyazaki vd., 1999). Bu çalışmada bu mutasyonların inaktif ve aktif yapı arasındaki geçişe dinamik etkileri *in silico* olarak incelenecek ve bozulmanın muhtemel sebepleri belirlenmeye çalışılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Proje kapsamında kullanılan yöntemler hesapsal ve deneysel yöntemler olmak üzere aşağıda iki başlık altında sunulmuştur.

3.1 Hesaplamalı Yöntemler

Bu proje kapsamında farklı pek çok hesapsal yöntemden faydalanılmış olup bunlar aşağıda ilgili başlıklar altında detaylı olarak tartışılmıştır.

3.1.1 Elastik Ağyapı Modelleri

Elastik Ağyapı Modelleri (ENM), proteinlerin üç boyutlu yapısını belirlemek için kullanılan modellerdir. Bu modellerde; üç boyutlu yapı belirli bir mesafede kalan proteinleri, birbirlerine harmonik yaylarla bağlanmış alfa-karbon kümesi olarak ele alır. Böylelikle, proteinlerin titreşimsel dinamiği incelenebilir. Bu bağlamda; Polimer Araştırma Merkezi, Gaussian Ağyapı Modeli (GNM) (Gaussian Network Model) (Haliloğlu vd., 1997; Cui ve Bahar, 2006) ve Anizotropik Ağyapı Modeli (ANM) (Anisotropic Network Model) (Atılğan vd., 2001) olmak üzere iki adet Elastik Ağyapı Modeli geliştirmiştir. Protein ağyapısı, GNM'de N tane aminoasit ile N tane C-alfadan oluşan bir yapıdır ve bu yapı (N×N) Kirchhoff matrisi ile temsil edilir. Farklı modlarla yapılan hareketler, Kirchhoff matrisinin özdeğer ya da tekil değer ayrışımı kullanılarak elde edilir. Dalgalanma (fark) vektörü ΔR_i (auto-correlation) veya i'inci aminoasitin j'inci aminoasite göre dalgalanması (cross-correlations) Denklem 3.1'deki gibi hesaplanır. Λ matrisi karakteristik kök matrisi olarak modların frekansını ifade eder. Karakteristik kök matrisinin (N-1) tane sıfırdan farklı elemanı vardır. En düşük değer, en yavaş olan kolektif ve global hareketleri temsil eden moddur.

$$\langle \Delta R_i . \Delta R_j \rangle = \frac{3k_B T}{\gamma} [\Gamma^{-1}]_{ij} = \frac{3k_B T}{\gamma} [U\Lambda^{-1}U^T]_{ij} = \frac{3k_B T}{\gamma} \sum_k [\lambda_k^{-1} u_k u_k^T]_{ij} \quad 3.1$$

GNM'de yön bilgisi yoktur, ANM ise kolektif hareketlerin yönleri konusunda da bilgi verir. ANM, Hessian matrisinin harmonik potansiyeline dayanan bir normal mod çözümlemesi modelidir. Dalgalanma (fark) vektörü ΔR_i (auto-correlation) veya i 'inci aminoasitin j 'inci aminoasite göre dalgalanması (cross-correlations) Denklem 3.2'deki gibi hesaplanır. Toplamlar tüm 3N-6 adet mod üzerinden hesaplanmaktadır.

$$\langle \Delta R_i . \Delta R_j \rangle = \frac{k_B T}{\gamma} [\tilde{H}_{3i-2,3j-2}^{-1} + \tilde{H}_{3i-1,3j-1}^{-1} + \tilde{H}_{3i,3j}^{-1}] \quad 3.2$$

Elde edilen düşük frekanslı modlar, proteinin doğal haldeki kolektif hareketlerinin mekanizması ve olası konformasyonel geçişleri hakkında bilgi verir. Yüksek frekanslı modlar ise substrat/DNA vb. gibi yapılara bağlanan, evrimsel açıdan değişmemiş ve katlanma çekirdeğindeki rezidülerle ilişkilidir.

3.1.2 Moleküler Simülasyonlar

Langevin Dinamiği Simülasyonları: Stokastik Dinamik simülasyonları, MD simülasyonlarının bir uzantısıdır. MD simülasyonlarından en belirgin farkı, bu simülasyonda partiküllerin içinde bulunduğu çözücünün maddeye etkisinin stokastik terimlerle hareket denkleminde dahil edilir. Böylelikle, ihmal edilen serbestlik derecelerinin (degree of freedom, dof) etkileri simülasyonlara yaklaşık olarak dahil edilmiş olur. Stokastik Dinamik için kullanılan hareket denklemi Langevin denklemidir ve bu denklem 3.3'de kompakt haliyle gösterilmiştir.

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = -\frac{\partial V}{\partial r_i} - m_i \gamma \frac{dr_i}{dt} + R_i(t) = -\nabla_i V - \zeta_i \dot{r}_i + R_i \quad 3.3$$

Langevin deklemindeki $-\nabla_i V$ terimi klasik MD'de kullanılan potansiyel terimine karşılık gelir ve moleküler etkileşimleri açıklar. ζ_i terimi, örtülü çözücü (implicit solvent) simülasyonlarındaki hayali sürüklenme kuvveti sürtünme katsayısıdır (friction/damping coefficient). R_i terimi ise çözünen ve çözücü molekülleri arasındaki stokastik çarpışmaları ifade eden rassal kuvvettir. R_i ortalaması sıfır olan bir beyaz gürültü (white noise) vektörüdür. $\zeta_i=0$ olduğunda Langevin denklemi klasik MD denkleminde dönüşür. $\zeta_i > 0$ olduğu durumlarda, sisteme etki eden rassal kuvvet enerji yüzeylerindeki bariyerlerin aşılmasına yardımcı olur. Bu nedenle, Stokastik Dinamik klasik MD'ye oranla konformasyonel uzayı daha etkili bir

örnekleme yoluyla tarar. Langevin denkleminde ifade edilen eylemsizlik (inertial) durumu küçük sürtünme katsayısı limitinde gerçekleşir. Diğer yandan, büyük sürtünme katsayısı limitinde ise hareket yaygın (diffusive) veya Brown hareketi olarak isimlendirilir.

Yönlendirilmiş ANM/LD Metodolojisi: Bu projedeki en önemli hesapsal amaç verilen bir biyolojik sistemin içsel dinamiğini kullanarak konformasyonel uzayını en etkin biçimde örnekleyerek klasik MD simülasyonlarıyla gözlemlenemeyecek büyüklükteki konformasyonel geçiş patikalarını tahmin edilmesine olanak sağlayacak bir simülasyon yönteminin geliştirilmesiydi. Bu amaçla hibrit ANM-LD dinamik simülasyon yöntemi geliştirilmiş bir çok sistemden denenmiş ve projede çalışılması planlanan biyolojik sistemlere detaylı bir şekilde uygulanmıştır. ANM-LD ile fizyolojik olarak önemli olan saniye-milisaniye zaman ölçeklerine ulaşmak ve proteinin işlevleriyle ilişkili büyük konformasyonel değişiklikleri gözlemleyebilmek mümkün olmuştur.

Simülasyonlar hedefli ve hedefsiz olmak üzere iki şekilde de yapılabilir. Hedefli (hedefe yönlendirilmiş) simülasyonlar bilinen başlangıç ve hedef konformasyonlar arasında gerçekleştirilir. Hedefsiz olan simülasyonlarda ise verilen işlevsel kararlı durumundaki hareketler tahmin edilmeye çalışılır. Bu proje çerçevesinde geliştirilen hesapsal yöntem hedefli olan yaklaşımı içermektedir. Ancak hedefli yaklaşımın iki farklı şekilde gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır: hedef yapının bilinmesi ve hedef yapı ile ilgili sınırlı yapısal bilginin bilinmesi durumunda işlevsel patikaların elde edilmesi. Proje çerçevesinde gerçekleştirilen deneysel çalışmaların başlıca amacı ANM-LD simülasyonlarında kullanabileceğimiz bilgilerin elde edilmesi ve ANM-LD simülasyonlarını bu doğrultuda geliştirmektir.

ANM modlarıyla yönlendirilmiş Langevin dinamiği simülasyonları (ANM-LD; Langevin dynamics simulations coupled with ANM modes) algoritmasında her simülasyon basamağında kullanılan temel hesaplama prensipleri vardır. Hedef yapının bilindiği durumlar için detaylı protokol Ek 1'de verilmiştir.

AFM deneylerinden elde edilen kısmı bilgilerin ve diğer olası deneysel kısmı bilgilerin ANM-LD kullanıma protokolleri Bulgular başlığı altında P1 iş paketinde verilmiştir.

Metadinamik

Metadinamik, gelişmiş örnekleme yöntemleri arasında en çok kabul edilen yöntemlerden biridir. Metadinamik, başlangıçta bir MD simülasyonuna benzer; aralarındaki fark ise metadinamikte önceki değere bağlı bir meyil kuvveti (meyil/sapma potansiyeli) kullanılmasıdır. Meyil/sapma potansiyelleri, büyük serbestlik derecesinin azaltılması amacıyla

sisteme tanıtılır. Sapma/meyil potansiyelleri önceden tanımlanmış kolektif değişkenlerden seçilir. Kolektif değişkenler herhangi bir fonksiyon olabilirler; ama mutlaka atomik kartezyen koordinatlardan türetilmelidir olmalıdırlar.

$$s(t) = s(x_i(t), x_j(t), x_k(t), \dots), 1 \leq i, j, k \dots \leq N \quad 3.4$$

Denklemden $s(t)$ değeri, önceki s değerinden hesaplanan bir sonraki adımdaki kolektif değişken değeridir (CV). x zamana bağlı kartezyen koordinat fonksiyonudur. t değeri zamanı, N ise toplam atom sayısını ifade eder. Kolektif değişken denklemden s değeri değerini etkileyen bazı serbestlik dereceleri üzerinde rol oynar.

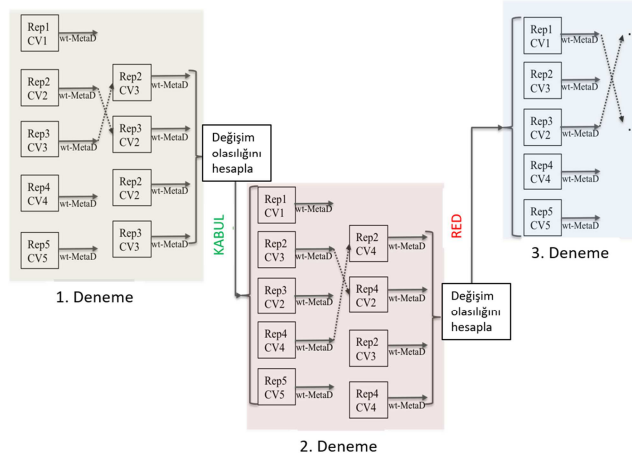
Düzenli zaman aralıklarında τ , s_t merkezli itici Gaussian terimleri potansiyele eklenir ve metadinamik potansiyele etki eden kolektif değişken şu formu alır:

$$V_{meta}(s, t) = \sum_{t=0, \tau, 2\tau, \dots} h e^{-\left(\frac{(s-s_t)^2}{2\sigma^2}\right)} \quad 3.5$$

V_{meta} önceki değere bağlı kolektif değişkenler üzerinde rol oynayan bir potansiyeldir. Denklemden t zaman, τ düzenli zaman aralığı, h Gaussian yüksekliği ve σ^2 ise Gaussian varyansıdır. Sistemin toplam potansiyeli basitçe orijinal potansiyelin ve V_{meta} tarafından elde edilen potansiyelin toplamı olacaktır.

$$V_{system} = V + V_{meta} \quad 3.6$$

CM-BexMetaD: CM-BexMetaD (Collective Modes Driven Bias Exchange Metadynamics) kolektif mod güdümlü sapma değişim metadinamik yöntemi, ANM modları kullanarak proteinlerin kararlı yapıları arasındaki büyük konformasyonel değişimleri ve bu sıradaki ara yapıların belirlenmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntem çerçevesinde, proteinlerin içsel işlevsel dinamikleri göz önünde bulundurularak proteinlerin serbest enerji yüzeylerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Hedef yapının bilindiği ve bilinmediği durumlarda proteinin başlangıç yapıdan kolektif modlar kullanılarak yönlendirilmesi ve konformasyonel alanın belirlenmesi mümkündür. Ayrıca, birden fazla değişken aynı anda sapma (bias) olarak sisteme tanımlanabilmektedir. Bu yöntem, çözücü etkileşimlerini açıkça (explicitly) hesaba katması sebebiyle ANM-LD yönteminden ayrılmaktadır. Yöntemin basitçe gösterimi Şekil 7'de yapılmıştır.



Şekil 7. Sapma değişim (bias-exchange) yaklaşımının şematik gösterimi

Hedefe Yönlendirilmiş Metadinamik Simülasyonları

Metadinamik yöntemi, farklı genel değişkenlerin (collective variable) kullanımına olanak tanımaktadır (*rmsd*, *distance*, *eigenvector* vb.). Bunlardan bir tanesi de *rmsd* colvar'ı olup, bu değişken başlangıç yapısı verilen sistemin bilinen bir hedef yapı yönünde güdümlü olarak koşturulmasını sağlamaktadır. Bu genel değişken çözücü etkileşimlerinin açıkça hesaba katıldığı simülasyonlar ile proteinlerin farklı kararlı yapıları arasındaki (açık-kapalı gibi) geçişini elde etmede kullanılmıştır.

3.1.3 Açısal Uzayda Gaussian Ağyapı Modeli

Açısal uzayda Gaussian ağyapı modeli ile en yavaş dinamik modlardaki değişimlerin ve büyük konformasyonel geçişlerin incelenmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, rezidüler arasındaki oynamalar/değişimler, açısal olarak hesaplamalara dahil edilmektedir. 112T569 numaralı TÜBİTAK projesinde konformasyonel geçişleri tahmin edebilmek, geçişler sırasında oluşan anahtar dinamik özellikleri saptayabilmek ve ara yapıları ortaya çıkarmak için açısal uzayda GNM yönteminin ilk formu bazı kabuller altında gerçekleştirilmiştir. Bu projede ise normalizasyona ait birinci dereceden bütün terimler hesaplamalara dahil edilerek iyileştirme yapılmıştır.

Hesaplamalara ardışık karbon α atomlarının meydana getirdiği iki düzlem arasındaki açı denkleminde (3.7) başlanmış ve vektörel çarpım için tensör çarpım kuralı uygulanmıştır. Taylor serisi açılımı ile düzlemler arasında oluşan ortalama değişimler (3.10) hesaplanmıştır. Her düzlem için 29 adet birinci derece terim, ortalama değişim/oyunma denkleminde ise toplam 841 terim mevcuttur.

$$\cos\phi_i = \frac{(R_{i+2} - R_{i+1}) \times (R_{i+1} - R_i)}{|(R_{i+2} - R_{i+1}) \times (R_{i+1} - R_i)|} \cdot \frac{(R_{i+1} - R_i) \times (R_i - R_{i-1})}{|(R_{i+1} - R_i) \times (R_i - R_{i-1})|} \quad 3.7$$

$$\cos\phi_i = \cos\phi_i^0 - \sin\phi_i^0(\Delta\phi_i) = \cos\phi_i^0 + \text{Birinci Dereceden Terimler} \quad 3.8$$

$$\Delta\phi_i = - \frac{\text{Birinci Dereceden Terimler}}{\sin\phi_i^0} \quad 3.9$$

$$\langle \Delta\phi_i \Delta\phi_j \rangle = \frac{(\text{Birinci Dereceden Terimler})_i (\text{Birinci Dereceden Terimler})_j}{\sin\phi_i^0 \sin\phi_j^0} \quad 3.10$$

ϕ_i : iki düzlem arasındaki açı

R_i : Karbon α atomunun uzaydaki yeri

3.2 Deneysel Yöntemler :

3.2.1 Atomik Kuvvet Mikroskobu Görüntüleme Deneyleri

Deneysel teknikler ve yaklaşımlar biyolojik makromoleküllerin yapıları ve dinamik davranışları ile ilgili önemli bilgi verebilmektedir. Son yıllarda, proteinlerin şekil ve işlevlerinin çalışılmasında Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy/AFM) giderek önem kazanmaktadır. AFM, Taramalı Tünelleme Mikroskobu (Scanning Tunneling Microscope/STM)'nin ileri versiyonu olarak, ilk kez 1986'da kullanılmaya başlanmıştır (Binnig vd., 1986). Başlangıçta katı haldeki materyallerin görüntülenmesi için kullanılmışsa da (Whited ve Park, 2014), daha sonra birçok biyolojik çalışmada kullanılmaya başlanmıştır. Nanometre duyarlılıkla kuvvet ve deplasman tayinine ve kontrolüne imkan sağlayan AFM, nanoteknolojide sıklıkla kullanılan standart bir ölçüm metoduna dönüşmüştür.

Sıvı içerisinde çalışmaya uygun olması, pikonewton kuvvet çözünürlüğü ile nanometre ölçeğinde topografik görüntüleme ve kuvvet ölçümlerini mümkün kılması sayesinde biyomoleküler ölçümlerde tek-molekül/tek-hücre hassasiyeti sağlamaktadır.

AFM tekniğinin en önemli avantajı, biyolojik numunelerin karakterizasyonuna izin veren fizyolojik koşullarda çalışılabilmesi ve aynı zamanda biyolojik süreçlerin gerçek zamanlı izlenmesine olanak sağlamasıdır. AFM yönteminin, biyolojik moleküllerde birden fazla uygulama alanı vardır ve son zamanlarda AFM ile yüksek çözünürlükte görüntü elde edilebilmesi sayesinde, önemi giderek artmaktadır. AFM yöntemi, protein zincirlerinin, tek protein ve supramoleküler yapıların, uzaysal ve zamansal organizasyonu, formları ve işlevleri arasındaki bağıntı ile ilgili moleküler seviyede bilgi verebilmektedir (Baclayon vd., 2010).

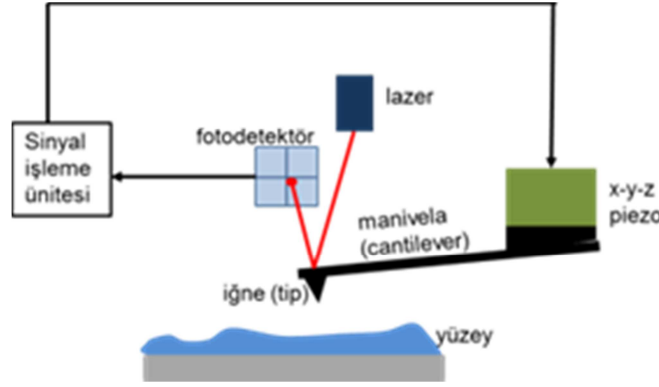
Termodinamik kurallar ile dinamik olan biyolojik yapının gösterdiği lokal ve global hareketlerin çalışılmasında, uzaysal olarak nanometre ve zamansal olarak milisaniye/saniye ölçeğine ulaşılabilir (Gaczyńska vd., 2004). Özellikle son on yılda AFM, biyomolekülleri ve hatta hücreleri içine alan biyolojik örneklerin mekanik ve yapısal özelliklerinin incelenmesinde güçlü bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Vahabi vd., 2013). Biyolojik sistemlerde AFM tekniğini kullanmanın en önemli avantajı, biyomoleküllerin başka hiçbir örnek hazırlama sürecine tabi tutulmaksızın doğal ortamlarında, özellikle canlı dışı (in vitro) tampon çözeltilerde, doğal olarak buldukları yerde (in situ) ve hatta hücre içinde (in vivo) çalışılmasına imkan sağlamasıdır.

AFM, biyolojik yapıların incelenmesinde nanometre çözünürlüğünde oldukça önemli bilgiler vermenin yanında, bu biyolojik oluşumların hücre içerisinde konumlandırılmasına, moleküller arasındaki etkileşimin pN hassasiyetinde ve oluşan bağ kuvvetlerinin tek molekül seviyesinde belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Whited ve Park, 2014; Trinth vd., 2012; Miyagi vd., 2008; Vahabi vd., 2013).

AFM düzeneğindeki mikro-boyutta esnek bir manivela (cantilever) aparatı, manivela ucuna bütünleştirilmiş sivri bir iğne ile iğnenin etkileştiği bir yüzey arasındaki etkileşim kuvvetlerini belirler. Manivela, üstünde yer alan bir piezo eyleyici vasıtasıyla yüzeye temas eder ve yüzeyden ayrılır. Esnek manivela, pikometre sapma değişikliklerine karşı hassastır ve ~ 5 pN / nm kadar düşük bir yay sabiti ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, numune ve kuvvet uygulamasının manipülasyonunu sağlayan mükemmel bir kuvvet sensörüdür. Kuvvet spektroskopisi modunda, manivela, numuneyi çekerek veya dürterek mekanik kuvvetleri uygulamak ve ölçmek için dikey yönde (z) hareket ettirilir. Kuvvet spektroskopisi ölçümlerinin kantitatif yapısı AFM'yi biyofizikte değerli bir araca dönüştürmüştür. Kuvvet spektroskopisi, protein alanlarını açmak ve bireysel reseptör/ligand bağlarını bozmak, normal ve kanserli hücrelerin mekanik özelliklerini araştırmak için gereken kuvvetleri belirlemeye izin vermiştir.

AFM deneyleri üç ana grupta toplanabilir: molekül çekme (molecular pulling), kuvvet kısıkaçı (force-clamp) ve topoğrafik yüzey tarama/tanıma. AFM tekniğinin topoğrafik yüzey tarama ile moleküllerin görüntülerinin elde edilmesinde ise kullanılan iki ana yöntem vardır.

Bunlar, iğnenin yüzeye temas ettirilerek yüzeyin şeklinin çıkartılması olarak tanımlanan temas yöntemi (contact mode) ve iğnenin yüzeye vurulması ile yüzeyin görüntüsünün elde edilmesi olarak tanımlanan vurma yöntemidir (tapping mode). Temas yönteminde maniveladan yansıyan ışın sabitken, vurma yönteminde manivela ucu rezonans sıklığında ve sabit büyüklükte salınır.



Şekil 8. AFM düzeneğinin kavramsal şeması.

Bu çalışmada temas yöntemi kullanılmış ve yöntem aşağıda daha detaylı anlatılmıştır.

Temas Yöntemi: AFM iğnesi, görüntüsü elde edilmek istenen yüzeye temas ettirilip manivelanın görüntülenmek istenen numune yüzeyini (x-y/düzlemi) x-y piezo eyleyici ile taraması sağlanır.

İğnenin hareketleri geri-besleme sisteminin temelini oluşturan bir PID denetleyici tarafından kontrol edilmektedir. Geri-besleme sistemi tarafından yüzey üzerinde kontrol edilen manivelanın sabit bir kuvvetle yüzeye bastırması sağlanmaktadır. Saptırılmış lazer ışınının fotodetektör üzerindeki pozisyonunun farkı, uç ile numune arasındaki etkileşim kuvvetleri ve tarama esnasında yüzeye dik (z-ekseni) eksendeki topoğrafik farklar manivela üzerinde bükülmeye sebep olur. Yüzeyin topoğrafik haritası, bu bükülmenin optik yöntemle ölçümüyle kartezyen koordinatlar şeklinde elde edilir.

Topoğrafik farkların oldukça büyük olduğu ya da yüzeyin duyarlı (hassas) olduğu durumlarda, manivela-yüzey kuvvetlerini azaltılabilmek adına z-piezo ile manivela kontrol edilerek manivela-yüzey arasındaki kuvvetler sabit tutulabilir. Bu metodun biyolojideki kullanımlarından biri, reel zaman ve fizyolojik koşullara oldukça yakın ortamlarda, moleküllerin üç boyutlu görüntülenebilmesidir. Z-ekseninde hassasiyet optik metotlarda belirli bir limite sahiptir. X-Y- eksenlerinde ise hassasiyet, yüzeyi tarayan iğnenin geometrisine bağlıdır. Manivela iğnesinin yüzeyle temas eden noktası bir çember olarak düşünülürse, çemberin çapı ticari manivelalar için 1-20 nm aralığında değişmektedir.

AFM, numunenin topografik görüntülerinin yüzeyin esnek bir manivela ile x-y düzleminde taranmasıyla elde edilen bir görüntüleme aracı olarak geliştirilmiştir. Piezo ile programlanan bir geri besleme kontrol birimi, sapmayı sabit tutmak için tarama sırasında manivelanın z konumunu sürekli olarak ayarlar. İğne yüzey ile devamlı temas ettiği için yüksek çözünürlüklü görüntü almak olasıdır.

3.2.2 Deney Protokolleri

AFM temas modu görüntüleme deneyleri kapsamında takip edilen genel ve sistem bazlı deney aşamaları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Projenin ilk aşamalarında yüzey temizleme protokolü (1 saat aseton, ½ saat metanol, ½ saat izopropil alkol ve azot gazı ile kurutma) uygulanan 9mm çap ölçüsünde mika yüzeyler kullanılmakta idi, fakat projenin ilerleyen dönemlerinde daha net görüntüler elde edilmesi amacıyla bu adımda gelişmeye gidilmiştir. Literatür taramasında deney esnasında taze kesilen (freshly cleaved) mika yüzey kullanımının belirlenmesini takiben, sonraki deneyler için Agar Scientific firmasından satın alınan 20mm çap ölçüsünde mika yüzeylerle deneylere devam edilmiştir. Tüm deneylerde MSNL-10 manivela kullanılmıştır.



Şekil 9. Agar Scientific firmasından satın alınan ve AFM temas modu deneylerinde kullanılan 20mm çap ölçüsündeki taze kesilen (freshly cleaved) mika yüzeyler.

Deneysel parametrelerin optimizasyonu her deneyin başlangıcında gerçekleştirilmiş ve PID parametreleri ve ayar noktasının (setpoint) uygun değerde olmasına dikkat edilmiştir. Aşağıda sıralanan adımlar tüm deneyler için ortaktır.

- Protein örneğinin deneyde kullanılacak konsantrasyonunun tayini
- Manivelanın (cantilever) sisteme takılması
- Lazer ışınının manivela ucu üzerine düşecek şekilde ayarlanması
- Mika yüzeyin deneyin hemen öncesinde taze kesilmesi (fresh cleavage)
- PID ve ayar noktasının ayarlanması
- Mika yüzeyin taranması (opsiyonel)
- Görüntüleme tampon çözeltisinin taranması (opsiyonel)
- Proteinin mika yüzeyine inkübasyonu
- Yüzeyin manivela ucu ile temas ettirilmesi (engage)
- Mika yüzeyindeki protein çözeltisinin taranması ve yüzey topografisinin elde edilmesi

BtuCD membran sistemi için deney protokolü

MyBioSource firmasından her biri tekli protein olarak sıvı formda satın alınan BtuC, BtuD ve BtuF proteinleri ayrı küçük kaplara bölünmüş ve uygun koşullarda (sıvı azot ile dondurulmasını takiben -80°de) sonraki kullanımlar için saklanmıştır.

BtuCD-F membran protein sisteminden sadece BtuC, FOS-12-Tris tampon deterjanı içerisinde çözdürülmüş halde temin edilirken BtuD ve BtuF Tris tampon çözeltisi içerisinde gelmiştir. BtuCD-F kompleksi için AFM görüntüleme deneyleri için uygun bir protokol bulunamamıştır. Fakat bu membran sistemi ile gerçekleştirilen literatürdeki FRET deneyleri aşağıdaki adımları takip eder.

- Yüzeyin (coverslip) PEG ve biotin-PEG karışımı ile pasifleştirilmesi.
- Yüzeyin Streptavidin (Invitrogen, 0.1 mg/mL) ile kaplanması
- Deterjanda görüntülemeye önce yüzeyin Biotin-NTA-Ni²⁺ ile inkübasyonu
- Yüzeyin 0-20 nM His-etiketli BtuCD ile inkübasyonu
- Görüntüleme tamponu: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl ve% 0.1 LDAO, pH 7.5
- ATP'ye bağlı durumu yakalamak için 1 mM Adenozin 5' - (β, γ-imido) trifosfat (AMP-PNP, Sigma) / 1mM MgCl₂ veya 1 mM ATP / 50 μM EDTA ilavesi
- BtuCD-F kompleksinin görüntülenmesi veya deney sırasında tampona doğrudan BtuF ilavesi
- 10 μM B12 Vitamini ekleme

Biz BtuCD membran proteini ile gerçekleştirdiğimiz deneylerde aşağıdaki adımları takip ettiğimizde BtuCD ve BtuCD-F kompleks proteini için farklı topografileri ortaya çıkarabildik. Bu sebeple bu protokolün membran sistemleri için çalışılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

- Taze kesilmiş mika yüzeye 10 μL BtuC (1 mg/mL) + 10 μL BtuD (1 mg/mL) eklenmesi
- 30 dakika inkübasyon
- Yüzeyin bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için LDAO-Tris tampon çözeltisi ile yıkanması
- Yüzeye 10 μL BtuF (1 mg/mL) eklenmesi
- 30 dakika inkübasyon
- Yüzeyin bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için LDAO-Tris tampon çözeltisi ile yıkanması
- Yüzey görüntüleme çözeltisi olarak LDAO-Tris eklenmesi

- Menisküs oluşumunun sağlanması ve temas modunda deneye başlanması

Proteinin LDAO deterjanı içerisinde gelecek şekilde sipariş edilmesi ve bu sebeple LDAO deterjanının satın alınması; ancak sonrasında üreticinin membran proteini FOS-12 deterjanı içerisinde gönderebilmesi sebebiyle bu noktada protokolde farklı deterjan tampon görüntüleme çözeltisi kullanmamız gerekmiştir. Ancak hem LDAO'nun hem de FOS-12'nin çift-kutuplu (zwitterionic - toplam yükleri sıfır) deterjanlar olması sebebiyle benzer etkileşim gösterdikleri varsayılmıştır.

GroEL/ES şaperon kompleksi için deney protokolü

Sigma Aldrich firmasından kuru toz halde alınan insan organizmasına ait *E. coli* hücrelerinde sentezlenmiş GroEL ve GroES proteinleri, üretici firma ile temasa geçilerek çözelti konsantrasyonu sırasıyla 1 mg/mL ve 0.25 mg/mL olacak şekilde steril ultra saf su (ddH₂O) içerisinde sulandırılmış ve uygun koşullarda (sıvı azot ile dondurulmasını takiben -80°'de) sonraki kullanımlar için saklanmıştır.

Aynı şekilde yüzey fiksleme çözeltisi olarak glutaraldehit çözeltisi Sigma Aldrich firmasından satın alınmış ve konsantrasyonu %2.5 olacak şekilde ddH₂O ile seyreltilmiştir.

Deneyde kullanılan ATP molekülü yine Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır ve konsantrasyonu 2.5 mM (maksimum çözünürlük 50 mg/mL) olacak şekilde hazırlanmıştır.

GroEL proteini kullanılarak farklı koşullarda deneyler gerçekleştirildikten sonra, görüntüleme deneylerinde aşağıda sıralanan protokolün takip edilmesine karar verilmiştir.

- Taze kesilmiş mika yüzeye 20 µL GroEL (1 mg/mL) eklenmesi
- 30 dakika inkübasyon
- Yüzeyin bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için ddH₂O ile yıkanması
- Yüzeye filtrelenmiş %2.5 glutaraldehit fiksleme çözeltisi eklenmesi
- 30 saniye sonra yüzeyin ddH₂O ile yıkanması
- Yüzeye 10 µL GroES (0.25 mg/mL) ve 2.5 mM ATP eklenmesi
- 30 dakika inkübasyon
- Yüzeyin bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için ddH₂O ile yıkanması
- Yüzey görüntüleme çözeltisi olarak ddH₂O eklenmesi
- Menisküs oluşumunun sağlanması ve temas modunda deneye başlanması

c-Src kinaz proteini için deney protokolü

Literatür taramasında c-*Src* kinaz proteini ile gerçekleştirilen AFM görüntüleme deneyine rastlanmamıştır. Deney ön hazırlıkları gerçekleştirilirken üretici firmadan destek alınırken, diğer kinazlar üzerinde gerçekleştirilen deneyler de incelenmiştir

MyBioSource firmasından kuru toz halde alınan insan organizmasına ait böcek hücresinde sentezlenmiş işaretsiz (tag-free) c-*Src* kinaz proteini, üretici firma ile temasa geçilerek çözelti konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde steril ultra saf su (ddH₂O) içerisinde sulandırılmış ve uygun koşullarda (sıvı azot ile dondurulmasını takiben -80°'de) sonraki kullanımlar için saklanmıştır.

c-*Src* kinaz proteini kullanılarak farklı koşullarda deneyler gerçekleştirildikten sonra, görüntüleme deneylerinde aşağıda sıralanan protokolün takip edilmesine karar verilmiştir.

- Taze kesilmiş mika yüzeye 50 µL c-*Src* kinaz (0.25 mg/mL) eklenmesi
- 30 dakika inkübasyon
- Yüzeyin bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için ddH₂O ile yıkanması
- Yüzeye filtrelenmiş %2.5 glutaraldehit fiksleme çözeltisi eklenmesi
- 30 saniye sonra yüzeyin ddH₂O ile yıkanması
- Yüzeyin bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için ddH₂O ile yıkanması
- Yüzey görüntüleme çözeltisi olarak ddH₂O eklenmesi
- Menisküs oluşumunun sağlanması ve temas modunda deneye başlanması

3.3 Entegrasyon

Deneysel verilerin simülasyon yöntemine entegrasyonu için proje çerçevesinde gerçekleştirilen deneylerden elde edilen veriler farklı protokoller altında değerlendirilmiş, ayrıca farklı deneysel yaklaşımlardan gelebilecek deney verilerinin sonuçlarının entegre edilebileceği protokoller geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu deney verilerinden biri SAXS eğrileridir. SAXS eğrilerinin, kristal yapıdan elde edilmesi amacıyla CRY SOL programı (Svergun vd., 1995) kullanılmış ve ANM-LD yöntemi içerisine entegre edilmesi sağlanmıştır.

Diğer yandan BtuCD örneğinde görüldüğü üzere, ANM-LD ile saptanan ve konformasyonel geçişte rolü olduğu belirlenen dinamik modlar ve bunları oluşturan rezidüler mutasyon deneylerine hedef oluşturacak protein bölgeleri sağlamıştır (Ek 3). Ayrıca FRET gibi iki rezidü arasındaki uzaklığı belirleyen yöntemler, ANM-LD'nin arayapılarında elde edilen uzaklıklarla karşılaştırılabilir (Ek 2) veya ANM-LD'de mod belirlemek için bir kolektif bileşen olarak simülasyonlara yön verebilir.

AFM Görüntülerinin Analizi ve Deneysel Verinin İşlenmesi

Gwyddion Program

AFM görüntüleri psödo-görüntüler (pseudo-images) olarak depolanır ve Gwyddion ve NanoScope gibi görüntü işleme araçlarıyla analiz edilmeleri gerekir; bu projede Gwyddion görselleştirme ve analiz aracı kullanılmıştır. Mesafe ve yükseklik değerleri ölçülebilir ve daha sonra hesaplama çalışmalarında kullanılabilir.

İşlenmemiş deney verileri (raw data) her set için kaydedilmiş ve Gwyddion programında analiz edilmiştir. Tüm işlenmemiş görüntüler program tarafından açılmış ve aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

- Ekranda gerçekçi olmayan herhangi bir yükseklik varsa görüntü kırpma
- Ortalama düzlem çıkarma ile verileri seviyelendirme
- Yüzeyin yukarı bakmasını sağlamak için verileri seviyelendirme
- Satırları hizalama
- Yatay izlerin (çizgilerin) düzeltilmesi
- Gerekirse filtre uygulama (çoğunlukla keskinleştirme)
- İşlenen görüntünün çeşitli formatlarda kaydedilmesi (*.tif, *.txt, *.png vb.)

İlk üç adım (seviyelendirme ve hizalama) yüzeyi düzleştirme aracı olarak kullanılırken, dördüncü adım uç çizikleri temizlememizi sağlar (çizikler temas modu görüntülemeye normaldir). Görüntünün filtrelenmesi, protein yapılarının kolay tanınması için uygulanır fakat tercih edilmesi mecburi değildir. Son görüntü, profilleri çıkarmak, 3D görünümü görüntülemek, görüntüyü daha ileri analizler için metin biçiminde kaydetmek için hazırdır (bağlanma / çözme içindeki protein yapısındaki değişimi saptamak için histogram analizi vb.).

AFM Görüntülerinden Temel Bileşen Eksenini (Principal Component Axis) ve Hacim Bilgisi Elde

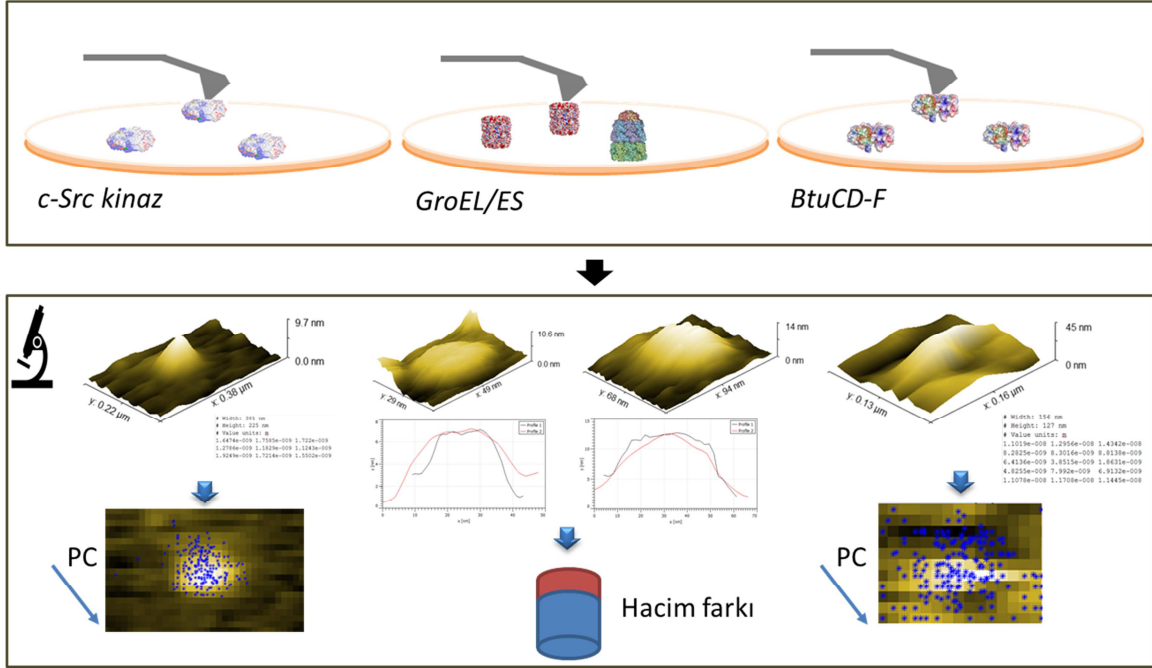
Bu çalışmada öncelikli amacımız, her sistem için olabilecek en yüksek çözünürlükte tek molekül görüntülerinin elde edilmesi olmuştur. Buna göre, AFM görüntülerinden elde edilen tek moleküllere ait üç boyutlu yapılar, Gwyddion programı kullanılarak *.txt dosyası olarak kaydedilmiştir. Bu formattaki görüntüler piksellere ayrılmış protein yükseklik değerlerini (topografi) içermektedir.

Örnek sistem olarak seçilen c-*Src* kinaz proteininin yüzeye sabitlenmiş AFM deney görüntüleri kullanılarak, MATLAB programındaki Görüntü İşleme Araç Kutusu (Image Processing Toolbox) aracılığıyla proteinin görüntü içinde geometrik merkezlerinin dağılımı belirlenmiş ve PDB formatına aktarılmıştır. Daha sonra bu merkezlerin dağılımının bir Python programı ile (Pierre Poulain tarafından geliştirilmiş) temel bileşen analizi yapılarak, temel bileşen eksenleri (principal component axis) belirlenmiştir. Elde edilen eksenlerle normal modların örtüşme değerleri hesaplanarak, ANM-LD protokolü güncellenmiştir.

Ayrıca elde edilen AFM topografik görüntülerinden (düşük çözünürlüklü olmalarına rağmen) protein yapısındaki belirli pertürbasyonlar sonucu (ligand bağlanması gibi) oluşan hacim değişiklikleri tahmin edilebilmektedir. Bu nedenle c-*Src* kinaz ve GroEL sistemlerinde, AFM deneylerinde gözlediğimiz hacim artışına yol açacak modların seçimi hedeflenmiştir. Bunun için elde edilen yapıların hacminin hesaplanması gerektiğinden, hacim hesabı için Crysol algoritması kullanılmıştır. Bu kapsamda, AFM görüntüsünün hacim bilgisi, hedef yapının hacim değeri olarak belirlenmiş ve simülasyon sonunda bu değere ulaşmasını sağlayacak modlar kullanılacak şekilde yöntem geliştirilmiştir.

Proje kapsamında çalışılan sistemlerden c-*Src* kinaz ve BtuCD membran proteinleri için kolektif değişken olarak AFM görüntülerinden elde edilen temel bileşen eksenleri kullanılırken, GroEL için başlangıç ve hedef yapılar arasındaki hacim oranı değişiminden faydalanılmıştır.

Temel bileşen analizinden elde edilen ilk eksen ile örtüşen modlar doğrultusunda yönlendirilmiş ve hacimsel oran bilgisinin kısıt olarak verildiği ANM-LD simülasyonlarının detaylarına ise Bulgular bölümünün P1 iş paketi altında yer verilmiştir.



Şekil 10. AFM deneylerinde çalışılan sistemlerin mika yüzeyinde olası konumlanması ve elde edilen görüntülerden ANM-LD simülasyon yöntemi içine kısıt olarak eklenmesine uygun olanların seçilmesi ve deneysel kısıtların hesaplanması.

Dock-AFM

AFM deneylerinden elde edilen topografik görüntüler ile tek proteinlerin moleküler dinamikleri arasında bir bağlantı kurmayı amaçlayan DockAFM, bir molekülün konformasyonlarının AFM görüntülerinin topografik yüzeyi ile uyumunu hesaplayan çevrimiçi bir hesaplama aracıdır. Bu program, 3 boyutlu protein yapılarını veya modellerini AFM tarafından elde edilen deneysel verilerle karşılaştırmak için kullanılabilir. DockAFM, atomların ve yüzeylerin gerçek alan tanımını ve kendi bileşenlerini kullanarak büyük makromoleküllerin birleştirilmesinin ilk adımı olarak geliştirilmiştir.

DockAFM ile AFM görüntüleri ve bilgisayar simülasyonları arasında ilişki kurmak mümkündür. Bu amaçla, DockAFM, AFM görüntülerinin metin dosyası formatında (*.txt) ve protein yapısının pdb dosya formatında (*.pdb) ifadesine ihtiyaç duyar. Bunlara ek olarak, sonuç görüntüsündeki uç şeklinin yapısının düzeltilmesi için, kullanılan manivela ucunun şeklinin değerleri (yükseklik, yarıçap, vb.) gereklidir. DockAFM, AFM yüzeylerinin altındaki muhtemel kenetlenme pozlarının enerji puanlarını hesaplar ve bunları, değerlerine göre sıralar. Olası konformasyonların (stabil kristal yapılar) AFM topografik yüzeylerine kenetlenmesi sağlanır ve bu yapılardan en düşük enerji puanına sahip olan yapı, en olası

yapı olarak seçilir (bu skor da en iyi sonuç olarak seçilir). Bu hesapsal araç çıktı olarak, kenetlenme sonucunu pdb formatında verir.

AFM deneylerinden elde edilen görüntülerin, pdb formatında yüzeye kenetlenmiş protein yapılarının eldesi amacıyla DockAFM analizi için aday olarak örnek bir GroEL protein görüntüsü seçildi. Birçok denemeden ve geliştiriciler ile iletişime geçtikten sonra, DockAFM sunucusunun düzgün çalışmadığını fark ettik. Programın geliştiricileri tarafından tarafımıza sağlanan örnek dosyalarda bile düzgün bir sonuç alamadık. Bu nedenle, AFM görüntüsünden protein yerleşimini üreten bir harita ve pdb elde edilememiştir.

DockAFM aracı düzgün çalışmadığından, deney-simülasyon entegrasyonunda B planı olarak düşük çözünürlüklü deneysel yöntemlerden faydalanmaya karar verilmiştir. AFM ile karşılaştırıldığında, SAXS, pdb dosyalarından teorik veri oluşturmaya açık tekniklerdir. Bu nedenle, AFM görüntüleme deneyleri için bir yedekleme planı olarak, simülasyonlarımızı yönlendirmede düşük çözünürlüklü yöntemlerden (SAXS) üretilen verileri kullanmayı düşündük. SAXS, NMR ve EM ile karşılaştırıldığında boyut sınırlaması olmaması avantajına sahiptir.

SAXS (Small Angle X-ray Scattering) Küçük Açılı X-ışını Saçılması

Küçük açılı X-ışını saçılması (SAXS), çözelti içindeki biyolojik makromoleküllerin genel şeklini ve yapısal geçişlerini incelemek için kullanılan biyofiziksel bir karakterizasyon yöntemidir. SAXS, proteinlerin, nükleik asitlerin ve çeşitli makromoleküler komplekslerin şekli, yapısı ve kompleks durumu hakkında düşük çözünürlüklü bilgi sağlar. Deneyler çözelti içinde kristalizasyona gerek kalmadan gerçekleştirilebilir, bu da farklı pH ortamında ve konsantrasyonda deneylerin yapılmasına imkan tanıyarak yapı-fonksiyon ilişkisi hakkında yararlı bilgiler edinilmesini sağlamaktadır.

Bir SAXS deneyinin kurulumu kavramsal olarak basittir: genellikle bir kuvars kapillerine yerleştirilen bir partikül çözeltisi, bir toplanmış monokromatik X-ışını ışını ile aydınlatılır, saçılmış X-ışınlarının yoğunluğu bir X-ışını detektörü tarafından kaydedilir. Saf çözücünün saçılma modeli de toplanır ve yalnızca ilgili parçacıklardan gelen sinyal bırakılarak numune (blank) çözeltisi saçılmasından çıkarılır. Elde edilen saçılma modeli, incelenen parçacıkların genel şekli ve büyüklüğü ile ilgilidir. İncelenen numunenin birçok karakteristik parametresi (moleküler ağırlık, partikül hacmi, maksimum boyut (Dmax) ve jirasyon yarıçapı (Rg) dahil deneysel saçılma modelinden elde edilebilir.

CRY SOL programı, bilinen atomik yapıya sahip makromoleküllerden çözelti saçılımını değerlendirmek ve Küçük Açılı X-ışını Saçılma (SAXS) 'dan deneysel saçılma eğrilerine

uyarlamak için bir programdır. Programa girdi olarak, bir protein veya bir protein-DNA (RNA) kompleksinin bir X-ışını veya NMR yapısına sahip bir PDB dosyası kullanılabilir.

Program, küresel ortalama saçılma paternini hesaplamak için saçılma genliklerinin (scattering amplitude) çok kutuplu genişlemesini (multipole expansion) kullanır ve hidrasyon kabuğunu (hydration shell) dikkate alır. CRY SOL, SAXS deneysel verilerini değerlendirerek ve tutarsızlığı (χ^2 değeri) (discrepancy, chi-square) en aza indirerek teorik saçılma eğrisine uydurabilir. Bu uydurma (fitting) üç parametrenin değiştirilmesi ile gerçekleştirilir: (1) atom grubu başına ortalama yer değiştirmiş çözücü hacmi, (2) hidrasyon kabuğunun kontrastı, (3) göreceli arka plan.

Bu proje kapsamında, kristal yapısı bilinen açık ve kapalı adenilat kinaz proteininden farazi deneysel SAXS eğrileri üretilmede faydalanılmış ve bu farazi deneysel veri kullanılarak SAXS eğrilerinin ANM-LD simülasyonlarından elde edilen ara yapılar ile CRY SOL programı ile uyumuna (fitting) bakılmıştır. Sonuçları bu raporda paylaşılmayan bu bulgular kullanılarak c-Src kinaz proteininin SAXS eğrileri ile iyileştirilmiş ANM-LD simülasyonları geliştirilmiş ve deneysel verinin simülasyon metoduna entegrasyonuna dair bulgular P3 iş paketi altında sıralanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda, iş paketlerine karşılık gelecek şekilde dört başlık altında verilmiştir.

4.1 Hesapsal Yöntem Algoritmalarının Oluşturulması Ve Geliştirilmesi

P1 iş paketi kapsamında, bu projede önerilen ve farklı yöntemlere uygulanabilmesi için geliştirilen ANM-LD yöntemi, ona paralel olarak yürütülen Metadinamik yöntemi ve Açılmalı Uzayda Gaussian Ağyapı Modeli kapsamındaki çalışmaların detayları ilgili başlıklar altında verilmiştir. Bu çalışmada, proteinlerin iki kararlı yapısı arasındaki dinamik geçişi fiziksel ve biyolojik olarak anlamlı bir şekilde örnekleyebilmek amacıyla iki hesapsal yöntem, daha sonra deneysel verilerle entegre edilmek üzere, ana simülasyon yöntemi olarak seçilmiştir: ANM-LD ve metadinamik simülasyonları. ANM-LD kurum içi geliştirilmiş olması hasebiyle, farklı kısıtların entegre edilmesine daha elverişli olduğundan ve simülasyon süresi ve buna karşılık gelen hesap gücü açısından daha ekonomik olduğundan bu projede daha çok ANM-LD metodu ile ilerlenmiştir.

4.1.1 ANM-LD Simülasyonları

Klasik ANM-LD Simülasyonları

Yukarıda metod kısmı altında çalışma şekli özetlenen ANM-LD simülasyonlarının, proteinlerin farklı yapıları arasındaki geçiş dinamiklerini örnekleme konusunda başarılı olduğu, bir kısmı bu proje kapsamında olmak üzere yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. 14 to 24 Å RMSD farkı gösteren iki yapı arasında, ANM-LD simülasyonlarıyla 1.4 Å RMSD'ye kadar hedef yapıya yaklaşılabilmektedir. Bu sadece içsel dinamik modların (başka hiç bir yapıyı itki kullanılmadan) LD simülasyonlarını yönlendirmede kullanıldığı düşünüldüğünde önemli bir başarıdır. Bu proje kapsamında da bahsi geçen üç sistem için klasik ANM-LD simülasyonları verilmiştir. Çıkan sonuçlar her bir sistem başlığı altında paylaşılmıştır.

Mod Kısıtlı (Hedefli) ANM-LD Simülasyonları

Proteinlerin sahip oldukları kararlı yapılar karşılık gelen topolojileri gereği edindikleri denge dinamiklerini belli bir normal modlar havuzu ile tanımlamak mümkündür. Dinamik davranışın bu şekilde bileşenlere ayrılabilmesi, sistemin dinamik özelliklerinin manipülasyonuna imkan verir. Mod kısıtlı (hedefli) ANM-LD simülasyonlarında bu manipülasyonun in silico olarak yapılması amaçlanmaktadır. Klasik ANM-LD simülasyonlarında sıklıkla seçilen modlar, simülasyonu yönlendirecek mod havuzundan çıkarılarak alternatif geçiş patikaları yaratılmış, modun geçiş dinamiği için vazgeçilmez olduğu durumlarda ise geçişin sağlanamadığı gözlemlenmiştir. Mod kısıtlı simülasyonlar belli bir modun geçiş dinamiği için ne kadar önemli olduğu, bu dinamiğe nasıl katkıda bulunduğu hakkında fikir verir. Klasik ANM-LD simülasyonlarıyla birlikte geçiş dinamiğinde rolü olan modların saptanmasını ve böylece bu mod hareketini mümkün kılan rezidülerin belirlenerek, olası mutasyon çalışmalarına olanak verir. Bu çalışmada da BtuCD ve c-Src kinaz sistemleri için mod kısıtlı simülasyonlar verilmiştir ve çıkan sonuçlar sistem başlıkları altında paylaşılmıştır.

ANM-LD yönteminin klasik ve mod kısıtlı versiyonlarının AdK sistemi üzerinden, evrimsel özellikler dikkate alınarak incelendiği çalışma Ek 1'de verilmiştir.

Hedefsiz ANM-LD Simülasyonları

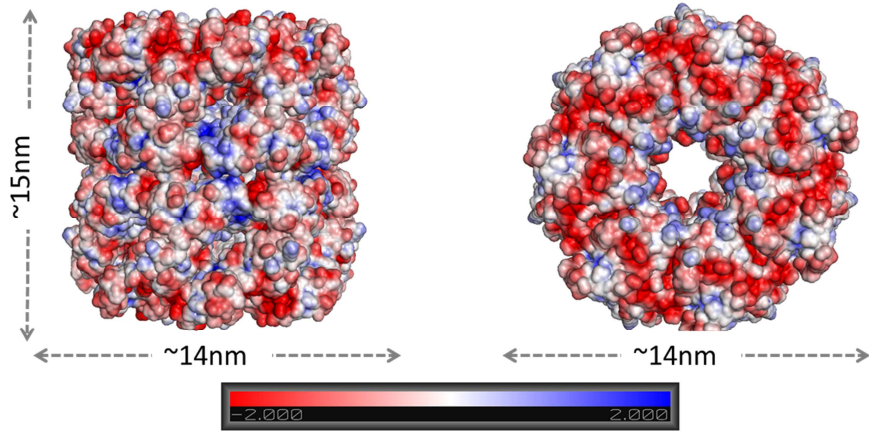
ANM-LD simülasyonlarının kullanım alanını genişletmek yönünde geliştirilen mod kısıtlı ANM-LD simülasyonlarına ilaveten, bilhassa hedef yapının bilinmediği durumlarda kullanılmak üzere ve yöntemi deneysel verilerle birleştirmeye uygun hale getirebilmek amacıyla, literatürde geçiş dinamiği özetlediği gösterilen kolektif değişkenler ANM-LD simülasyonlarını yönlendirmek için hedefsiz ANM-LD simülasyonları başlığı altında kullanılmıştır. Belli rezidüler arasındaki uzaklık, protein kısımlarının birbirlerine göre açılmal

durumları gibi değişkenler bu kolektif değişkenleri oluşturabilir. Bu simülasyonlar c-*Src* kinaz ve BtuCD sistemleri için koşulmuştur ve çıkan sonuçlar sistem başlıkları altında paylaşılmıştır.

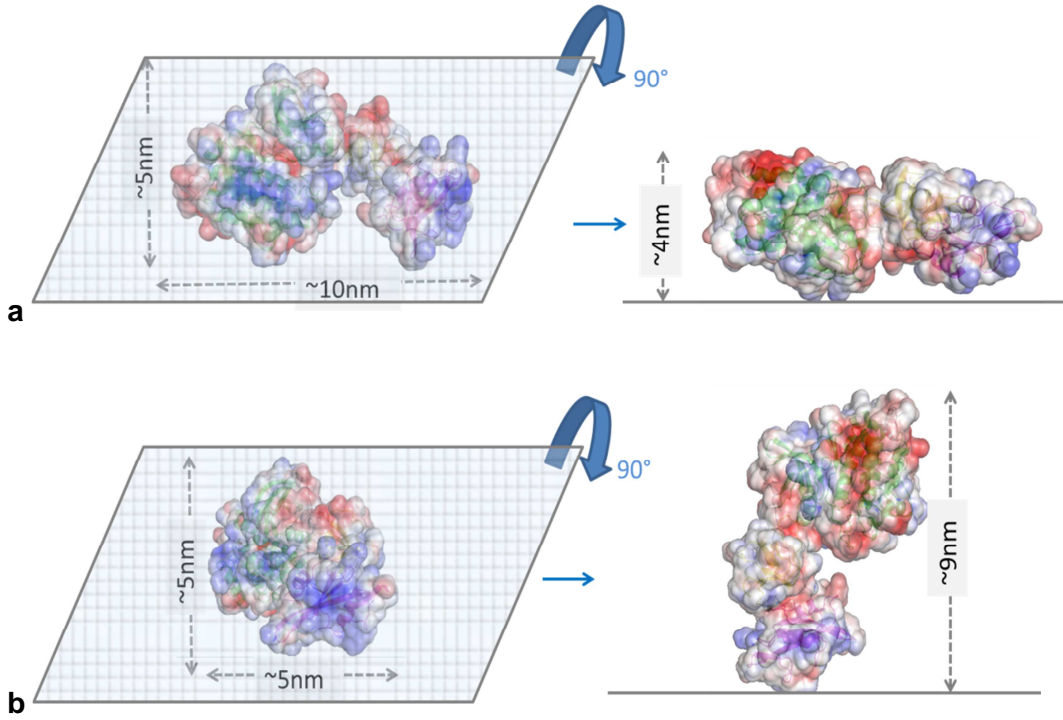
4.1.2 ANM-LD Simülasyonlarının Deneysel Verilerle Birleştirilmesi

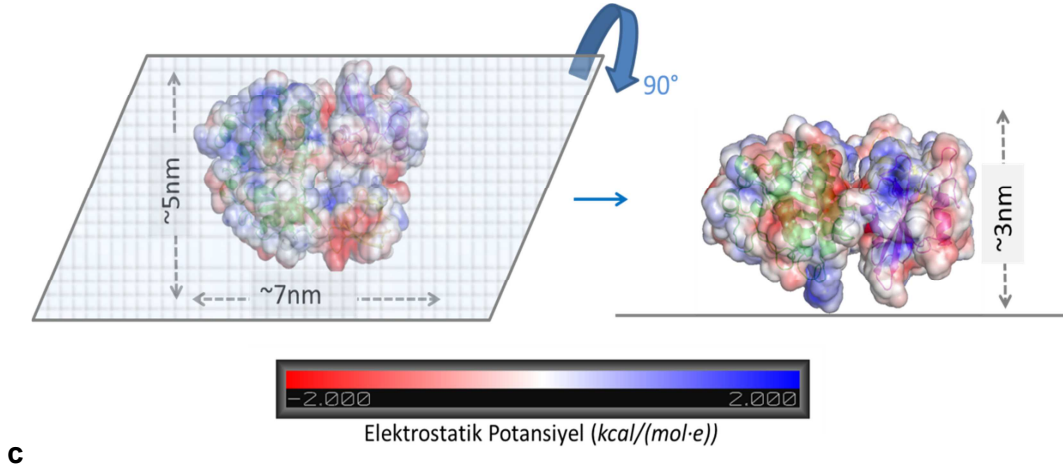
AFM Görüntülerinin Hesapsal Yöntemlere Entegrasyonu İçin Yapılan Ön Çalışmalar

GroEL kompleksi (PDB kodu: 1KP8), c-*Src* kinaz proteini ve BtuCD-F membran sistemi (PDB kodu: 2IQ9) için AFM ile alınacak görüntüleri yorumlayabilmek amacıyla proteinin mika üzerindeki tahmini yerleşimleri, proteinin yüzeyinde yer alan rezidülerin yüksel dağılımı incelenerek değerlendirilmiştir. Rezidülerin yüklerinin belirlenmesi için proteinin elektrostatik potansiyeli ($\text{kcal}/(\text{mol}\cdot\text{e})$) PBEQ Solver (Jo vd., 2008; Im vd., 1998; Jo vd., 2008) çevrimiçi aracı kullanılarak hesaplanmıştır. GroEL, c-*Src* kinaz ve BtuCD-F için elektrostatik potansiyel göz önüne alınarak yapılmış yüzey renklendirmesi ve ölçülebilecek büyüklükler Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13'te verilmiştir. GroEL protein yüzeyinin oldukça negatif olduğu gözlenmiştir. Bu negatif yükün yine negatif yüklü mika yüzeye bağlanmayı zorlaştırabileceği ama elektrostatik kuvvetler dışında yer alan faktörlerle fiziksel adsorpsiyonun gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Ortamdaki tuz miktarı ya da sabitleyici madde kullanımı gibi etmenler GroEL proteininin mika yüzeye tutunmasında etkili olabilir (Leung ve Palmer, 2008). Deney için kullanılan c-*Src* kinaz çözeltisinde aktif ve inaktif formlar bulunabileceğinden her iki form için de hesap yapılmıştır. Aktif formda proteinin pozitif yüklü yüzey bölgeleri özellikle kinaz ve SH2 bölgelerine denk gelmektedir (Şekil 12.a ve b). Bu nedenle negatif yüklü mika yüzeye bu bölgeler üzerinden tutunması tahmin edilmektedir. İnaktif formda ise kinaz bölgesinin yüzeyinde pozitif yüklü rezidüler bulunmaktadır. Bu bölge yüzeye tutunmak için önemli olabilir (Şekil 12.c). Ancak bu yaklaşımın sadece elektrostatik etkileşimleri baz aldığı düşünülmeli, ortamdaki tuz miktarı vs . gibi çevresel koşulların da yüzeye tutunma sürecini etkileyeceği göz önüne alınmalıdır. BtuCD-F membran proteininin farklı kısımlarının BtuCD-F membran sisteminde BtuC'nin asimetric pozitif yüklü halinin proteinin negatif yüklü mika yüzeye bu bölgeden kuvvetli tutunmasına yol açacağı tahmin edilmektedir.

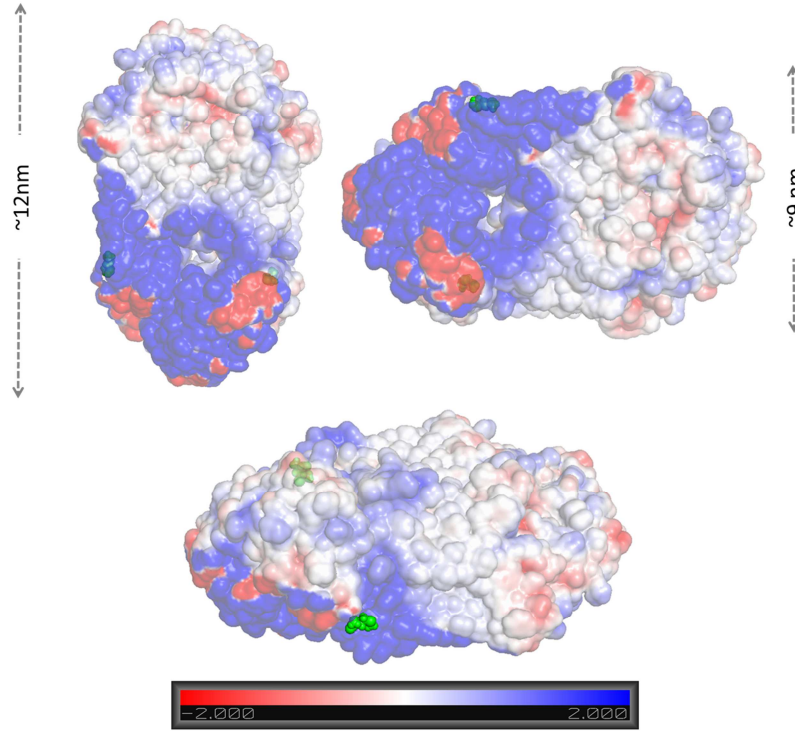


Şekil 11. GroEL kompleksinin elektrostatik potansiyel ile renklendirilmiş yüzey gösterimi. Mavi yüzeyler pozitif yüklü rezidüleri gösterirken, kırmızı yüzeyler negatif renkli rezidüleri göstermektedir. GroEL yüzeyinin çoğunlukla negatif yüklü olduğu anlaşılmaktadır ve bu mika yüzeye etkileşimini sağlayabilir.





Şekil 12. c-Src kinaz proteininin, protein yüzeyindeki pozitif rezidüler baz alınarak gösterilmiş, mika üzerinde olası yerleşimleri. Proteinlerin yüzey renklendirmeleri -2 ve 2 değerleri arasında elektrostatik potansiyel ($\text{kcal}/(\text{mol}\cdot\text{e})$) baz alınarak yapılmıştır. Kırmızı ve mavi bölgeler sırasıyla negatif ve pozitif bölgeler işaret eder. Solda proteinin mika altından bakılarak elde edilebilecek olası görüntüsü, sağda ise mika 90 derece döndürülerek, karşıdan bakılarak elde edilebilecek olası görüntüsü yer almaktadır. Deneysel olarak gözlenmesi beklenen büyüklük değerleri protein gösterimlerinin yanında verilmiştir. **a)** Aktif c-Src kinaz proteini (1Y57) mikaya proteinin kinaz bölgesinin yüzeyi üzerindeki pozitif rezidüler aracılığıyla tutunabilir. **b)** Aktif c-Src kinaz proteini mikaya proteinin SH2 bölgesinin yüzeyi üzerindeki pozitif rezidüler aracılığıyla tutunabilir. **c)** İnaktif c-Src kinaz proteini (2SRC) mikaya proteinin kinaz bölgesinin yüzeyi üzerindeki pozitif rezidüler aracılığıyla tutunabilir.



Şekil 13. BtuCD-F membran kompleksinin elektrostatik potansiyel ile renklendirilmiş yüzey gösterimi. Mavi yüzeyler pozitif yüklü rezidüleri gösterirken, kırmızı yüzeyler negatif renkli rezidüleri göstermektedir. BtuC'nin N-terminalindeki -His işaretleri yeşil renkle gösterilmiştir. Asimetrik elektrostatik potansiyele sahip BtuCD-F membran proteininin BtuC yüzeyinin pozitif yüklü olduğu anlaşılmaktadır ve bu mika yüzeyle etkileşimini artırabilir.

Hedefsiz ANM-LD Simülasyonlarının Temel Bileşen Ekseni Doğrultusunda (Principal Component Axis) Yönlendirilmesi

Elde edilen deneysel veri ve görüntülerde düşük çözünürlük önemli bir problemdir. Özellikle hesapsal örnekleme yöntemlerinde düşük çözünürlük görüntülerden nasıl bir parametrenin geçiş dinamiği için bilgi sağlayacağını kestirmek zordur. Bu nedenle AFM'den elde edilen düşük çözünürlüklü görüntülerden kullanılmak üzere, görüntülerin temel bileşen analizi yapılmış, elde edilen ilk eksenle örtüşen modlar doğrultusunda ANM-LD simülasyonları yönlendirilmiştir.

Deneysel verilerle çalışmadan önce, temel bileşen eksenlerinin başarılı bir kolektif değişken olup olmadığını çalışmak üzere c-src kinazın bilinen kapalı yapısı (2SRC)'nin birinci temel bileşeni ile örtüşen modlar ANM-LD simülasyonlarını yönlendirmek için kullanılmıştır. İlk 72 ANM-LD adımında hedef yapıya 11 Å RMSD civarında yaklaşılabilirken, bu noktadan sonra RMSD düşüş davranışı sonlanmıştır. İnaktivasyona (açık>kapalı) karşılık gelen

konformasyonel değişiklikler bir noktadan sonra diğer temel bileşenlerin hesaba katılmasını gerektiriyor olabilir. Yukarıdaki gözlemler doğrultusunda, temel bileşen eksenlerinin sayısı 2 ve 3'e çıkarılıp, özdeğerleriyle (eigenvalues) orantılı olacak şekilde, bu eksenlerle örtüşen eksenleri oluşturacak yapıları yönlendiren modlar simülasyonlara yönlendirmede kullanılmıştır. Bu temel bileşenlerin de hesaba katılması, iki simülasyonda da 2 Å RMSD'lik bir iyileşme sağlamıştır. Bu nedenle burada iyileştirme etkisinin ikinci temel bileşenden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 14).

Hedefsiz ANM-LD Simülasyonlarının Nihai bir Hacim Değeri ile Yönlendirilmesi

ANM-LD simülasyonları için gereken hedef yapının çözünürlüğünün düşük olduğu durumlarda kullanılmak amacıyla incelenen bir başka kolektif değişken ise hacim bilgisidir. AFM görüntüsünden elde edilen hacim bilgisi, simülasyon sonunda varmak istenilen değer olarak tutulup, bu değere yaklaşılmalarını sağlayan modlar yönünde simülasyon ilerletilmiştir. Ancak elde edilen hedef yapıya RMSD değerlerinin düşmediği gözlenmiş ve tek başına hacim bilgisinin geçiş dinamiğini yönlendirmekte kullanılamayacağı saptanmıştır (Şekil 16). Bu nedenle temel bileşen değişkenleriyle hacim bilgisini birleştirmek faydalı olabilir.

Hedefli ANM-LD Simülasyonlarının SAXS Profilleriyle Birleştirilmesi

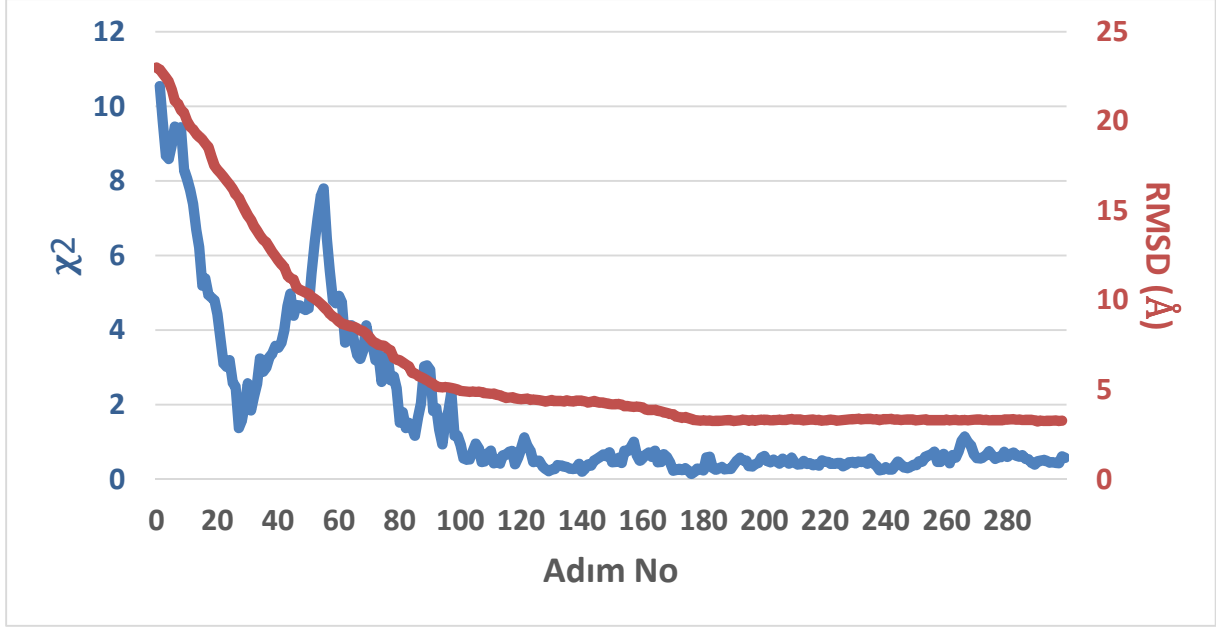
Seçilen deneysel değişkenin ANM-LD yöntemine uyarlanabilirliğinin değerlendirilmesi ve geçiş dinamiğinin örneklenmesinde fiziksel ve biyolojik geçerliliğinin artırılması için, hedef yapıya ilaveten hedef yapıya ya da geçiş dinamiğine dair deneysel veriler simülasyonları yönlendirmede kullanılmıştır.

Hedefli ANM-LD simülasyonlarını yönlendirmek için kullanılan deneysel değişkenlerden biri SAXS dağılım profilidir. Bu yaklaşımda hedef yapının SAXS profiline en çok benzer yapıyı yaratacak olan mod hareketi, başlangıç-hedef yapı arasındaki konum fark vektörüne en çok benzeyen ilk üç mod arasından seçilir. Böylece hem fark vektörü hem de SAXS saçılım profili hesaba katılmış olur. Oluşturulan yapıların SAXS profiline benzerliği χ^2 hesabıyla saptanır. Düşük χ^2 değerleri benzer profillere karşılık gelmektedir. Bu nedenle yaratılan yapılarla χ^2 değerini düşüren modların seçilmesi hedeflenmiştir.

Bu proje için SAXS profilleriyle iyileştirilmiş hedefli ANM-LD simülasyonları c-src kinaz proteini için verilmiştir. Olası SAXS profilleri ve χ^2 değerleri Crysol algoritması kullanılarak hesaplanmıştır. (Svergun vd., 1995)

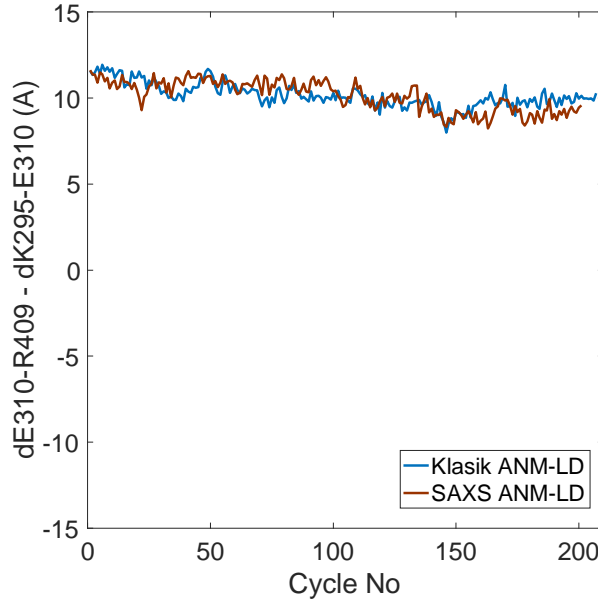
Şekil X'te yukarıda bahsi geçen simülasyonlardan birinde elde edilen yapıların hedef yapı SAXS profilleri arasındaki χ^2 değerinin ve RMSD farkının genel düşüş davranışının ve

sabitlenme noktalarının benzer olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem, iki değişken göz önüne alındığında da hedef yapıya yaklaşıldığına işaret etmektedir. RMSD değişiminden farklı olarak χ^2 değerinin 20-40 ve 80-90 arasında hedef yapıya X-ray saçılma profili açısından oldukça benzerlik gösterdiği ama sonra tekrar uzaklaştığı görülmektedir. Bu yapılar c-Src kinazın aktif ve inaktif yapıları arasındaki arayapılara karşılık geliyor olabilir.



Şekil 14. Oluşturulan yapılar ile hedef yapı SAXS profilleri arasındaki χ^2 değerini ve RMSD'yi ANM-LD simülasyonu boyunca gösteren grafik.

RMSD davranışlarının benzerliğinden, SAXS parametrelerinin eklendiği simülasyonun klasik simülasyonlar gibi hedef yapıya yaklaşılmasını sağladığı gözlenmiştir. Hedef PDB yapısı dışında ikinci bir deney parametresinin simülasyonu yönlendirmek için kullanıldığı düşünülerek, bu ek parametrenin literatürde geçişi özetlediği düşünülen kolektif bileşenlerle tanımlanan fiziksel ve biyolojik tutarlılığını iyileştirip iyileştirmediği incelenmiştir. E310-R409 uzaklığı ile E310-K295 uzaklık farkları literatürde geçiş dinamiğini özetleyen bir kolektif bileşen olarak sıklıkla kullanılmıştır. Bu bileşen üç rezidü arasında oluşan H bağı profiline tekabül etmektedir. Aktif yapıdan inaktife (açıktan kapalıya) geçişte bu uzaklık farkının + değerden – değere geçmesi beklenmektedir. Ancak hem klasik ANM-LD simülasyonları hem de SAXS verileri ile iyileştirilmesi umulan simülasyondan elde edilen uzaklıklar pozitif değerlerde kalmıştır (Şekil Y). Burada hedef yapıyla fark vektörünün hala mod seçiminde daha çok etkili olması hem de kullanılan SAXS verisinin hesapsal olarak modellenmiş olması sebep olmuş olabilir.



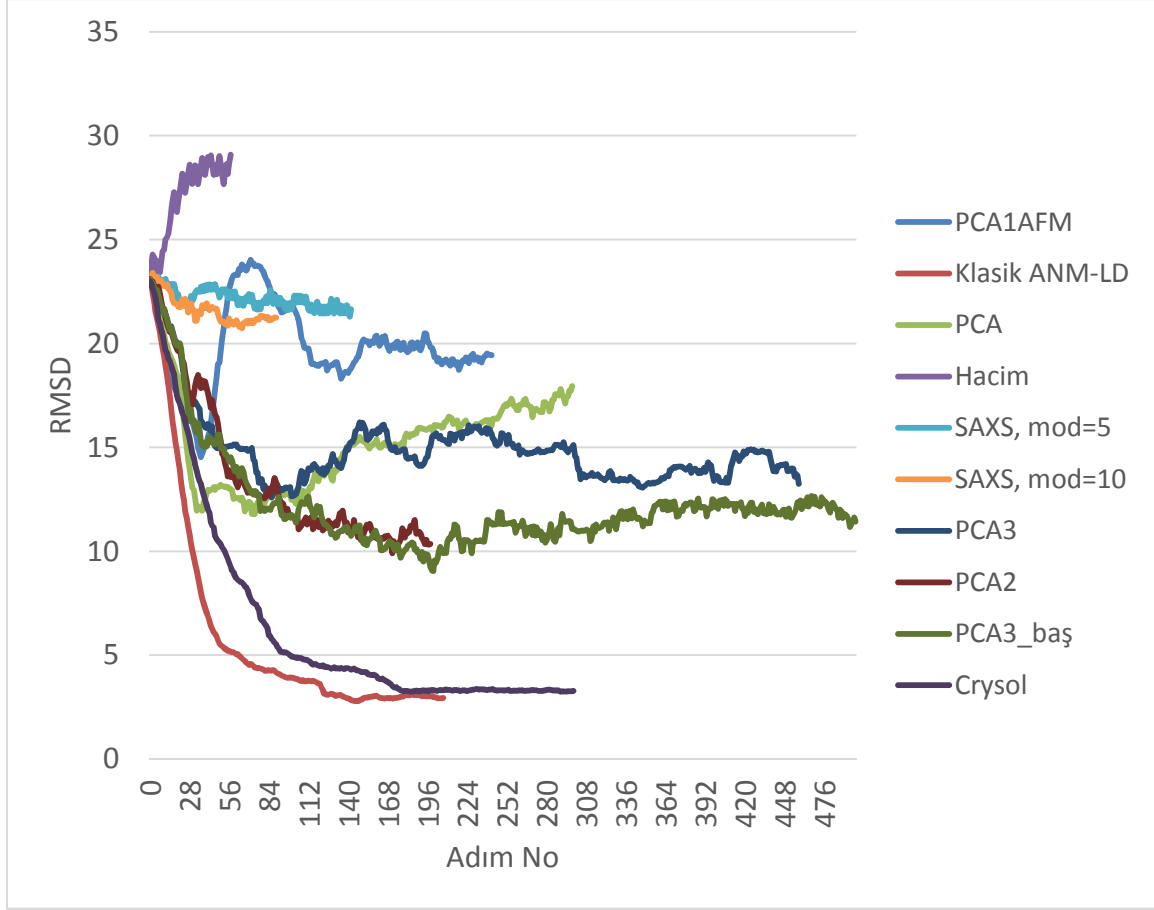
Şekil 15. Literatürde aktif-inaktif yapı geçişini özetlediği gösterilmiş uzaklıkların kolektif değişken olarak kullanılarak simülasyon boyunca gösterdikleri değişimi ortaya koyan şekil.

Ulaştığı RMSD değeri ve kolektif uzaklık değişkeni anlamında ciddi bir fark yaratmasa da, SAXS profillerini hesaba katmak iki yapı arasındaki geçişin farklı patikalardan gerçekleşebildiğini göstermesi açısından faydalı olmuştur. Şekil 16'daki klasik ANM-LD simülasyonu ile crysol simülasyonu arasındaki davranış farkı bahsi geçen bu alternatif geçiş yollarına işaret etmektedir. SAXS profillerinin kullanıldığı simülasyonda geçiş nispeten yavaşlamış, RMSD sabitlemesi gecikmiştir.

Hedefsiz ANM-LD Simülasyonlarının SAXS Profilleriyle Yönlendirilmesi

İşlevsel mekanizmaları ve buna yol açan dinamik özellikleri çalışılan proteinlerin her zaman farklı koşullardaki ya da işlevsel durumdaki üç boyutlu yapılarından elde edilen atomik koordinatlarının bilinmesi mümkün olmamaktadır. Bu gibi durumlarda üç boyutlu yapısı bilinmeyen protein konformasyonunun deneyle gözlenen diğer özellikleri simülasyonları yönlendirmek için kullanılabilir. Bu kısımda, seçilen deneysel parametrenin geçiş dinamik özelliklerini gözlemek için kullanılmaya ne kadar elverişli olduğunu görmek için daha önce simülasyonu yapılan c-Src kinaz açık>kapalı geçişi, kapalı yapısı kullanılmadan incelenmiştir. Ancak ANM-LD simülasyonları bu yapıdan crysol algoritması ile hesaplanan SAXS saçılım profiline, yaratılan arayapıların düşük χ^2 değeriyle benzetilmesini amaçlayan mod seçimiyle ilerletilmiştir. ANM-LD simülasyonları ilk 5 ve ilk 10 yavaş modlar olmak üzere iki farklı mod kümesiyle verilmiş, ancak elde edilen RMSD sonuçları her iki simülasyonda da

başlangıç yapısına kıyasla hedefe sadece 2 Å yaklaşabilmiştir. Buna rağmen χ^2 değerleri 1'in altına düşmüştür. Bu sonuçlar, SAXS profillerinin tek başına simülasyonları yönlendirmede yeterli olmadığını göstermektedir.



Şekil 16. c-Src kinaz proteini üzerinde koşulan, deneysel kısıtlarla yönlendirilmiş ANM-LD simülasyonlarıyla elde edilen RMSD grafiği.

Hedefsiz ANM-LD Simülasyonlarının AFM Görüntülerinden Elde Edilen Değişkenler ile Yönlendirilmesi

Yukarıda bahsi geçen ve c-Src kinaz sistemi özelinde yapılan çalışmalar ile deneylerle elde edilebilecek kolektif değişkenlerin ANM-LD'ye entegrasyonu için uygunluğu değerlendirilmiş, ayrıca ANM-LD kodu farklı deneysel bileşenlerin kullanılabileceği bir formata dönüştürülmüştür. Projenin hedef sistemlerinden olan c-Src kinaz ve BtuCD için, hedef yapıların AFM görüntülerinden elde edilen temel bileşen eksenleri kullanılırken, GroEL içinse hedef yapı ile başlangıç yapısı arasındaki hacim oranından faydalanılmıştır.

c-Src kinaz proteininin inaktif yapısının AFM görüntüsünden elde edilen temel bileşen ekseninin ANM-LD simülasyonunu yönlendirmek için kullanıldığı denemelerde, RMSD 14 Å'a

kadar düşmüştür (Şekil 16). Daha iyi bir geçiş dinamiği örnekleme için farklı kolektif değişkenlerin birleştirilmesinin uygun olabileceği düşünülmektedir.

BtuCD sisteminin apo yapısından BtuF bağlı yapısına ANM-LD simülasyonları sırasında yönlendirilmesinde, BtuF bağlı yapının AFM görüntüsünden elde edilen temel bileşenlerin kullanıldığı durumda ise hedef yapıya yakınlık sağlanamamıştır (RMSD olarak). Bu elde edilen görüntülerin çözünürlüğünün düşük olmasından ve deterjan içinde proteinin kristaldekiye nazaran farklı davranabileceğinden kaynaklanabilir.

GroEL sistemi ile yapılan deneylerde, GroES bağladığında GroEL'in taban çapının yaklaşık 1.5 katına çıktığı görülmüştür, bu hacimde yaklaşık 2.25 kat bir artışa karşılık gelmektedir. Bu nedenle simülasyonlarda GroEL heptamerinden GroEL/S kompleksine yönlendirilmesi için başlangıç hacminin 2.25 katına ulaşmasına izin verecek şekilde mod seçilimi sağlanmıştır. Ancak GroEL heptameri çok büyük bir yapı olduğundan simülasyonlar hala devam etmektedir.

4.1.3. Metadinamik

Bu iş paketi çerçevesinde, proje kapsamında önerilen ANM-LD yönteminin yanısıra hedefe yönlendirilmiş *rmsd* kolektif değişkeninin (*colvar*) kullanıldığı Metadinamik ve ona ilaveten kolektif modlar tarafından yönlendirilmiş CM-BexMetaD (Collective Modes Driven Bşas Exchange Metadynamics) yöntemlerine de yer verilmiştir. ANM-LD ve Metadinamik yöntemlerinin birbirlerine kıyasla farklı avantajları ve kısıtları bulunmaktadır. Proje kapsamında paralel olarak geliştirilmesi planlanmasına rağmen, Metadinamik temelli yöntemlerin ANM-LD yöntemine kıyasla hesapsal olarak daha fazla kaynak gerektirmesi sebebiyle projenin önerildiği şekilde ANM-LD ile devam ettirilmesi kararlaştırılmıştır. Ancak Metadinamik yöntemi ile çalışılmış Adenilat kinaz ve GroEL proteinleri ile ilgili sonuçlara bu raporda kısaca değinilmiştir.

Metadinamik Yönteminin Geliştirilmesi

Metadinamik Temelli Yöntemler

Proteinlerin kararlı konformasyonlarının belirlenmesi ve bu konformasyonlar arasındaki geçiş patikalarının ortaya çıkartılması amacıyla kullanılan bir diğer yöntem de Metadinamik simülasyonlarıdır. Proje kapsamında, bu yöntemin de kullanılması ve deneysel kısıtlar ile geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Metadinamik simülasyonları iki farklı yaklaşım ile devam ettirilmiş ve bunların sonuçları önceki dönemlerde paylaşılmıştır. Bu raporda kısaca Adenilat kinaz ve GroEL proteinlerinin sonuçlarından bahsedilmiş ve yöntemin zorluklarına değinilmiştir.

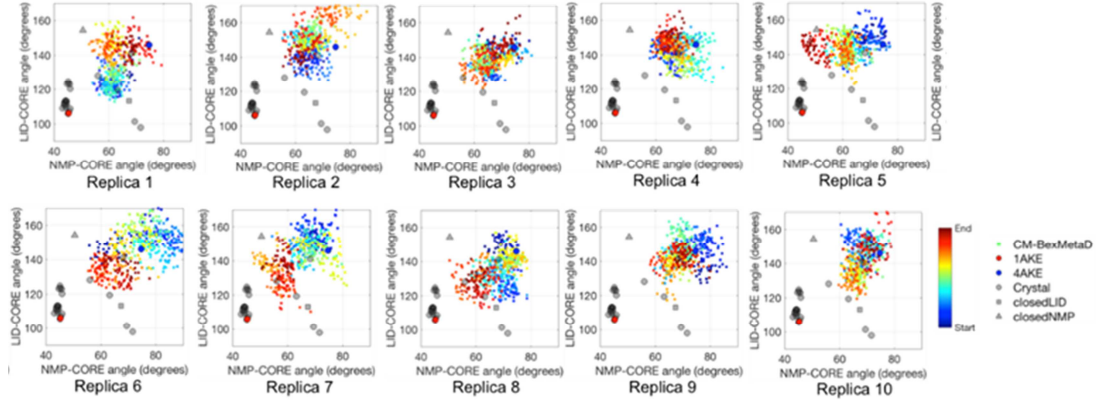
CM-BexMetaD

Metadinamik simülasyonları, ANM-LD yönteminden farklı olarak, çözücü etkileşimlerini de açıkça (explicitly) hesaba katar ve birden fazla farklı değişkenin de sapma (bias) olarak eklenebilmesine olanak verir. Metadinamik simülasyonlarında ANM modlarının sayısı replika sayısını da vermektedir. Her replika, başlangıç yapıdan, her biri ayrı ANM mod yönünde yönlendirilmiş simülasyonları ifade eder. Bu replikalar, metadinamik simülasyonu süresince, rastgele birbirleri ile değişir ve her replika, başlangıçtan farklı ve rastgele seçilen genel bir değişken ile ilerlemeye devam eder.

CM-BexMetaD yönteminden, hedef yapının olduğu durumda çok çalışılan bir sistem olan, adenilat kinaz proteini incelenirken faydalanılmıştır. Tamamen kapalı yapı henüz elde edilememiştir ancak bazı ara yapılar ve yarı kapalı konformasyonlar, simülasyon süreleri çok kısa dahi olsa, belirlenebilmiştir. Simülasyon parametrelerini içeren ayrıntılar ve simülasyon sonuçları Tablo 2 ve Şekil 17'de verilmiştir.

Tablo 2. CM-BexMetaD yönteminde kullanılan simülasyon parametreleri

Gaussian Tümsek Yüksekliği (kcal/mol)	2
Rcut ANM (Å)	18
ANM mod sayısı	10
Total Simülasyon Süresi (ns)	5.6



Şekil 17. AdK proteininin CM-BexMetaD yöntemi ile elde edilen farklı replikalarının LID-CORE (rezidü 179-185 (CORE), 115-125 (CORE-LID) ve 125-153 (LID) arasındaki psödo açı) ve NMP-CORE (rezidü 115-125 (CORE-LID), 90-10 (CORE) ve 35-55 (NMP) arasındaki psödo açı) ve NMP-CORE (rezidü 115-125 (CORE-LID), 90-10 (CORE) ve 35-55 (NMP) arasındaki psödo açı) açılarının, deneysel yapılarla birlikte gösterimi (açı değerleri simülasyon boyunca renklendirilmiştir).

Hedefe Yönlendirilmiş Metadinamik Simülasyonları

GroEL proteinlerinin çözücü etkileşimlerinin açıkça hesaba katıldığı, hedefe güdümlü Metadinamik simülasyonları gerçekleştirilerek, bu proteinlerin konformasyonel uzayları taranarak, açık durumdan kapalı duruma (GroEL için; açık → kapalı, open → closed) geçişleri incelenmiştir. Bu amaçla, genel değişken olarak rmsd değerleri (root mean square deviation; kök ortalama kare sapması) kullanılmıştır. Bu genel değişken ile GroEL proteininin açık olduğu başlangıç noktasından hedef yapı olarak belirlenen, kapalı GroEL monomerine, gitmesi sağlanmıştır. Simülasyonlarda, x-ray kristal yapılar başlangıç yapıları olarak kullanılmıştır. GroEL monomerlerinin açık ve kapalı 1GRU ve 1KP8 kodlu yapıların heptamer halkalarının izole edilmesi ile tanımlanmıştır. Serbest enerji yüzeylerinin (free energy landscape, FEL) saptanması, konformasyonel geçişlerin ve önemli rezidülerin belirlenmesi amaçlarıyla, iki farklı simülasyon, farklı sistem parametreleri kullanılarak, yürütülmüştür. İki simülasyon için de farklı parametreler kullanılması, elde edilen serbest enerji yüzey (FEL) profilleri için örnek olmuştur ve yüksek tepelerin konformasyonel yüzeylerinin (conformational landscape) daha hızlı tarandığını gösterirken minimumun gözlenmesinin daha zor olduğunu anlamasını sağlamıştır. Hem minimizasyon hem metadinamik simülasyonları için NAMD 2.10 ve CHARMM36 kuvvet alanları kullanılmıştır.

4.1.4 Açısal Uzayda Gaussian Ağyapı Modeli

Açısal Uzayda Gaussian Ağyapı Modeli, ilk olarak ANM-LD ile ara yapıları elde edilen adenilat kinaz (AdK) proteini üzerinde uygulanmıştır. Öncelikli olarak kristal yapılar üzerinde çalışılarak iki kristal yapı (açık, kapalı) arasında oluşan büyük açı farklılıklarının bu yapılar üzerinden deşifre edilmesi amaçlanmıştır. Daha sonra iki kristal yapı arasında oluşan ancak kristal yapılar üzerinden elde edilemeyen büyük açı değişiklikleri için ara yapılar üzerinde çalışılmış ve bu büyük açı değişimlerinin ara yapılarda gözlenip gözlenmediği araştırılmıştır. Açı değişiklikleri MATLAB programı kullanılarak hesaplanmıştır. Her mod için menteşe rezidüleri ise HingeProt sunucusu (Emekli vd., 2008) kullanılarak belirlenmiştir.

Adenilat kinaz kristal yapı sonuçları, açık yapının (PDB kodu: 4ake) Gaussian Ağyapı Modeli sonuçlarının, iki kristal yapı arasındaki büyük açı değişikliklerini, birinci, ikinci ve üçüncü modda, büyük ölçüde karşıladığını göstermiştir.

Yapılardaki geçişler sırasında meydana gelen önemli açı değişikliklerini ve yapılardaki menteşe rezidülerini karşıladığı belirlenen bu modelin proteinlerin işlevsel konformasyonel değişikliklerini tanımlamakta kullanılabilecek yeni bir yöntem olduğu söylenebilir. Yönteme ikinci dereceden terimlerin eklenerek, çeşitli istisnai durumların da hesaba katılmasıyla, modelin geliştirilmesi ve buna bağlı olarak daha iyi sonuçlar alınması hedeflenmektedir.

Daha sonra c-Src kinaz proteinine uygulanan bu yöntemin sonuçlarına Bulgular kısmında P4 iş paketi altında yer verilmiştir.

4.2. ABC Taşıyıcı Sistemi Üzerine Çalışmalar

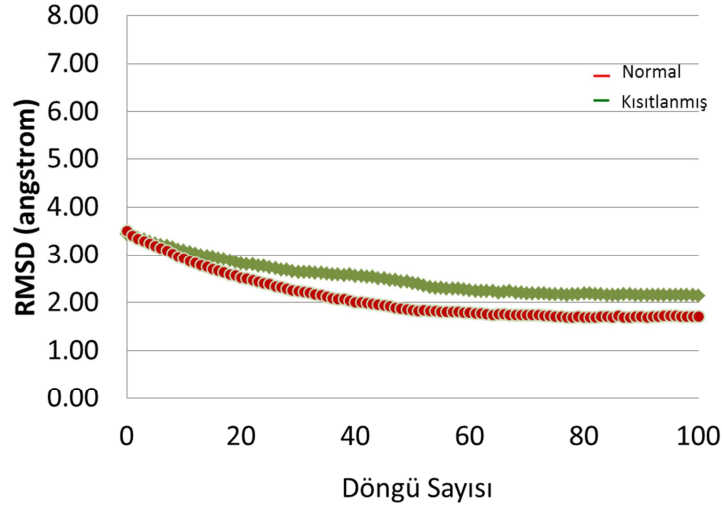
BtuCD proteini hücre zarı içinde yer alan iki BtuC ve sitoplazmada bulunan iki BtuD monomerlerinin oluşturduğu tetramer yapıda bir proteindir. Hücresel işlevi olan B12 vitamini alımını gerçekleştirmek için belirli yapısal ve işlevsel konformasyonlar arasında geçiş yapması gerekmektedir. BtuCD'nin apo, ATP-bağlı, BtuF bağlı, hem ATP hem BtuF bağlı konformasyonlarının kristal yapıları Protein Veri Bankası'nda sırasıyla 1L7V, 4R9U, 2QI9 ve 4FI3 kodlarıyla mevcuttur. Bu çalışma kapsamında bu yapılar arasında klasik ANM-LD simülasyonları verilmiş ve hedef yapılara yaklaşık 1 Å civarında yaklaşılabilmektedir. Elde edilen sonuçlar Nature Chemical Biology dergisinde, Ek 2'de verilen makalede yayınlanmıştır.

4.2.1 Hesapsal Sonuçlar

ANM-LD Simülasyonlarına Hedefli Kısıt Uygulamaları

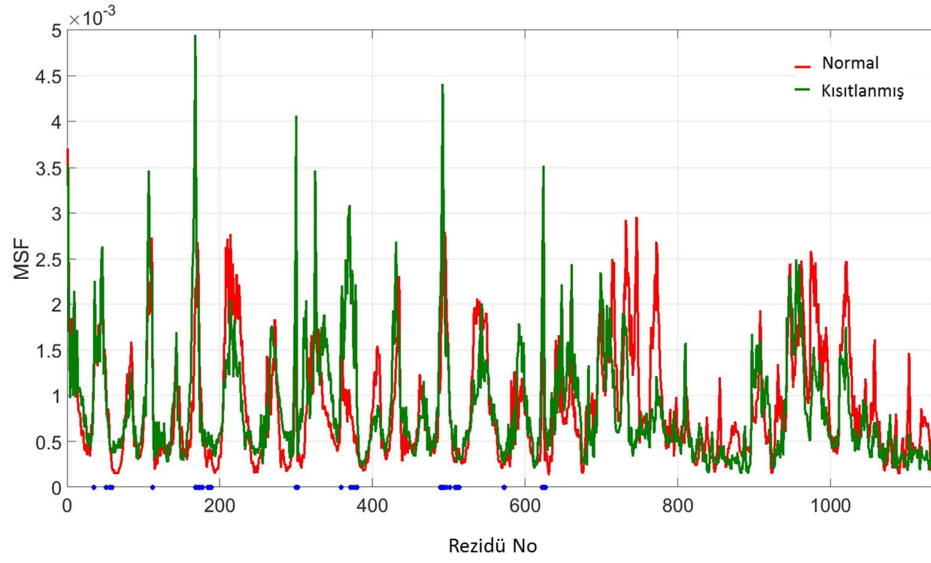
BtuCD aktivitesi ATP varlığına bağlı olduğundan, sisteme ATP bağlanmasının yol açtığı dinamik değişikliklerin anlaşılması işlevsel mekanizmanın belirlenmesi için önemlidir. Bu nedenle, bu proje kapsamında, ANM-LD metodunun geliştirilmesi düşünülerek, 1L7V>4R9U geçişi sırasında en çok seçilen iki ANM mod olan en yavaş 6 ve 7. modların kısıtlandığı yeni simülasyonlar verilmiştir. En çok seçilen modların kısıtlanması, simülasyonun alternatif patikalardan devam etmeye yönlendirilmesi anlamını taşıyabilir. Ayrıca proteinin dinamik özelliklerini anlamak ve manipüle etmek imkanı verdiği için önemlidir.

BtuCD'nin 1L7V>4R9U konformasyon geçişi için, kısıtlanmış simülasyonların RMSD grafiğinde (Şekil 18), normal simülasyonlardan farklı bir geçiş gösterdikleri, geçişi daha zor yapabildikleri ve sonuç olarak ulaşabildikleri minimum RMSD'nin normal simülasyonlara göre nispeten yüksek kaldığı gözlenmiştir. Bu 6 ve 7. modun ATP bağlanmasıyla gerçekleşen konformasyonel değişiklik için önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 18. APO>ATP-bağlı yapı arasındaki geçişte, elde edilen yapılar ile hedef yapı arasındaki RMSD değişiminin normal (kırmızı) ve kısıtlanmış (yeşil) simülasyonlar için gösterimi.

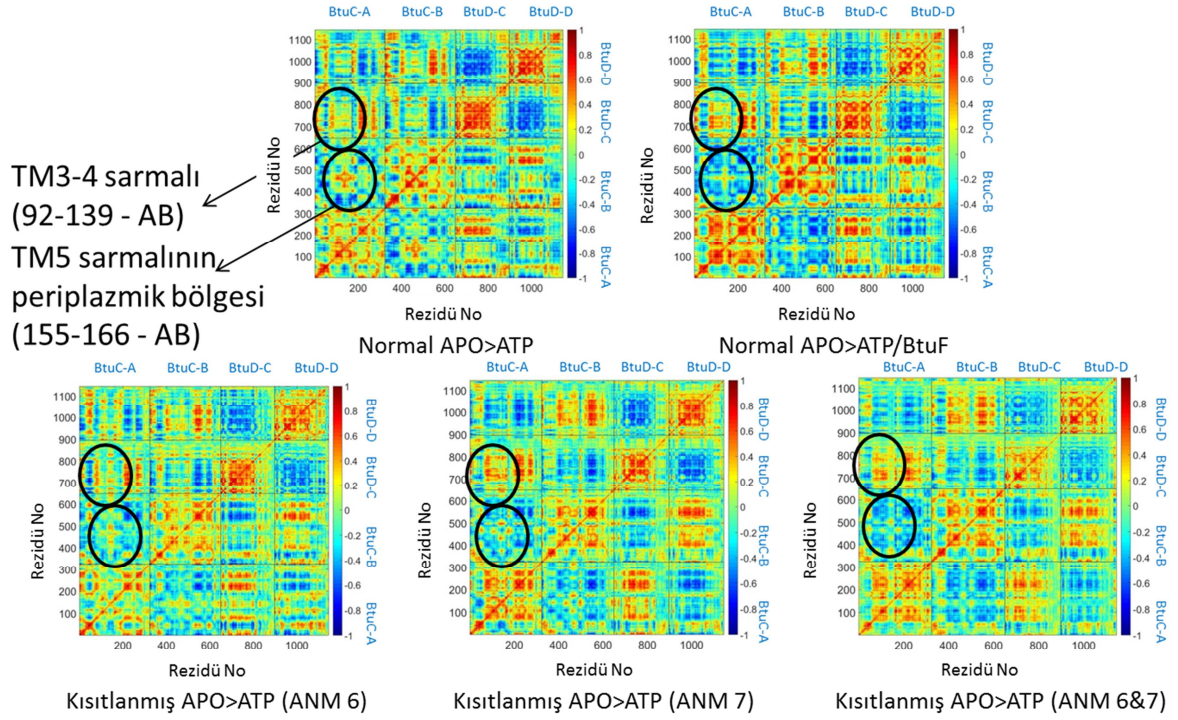
BtuCD proteininin kısıtlanmış simülasyonlar boyunca gösterdiği dinamik dalgalanmalar MSF değerleri (Şekil 19) kullanılarak normal simülasyonlarla kıyaslanmıştır. Kısıtlanmış simülasyonların BtuD zincirlerinde daha az hareket gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle kısıtlanan modların nükleotid bağlanan zincirlerin hareketinden sorumlu olduğu düşünülebilir. Ayrıca kısıtlanan simülasyonlarda bağlama sarmallarının (coupling helix, 218-225 rezidüleri arasında) hareketlerinde azalma, B zincirinde yer alan BtuF bağlama bölgelerinin (rezidüer 35, 47, 51) hareketinde ise artma gözlenmiştir.



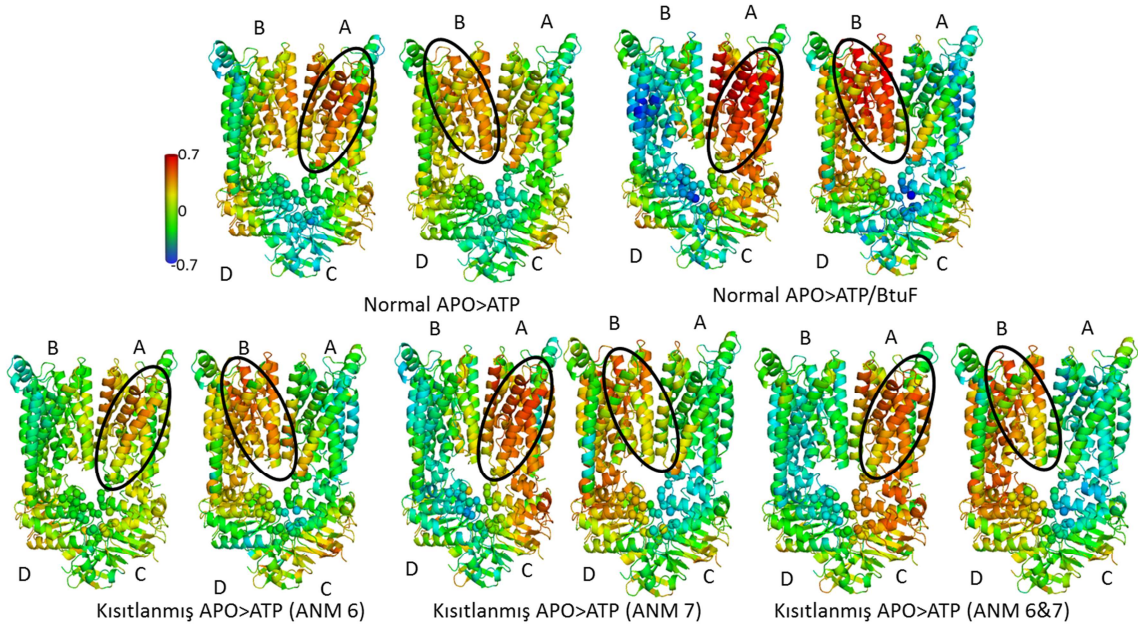
Şekil 19. APO>ATP-bağlı yapı arasındaki geçişe karşılık gelen ortalama kare dalgalanmalar (MSF). Normal simülasyon değerleri kırmızı ile 6 ve 7. ANM modları kısıtlanmış simülasyon değerleri yeşil ile gösterilmiştir.

İlaveten, dinamik çapraz korelasyon grafikleri de normal ve kısıtlanmış simülasyonlar arasında dinamik farklar olduğunu gözler önüne sermiştir (Şekil 9). Kısıtlanmış simülasyonlarda iki BtuC arasındaki korelasyon azalırken, BtuC monomerleri aşağılarındaki BtuD monomeriyle birlikte davranmaya başlar. Değişimin gözlemlendiği bölgeler grafikler üzerinde siyah dairelerle işaretlenmiştir.

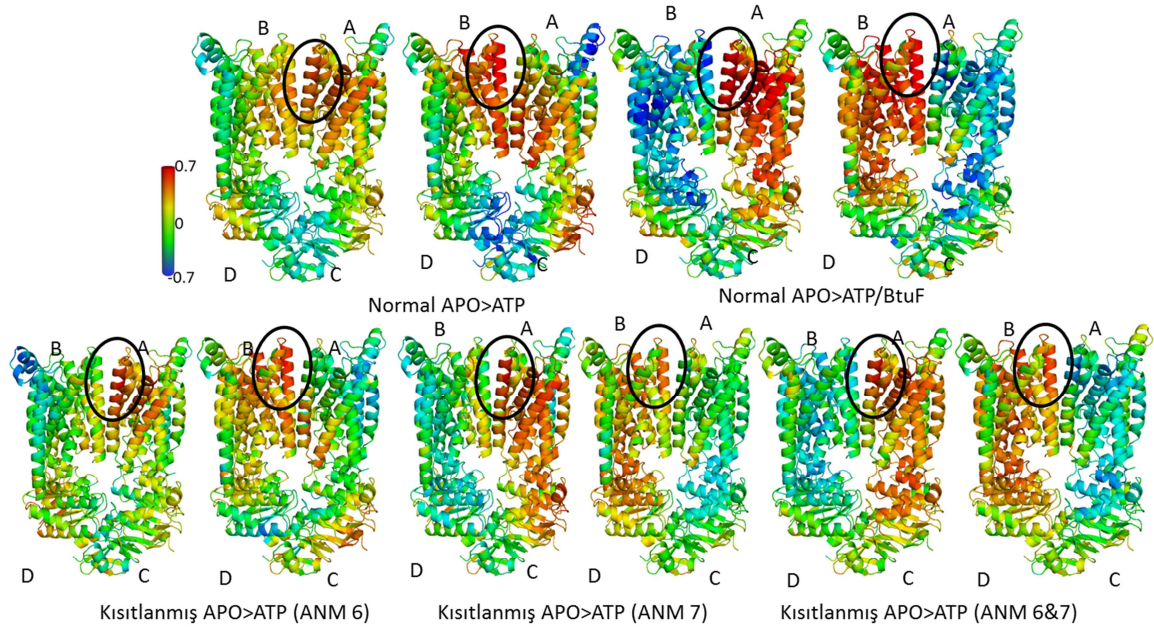
Yukarıda bahsedildiği üzere BtuCD üzerinde uygulanmış kısıtlanmış simülasyonlar, proteini farklı bir davranış göstermeye itmiştir. Belirlenen iki modda hangi protein bölgelerinin nasıl hareket ettiği bize işlev ve dinamik özelliklerin kontrolü açısından bilgi sağlayabilir. Ayrıca belirli modların kısıtlanmasının varılan min RMSD değerini yükseltmesi, geçişte seçilen modların önemini kanıtlamıştır. Ayrıca Şekil X'te verilen korelasyon davranışları ve korelasyon haritalarının genel özellikleri göz önüne alınınca geçen dönem 6 ve 7. modların birlikte kısıtlandığı simülasyondan elde edilen korelasyonlar, APO>ATP normal simülasyonlarından çok APO>ATP/BtuF geçişi normal simülasyonlarına benzemektedir (Şekil 20-22). Ayrıca, bahsi geçen modların ayrı ayrı kısıtlanması dinamik davranışın daha incelikli bir şekilde manipülasyonuna imkan vermiştir. Yalnızca 7. modun kısıtlandığı simülasyonlar APO>ATP/BtuF geçişindeki gibi bir korelasyon davranışı gösterirken, 6. Modun kısıtlanmasının korelasyonlar üzerinde APO>ATP normal simülasyonundan elde edilen sonuçlar üzerinde daha az etkisi olmuştur (Şekil 20-22).



Şekil 20. Normal ve kısıtlanmış APO>ATP simülasyonları ile normal APO>ATP/BtuF simülasyonundan elde edilen dinamik çapraz korelasyon haritaları. Çapraz korelasyon değerlerinin hesabı için RMSD değerinin sabitlendiği döngü sayısına kadar elde edilen patika, geçişin tamamı olarak değerlendirilmek üzere, ilk üçte birlik kısımdaki yapılar kullanılmıştır. Özellikle iki bölgenin korelasyonlarının APO>ATP ve APO>ATP/BtuF geçişleri arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. 1) TM3-4 sarmalının (92-139 rezidüleri – A&B zincirleri) altta kalan ATPaz bölgesiyle korelasyonu 2) A&B zincirlerindeki TM5 sarmallarının periplazmik bölgelerinin (155-166 rezidüleri) birbiriyle gösterdiği korelasyon. Kısıtlanmış simülasyonlarda yalnızca 6. yavaş ANM modunun kısıtlandığı durumda normal APO>ATP davranışından sapma belirgin değildir. Ancak yalnızca 7. yavaş ANM modu ve 6 ile 7. yavaş ANM modlarının birlikte kısıtlandığı simülasyonlarda korelasyon davranışlarının APO>ATP/BtuF geçişine benzediği saptanmıştır.



Şekil 21. APO yapısı üzerinde, 92-139 bölgelerinin (TM3-4 sarmalı, siyah elips ile işaretlenmiştir) A ve B zinciri için ayrı ayrı, diğer rezidüer ile ortalama çapraz korelasyon değerleri renklendirilmiştir. Kırmızı bölgeler yüksek pozitif korelasyon gösteren, mavi bölgeler ise güçlü negatif korelasyon gösteren bölgelere karşılık gelmektedir. Yeşil bölgeler korelasyonun zayıf olduğu bölgelere işaret eder. TM3-4 sarmalı APO>ATP geçişinde altındaki ATPaz bölge ile korelasyon göstermezken, APO>ATP/BtuF geçişinde göstermiştir. Bu açıdan yalnızca 6. yavaş ANM modunun kısıtlandığı simülasyonlar normal APO>ATP geçişiyle benzerlik gösterirken, yalnızca 7. yavaş modun ve 6. ile 7. yavaş modlarının birlikte kısıtlandığı APO>ATP simülasyonları normal APO>ATP/BtuF geçişiyle benzerlik göstermiştir.

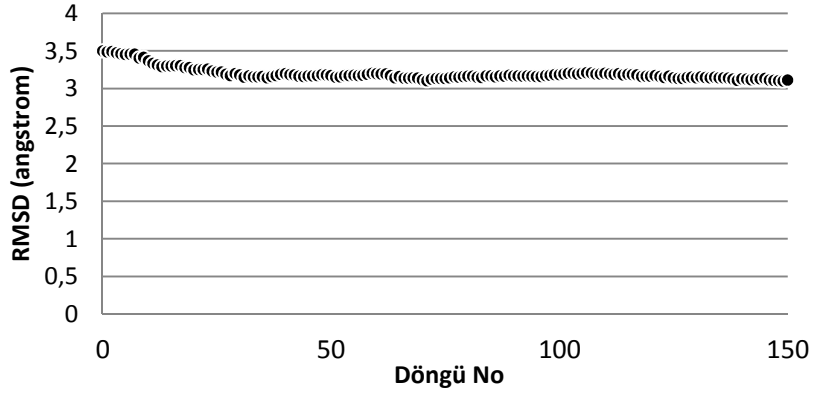


Şekil 22. APO yapısı üzerinde, 155-166 bölgelerinin (TM5 sarmalı) A ve B zinciri için ayrı ayrı, diğer rezidüleri ile ortalama çapraz korelasyon değerleri renklendirilmiştir. Kırmızı bölgeler yüksek pozitif korelasyon gösteren, mavi bölgeler ise güçlü negatif korelasyon gösteren bölgelere karşılık gelmektedir. Yeşil bölgeler korelasyonun zayıf olduğu bölgelere işaret eder. APO>ATP geçişinin normal simülasyonlarında A ve B zincirinin karşılıklı TM5 sarmalları arasında gözlemlenen pozitif korelasyon APO>ATP/BtuF geçişinin normal simülasyonlarında negatif korelasyona dönüşmüştür. APO>ATP'nin tüm kısıtlanmış simülasyonlarında ise yine bu korelasyonun kaybolduğu ve daha çok APO>ATP/BtuF geçişine benzer bir davranış gözlenmektedir.

Geçiş dinamiğinde etkili olduğu yukarıda gösterilen normal modlarını oluşturan menteşe rezidüleri protein işlevinin anlaşılmasına olanak veren mutasyon çalışmaları için hedef belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar Ek 3'te makale taslağı olarak verilmiştir.

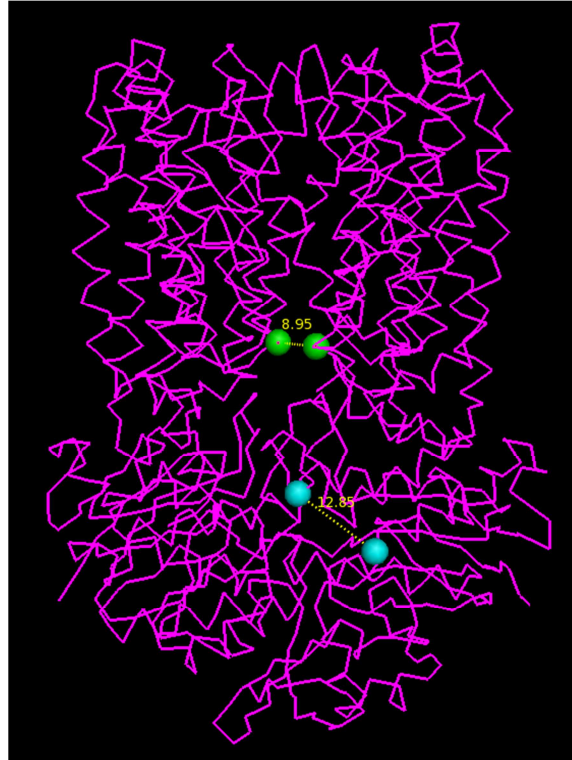
ANM-LD Simülasyonlarına Hedefsiz Kısıt Uygulamaları

BtuCD proteininin Apo-ATP bağlı halleri arasındaki dönüşümünü tanımlamak için temsili olarak seçilen A ve B zincirlerinden 143. rezidüleri arasındaki uzaklık (artan yönde) kullanılarak ANM-LD simülasyonları verilmiştir. Bu şekilde, örneğin FRET (Förster resonance energy transfer) deneylerinden elde edilecek atomlar arası bir veya birden fazla deneysel kısıt kombinasyonu kullanılarak ANM-LD simülasyonlarını yönlendirmek mümkündür.



Şekil 23. APO>ATP geçişi için yalnızca 143A-143B CA uzaklığıyla verilen BtuCD simülasyonundan elde edilen RMSD grafiği.

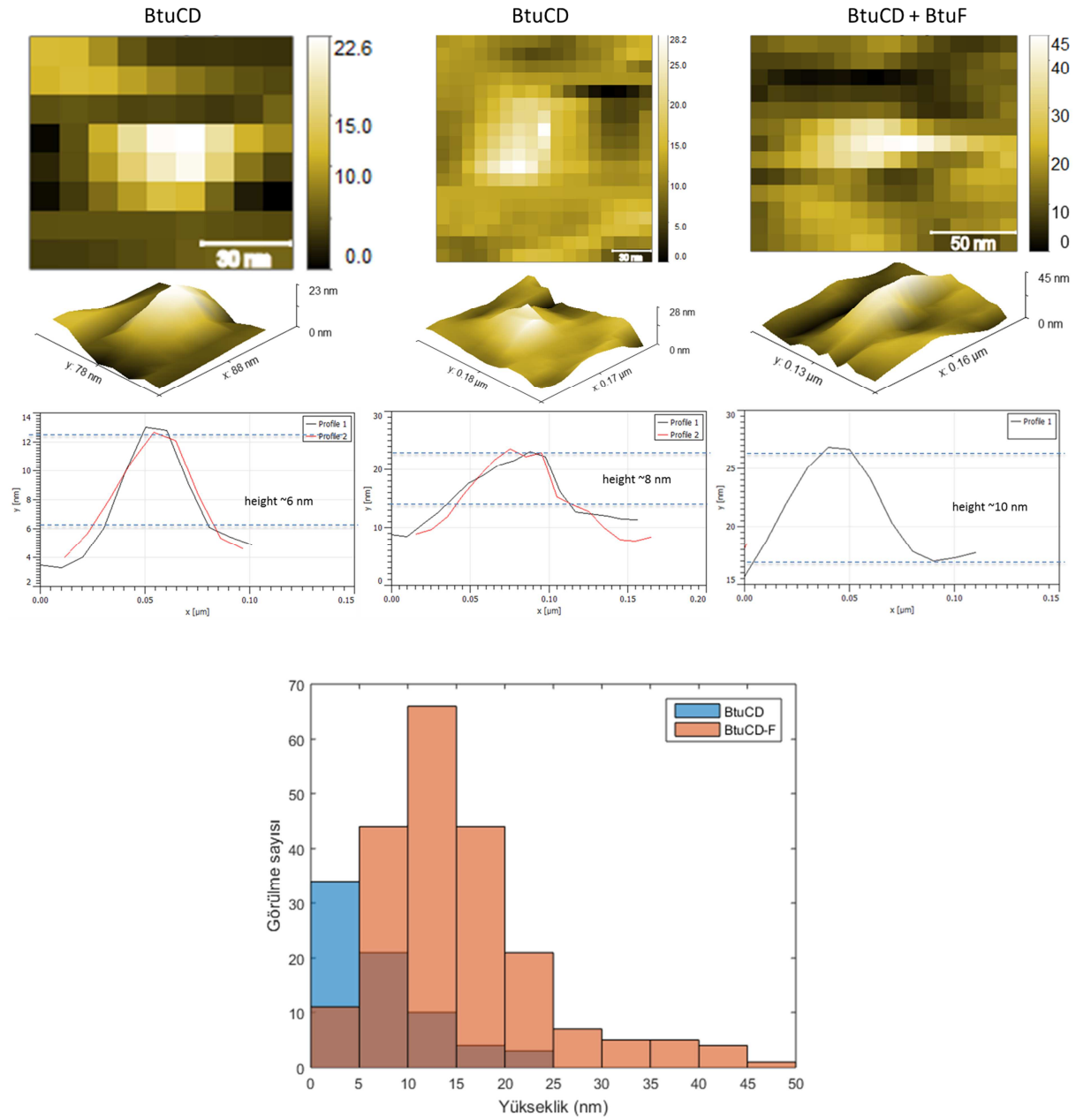
Ancak tek kısıtla (143A-143B CA uzaklığı) verilen simülasyon, konformasyonel geçişi örneklemede yetersiz kaldığı için (simülasyon ile elde edilen yapılar hedef yapının en az 3 Å RMSD yakınına ulaşabilmiştir, Şekil 23) hedefsiz kısıtlandırılmış BtuCD simülasyonlarında (APO>ATP) iki kısıt (143A-143B ve 38C-129D CA uzaklıkları, Şekil 24) kullanılmıştır. Bu sınırlı bir iyileşme sağlamıştır, bu nedenle yeni kolektif değişkenlerin belirlenmesi önemlidir.



Şekil 24. BtuCD sistemi üzerinde, mavi küreler 38C ve 129D rezidülerini, yeşil küreler ise 143A ve 143B rezidülerini göstermektedir. Aralarındaki uzaklık sarı ile Å cinsinden verilmiştir.

4.2.2 AFM Görüntüleme Deneyi Sonuçları

FOS-12 deterjanı içerisinde çözdürülmüş halde satın alınan N-terminalinde -His bağlı BtuC proteini ve BtuD proteini kompleks oluşturmaları amacıyla karıştırılmış ve 30 dakika süreyle taze kesilen mika yüzeyinde inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında uygun PID ve ayar noktası parametreleri kullanılarak farklı AFM temas modu görüntüleme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda BtuCD ve BtuCD-F membran sistemine ait deneyler planlanmış ve Şekil btux'te verilen topografik görüntüler ve yükseklik profilleri elde edilmiştir.



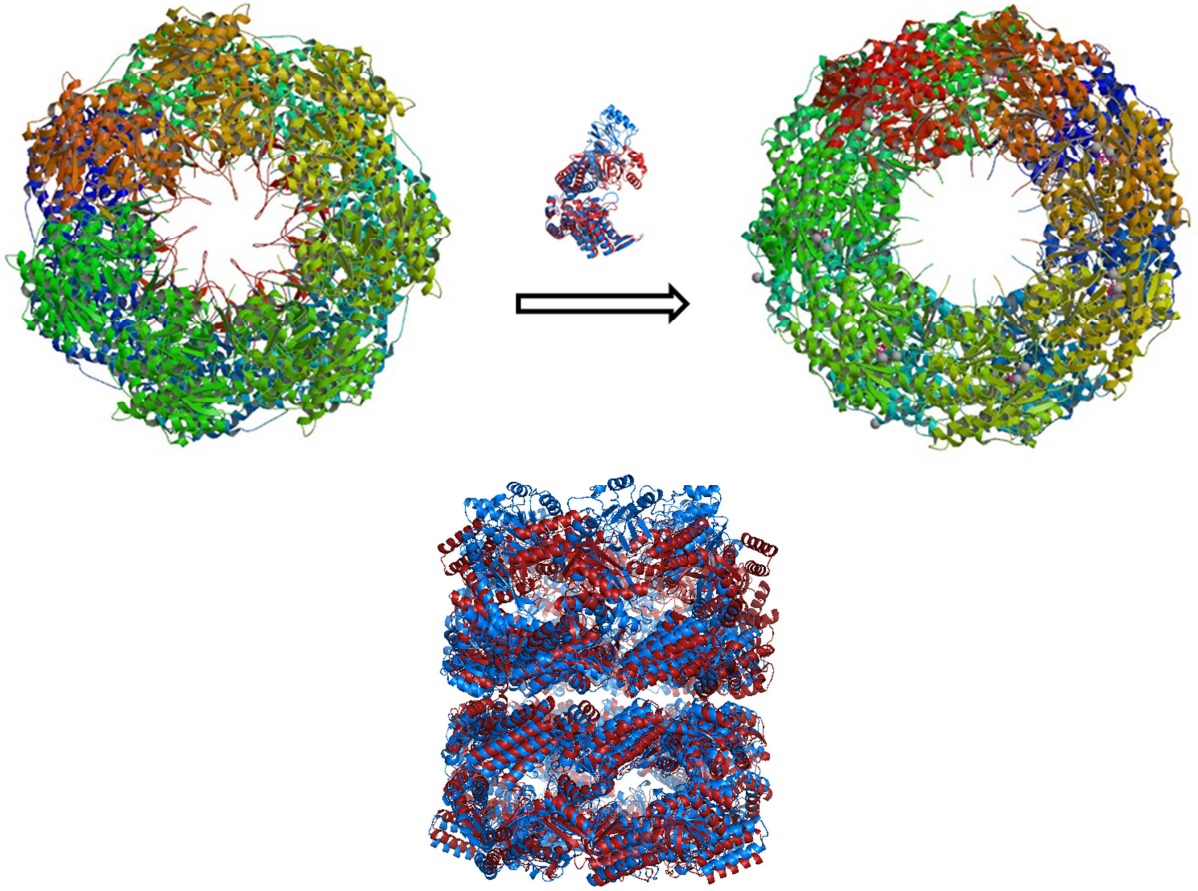
Şekil 25. BtuCD kompleks membran proteininin LDAO deterjan ve Tris tampon çözeltisi içerisinde alınan AFM topografik görüntüleri ve BtuF eklenmesi ile oluşan BtuCD-F kompleksine ait yükseklik profilleri değişimi

BtuCD kompleks proteinine ait AFM görüntülerine ait örnek profiller Şekil 25'te verilmiştir. Buna göre, BtuCD kompleksi yaklaşık 6-8 nm lik yükseklikler verirken, bu yapıya BtuF eklenmesi ile oluşan BtuCD-F kompleks (sağda) proteininde ölçülen yükseklik 10 nm değerine yaklaşmıştır. Histogram analizi de BtuF eklenmesi ile topografik haritada meydana gelen yükseklik artışını net bir şekilde ortaya koymaktadır. Projede AFM deneylerinden elde edilen BtuCD membran proteinine ait topografik görüntülerin temel bileşen eksenleri hesaplanarak ANM-LD simülasyonlarının deney kısıtlarıyla yönlendirilmesi amaçlanmış, bunun üzerine sonuçlar 4.1 başlığı kapsamında tartışılmıştır.

4.3. GroEL-GroES Kompleksi Üzerine Çalışmalar

4.3.1 ANM-LD Simülasyonları:

İki heptamerik (cis ve trans) halkadan (7350 rezidü ve 525*14 zincir) oluşan kapalı/ATP bağlı (Rⁿ/R) *Escherichia coli* GroEL yapısından (1GRU.pdb) başlayarak, açık/ATP bağlı (R/T) GroEL yapısı (1KP8.pdb) hedef alınarak ANM-LD simülasyonları çalıştırılmıştır. Bu amaçla, 1GRU yapısının üst halkası (trans halka) alınarak, 7 ADP, 7 ATP ve GroES molekülleri çıkarılmıştır. 1KP8 yapısının trans halkasından ise ATP molekülleri çıkarılmış ve 1GRU yapısına benzetilmek amacıyla, mutasyonlu olan rezidüler (G13, V126 ve A434), G13R, V126A, A434E mutasyonları ile değiştirilmiştir. İki yapı arasındaki RMSD 48 Å'dur (Bakınız Şekil 26). Ayrıca 524 amino asitten (A2-P525) oluşan GroEL monomerinin açık (Rⁿ) ve kapalı (T) konformasyonları arasındaki konformasyonel dönüşüm yolları hesaplanmıştır (başlangıç RMSD 11.94 Å, enerji minimizasyonu sonrası 11.98 Å).

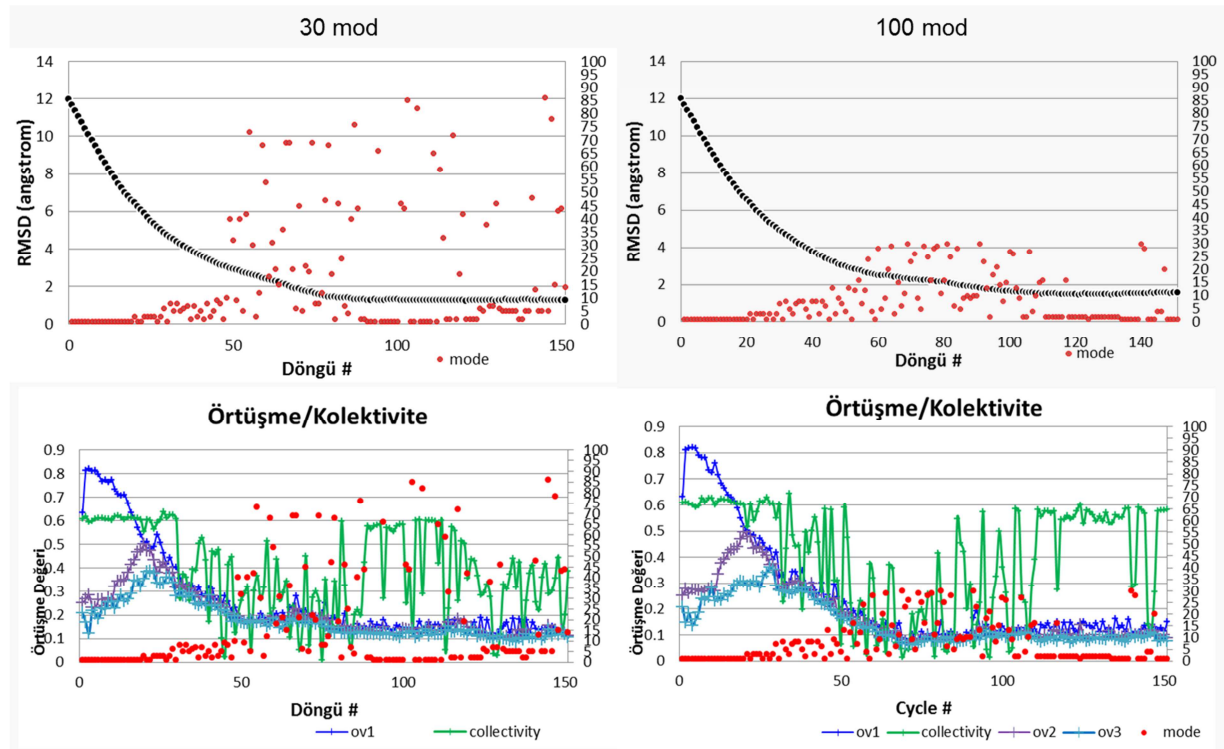


Şekil 26. GroEL'in 1GRU (açık, R") ve 1KP8 (kapalı, T) yapılarının 14'ner ve monomer yapıları verilmiştir, monomer üzerinde açık hal mavi renkle kapalı hal kırmızı ile verilmiştir.

Tablo 3. ANM-LD GroEL simülasyonlarının sonuçları

Sim No	Yön	γ (ps ⁻¹)	Sıcaklık (K)	Adım Sayısı	Maks. Mod Sayısı	İtme Katsayısı, DF (Å)	Başlangıç RMSD (Å)	Ulaşılan RMSD (Å)
1	1GRU - > 1KP8	5	310	100	100	0.4	11.98	1.24 (151 döngü)
2	1GRU - > 1KP8	5	310	100	30	0.4	11.98	1.45 (151 döngü)

ANM-LD simülasyonlarında, 30 ANM modu kullanıldığında hedef yapıya 1.45 Å yaklaşım gözlemlenirken, 100 ANM modu kullanıldığında bu değer 1.24 Å olarak bulunmuştur. Simülasyon parametreleri Tablo 3'te verilmektedir. ANM-LD sonuçları, literatürdeki diğer metotların sonuçları ile karşılaştırıldığında, 3 Å elde eden (Uyar vd., 2014) ve 6.1 Å elde eden (Yang vd., 2009) çalışmalarından daha iyidir. RMSD, örtüşme (overlap) ve kolektivite (collectivity) profilleri 30 ANM ve 100 ANM yavaş modları için Şekil 27'de verilmiştir. Simülasyon başında 0.8 olan örtüşme değerinin, simülasyon sonunda 0.1'e doğru azaldığı gözlemlenmiştir. Her iki simülasyonda da ağırlıklı olarak 1. ANM modunun ilk 20 döngüsünün hedef yapıyla en yüksek örtüşmeyi gösteren mod olduğu görülmüştür.

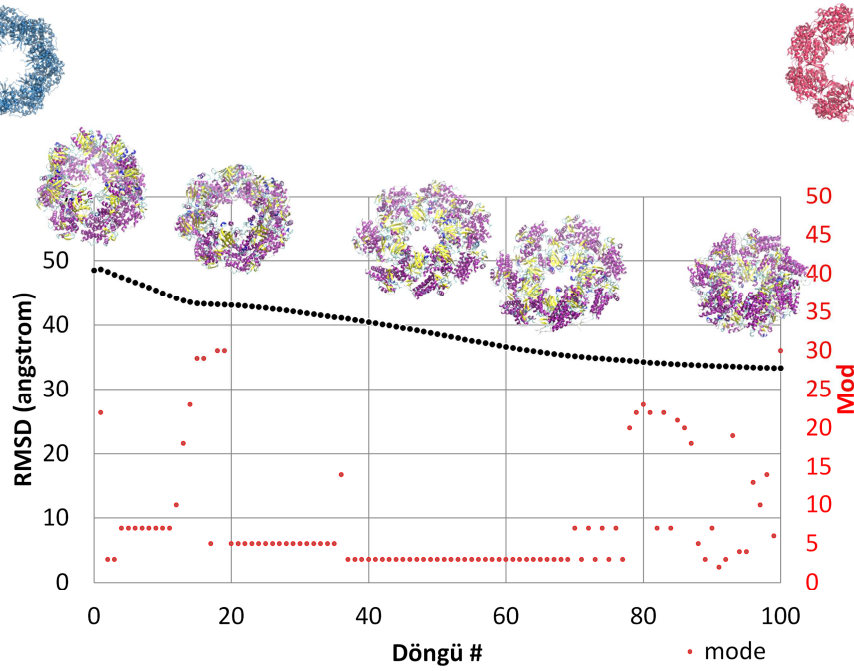


Şekil 27. ANM-LD simülasyonlarındaki ilk 30 ve ilk 100 yavaş ANM modundan elde edilen RMSD ve örtüşme/kolektivite grafikleri.

GroEL halkasının 14mer simülasyonunda, ANM algoritmasındaki özdeğer ayrışımı (eigenvalue decomposition) adımı sırasında $3N \times 3N$ (22050×22050) Hessian matrisi çözümü fazla hesap yükü oluşturduğundan dolayı simülasyonların verimi çok düşmüştür. Bu sebepten ötürü, 7 zincirden oluşan trans halka (3675 rezidü) için simülasyonlar çalıştırılmıştır (Hessian 11025×11025). Buna ek olarak, Hessian matrisi oluşturma adımında, matris seyrek matrise dönüştürülmüştür. Bu aşamada, tekil değer ayrışımı (singular value decomposition)

fonksiyonu yerine svds (svd sparse) fonksiyonu kullanılarak sadece kullandığımız kadar özdeğer hesaplanarak program daha elverişli hale getirilmiştir.

ANM-LD simülasyonları sonucu (DF=0.8 Å ve 30 ANM modu kullanılarak) yolağın analizinden elde edilen RMSD/seçilen modların grafiği ve ara yapılar Şekil 4.x3'te verilmiştir. 3., 5. ve 7. ANM modları, en fazla konformasyonel değişikliğin gözüktüğü ilk 100 döngüdeki en çok seçiler modlardır. Yapının RMSD'si 48 Å'dan 26 Å'a düşmüştür. GroEL'in ANM-LD simülasyonu sırasında RMSD değeri bir platoya ulaşmadığı için sürekli düşmeye devam etmiştir. Bu sebepten ötürü de simülasyonlar durdurulmuştur.



Şekil 28. Hedefli ANM-LD simülasyonlarının ilk 100 döngü için RMSD ve Mod grafiği simülasyondan alınmış ara yapılar (Döngü # 1, 20, 48, 60, 100), başlangıç (mavi) ve hedef (kırmızı) yapılar ile birlikte verilmiştir. (DF=0.8 Å).

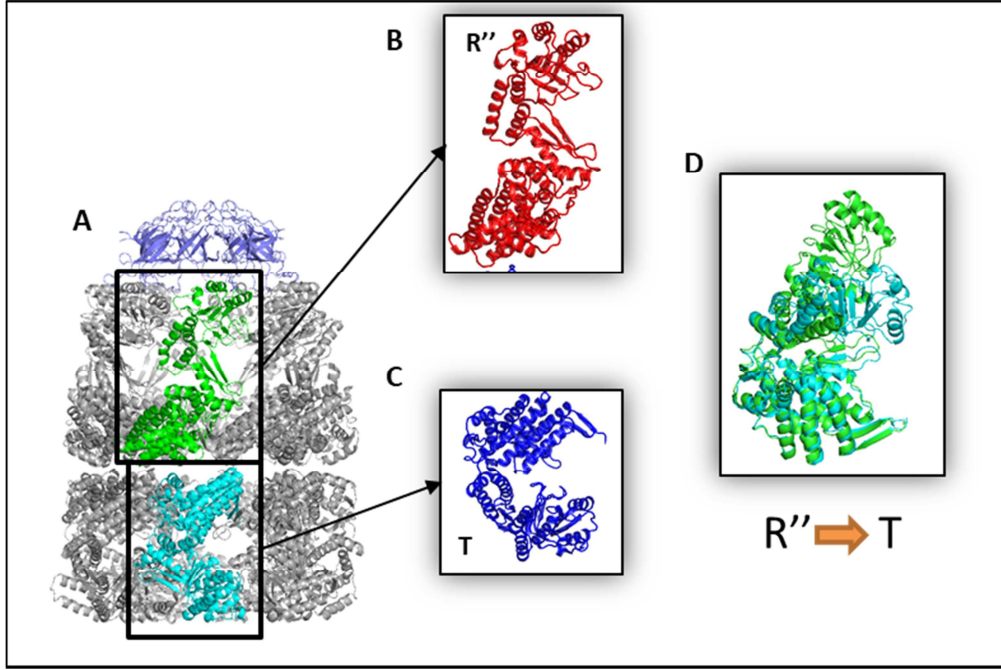
4.3.2 Metadinamik Simülasyonları

Metadinamik simülasyonları, GroEL halkasının tek monomerindeki serbest enerji yüzeylerinin (FEL) hesaplanması için kullanılmıştır. Bu amaçla, farklı parametreler ile iki farklı simülasyon verilmiştir. Bu sayede, konformasyonel geçişleri incelenmiş ve bu geçişler sırasında önemli role sahip olan rezidüler belirlenmiştir. Hedef yapı ile son yapı karşılaştırılmış ve RMSD değişimi gözlemlenmiştir. Buna ek olarak serbest enerji yüzeyindeki (FEL) değişiklikler genel değişkene bağlı olarak incelenmiştir.

Tablo 4. Metadinamik simülasyonlarında kullanılan parametreler

GroEL proteini MetaD Run1	colvar	Total simülasyon süresi (ns)	20
	rmsd	Alt sınır (lower boundary) (Å)	0.1
		Üst sınır (upper boundary) (Å)	30.0
		Genişlik (width)	2.0
		Tümsek yüksekliği (hill weight)	0.5
GroEL proteini MetaD Run2	colvar	Total simülasyon süresi (ns)	30
	rmsd	Alt sınır (lower boundary) (Å)	0.1
		Üst sınır (upper boundary) (Å)	60.0
		Genişlik (width)	0.5
		Tümsek yüksekliği (hill weight)	0.1

Metadinamik simülasyonları sırasında, GroEL proteinin 1GRU PDB kodlu açık yapısı (R") kullanıldı. ANM-LD simülasyonlarında olduğu gibi, hedef yapı 1KP8 PDB kodlu kapalı (T) yapı olarak seçilmiştir. Açık yapıdan kapalı yapıya geçiş sırasında oluşan mekanizmaların incelenmesi amaçlanmıştır (Şekil 29).

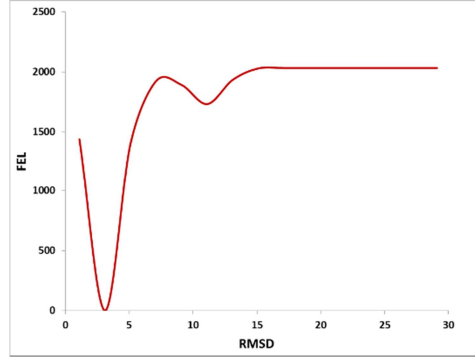
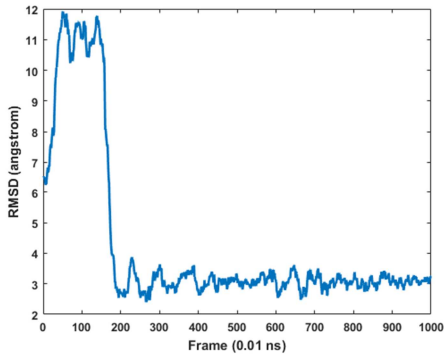


Şekil 29. GroEL kompleksi (PDB ID: 1GRU), A) GroES yardımcı şaperonu bağlı ikili GroEL heptamer halkaları, B) GroEL heptamerinin GroES'e bağlanan halkası (açık yapı). C) GroEL heptamerinin bağlı olmayan hali (kapalı yapı). D) GroEL monomerinin R'' (açık) ve T (kapalı) yapılarının üst üste hizalanması sonucu elde edilen görüntü (RMSD = 11.45 Å)

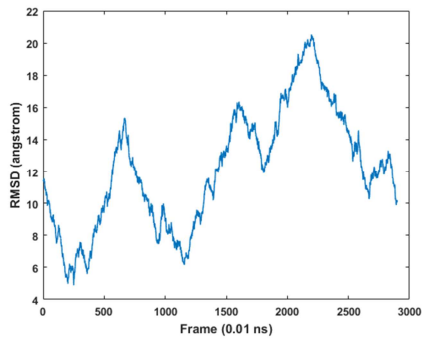
GroEL monomerinin T kapalı yapısından R'' açık yapısına geçişindeki konformasyonel değişimler incelenerek, serbest enerji düzeyi ve referans yapıya göre RMSD değerleri grafik halinde verilmiştir. 20 ns ve 30 ns süreli simülasyonlarda yapının referans yapıya doğru yaklaştığı gözlemlenmiştir (Minimum RMSD = 2.397 Å ve 4.883 Å). Enstantane yapıların RMSD ve FEL grafikleri Şekil 30'da gösterilmiştir. Verilen iki simülasyon arasında, ikinci simülasyon daha geniş bir üst limite sahiptir ve bu simülasyonda 10-15 RMSD bölgesindeki minimum enerjili bölge, birinci simülasyonda tam olarak ayırt edilememesine rağmen belirlenmiştir ve Şekil 30-D'de gösterilmiştir. RMSD değerlerinin simülasyon boyunca farklılık göstermesi farklı konformasyonların oluştuğunun kanıtıdır. Bu bilgiler ışığında, ilk simülasyonda enerji bariyerinin aşılması daha mümkün olarak gözükmesine rağmen, teorik parametrelerin yüksek olmasından kaynaklı olarak gerçekleşmemiştir (Şekil 30-B).

A

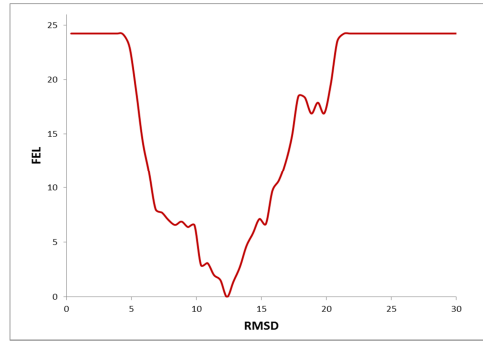
B



C



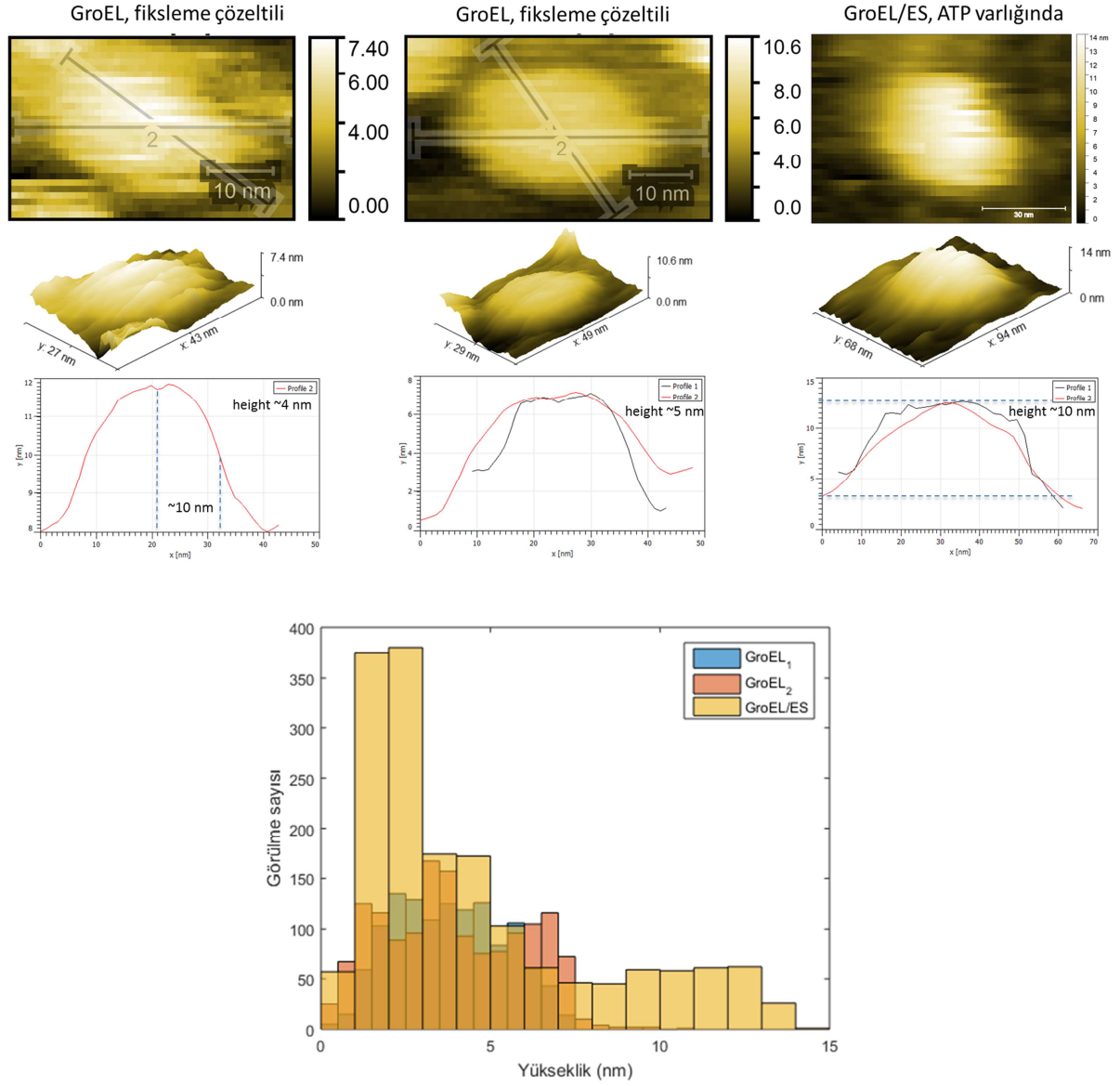
D



Şekil 30. GroEL monomerinin açık yapıdan başlayarak kapalı yapıyı hedeflediği MetaD simülasyonlarının sonuçları (20 ns'lik simülasyonun son 10 ns'lik bölgesi) A) RMSD sonucu, B) Serbest enerji yüzeyi (30 ns) C) RMSD sonucu, D) Serbest enerji yüzeyi

4.3.3 AFM Görüntüleme Deneyi Sonuçları

Kuru toz halde satın alınan GroEL ve GroES proteinleri kullanılarak farklı AFM temas modu görüntüleme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kütlece %2.5 glutaraldehit yüzey fiksleme çözeltisinin kullanıldığı ve kullanılmadığı deneyler planlanmış ve GroEL, ATP'li ve ATP'siz GroEL/ES kompleks şaperon sistemi AFM görüntüleri elde edilmiştir. GroEL ve GroEL/ES/ATP deneylerinden güzel topografik görüntüler elde edilmiş ve AFM temas modu deney sonuçlarına aşağıda değinilmiştir.



Şekil 31. GroEL kompleks şaperon proteinin AFM topografik görüntüleri ve GroES/ATP eklenmesi ile oluşan GroEL/ES kompleksine ait yükseklik profilleri değişimi

GroEL/ES kompleks proteinine ait AFM görüntülerine ait örnek profiller Şekil 31'de verilmiştir. Buna göre, GroEL şaperon proteini yaklaşık 4-5 nm lik yükseklikler verirken, bu yapıya GroES eklenmesi ile oluşan GroEL/ES kompleks (sağda) proteininde ölçülen yükseklik 10 nm değerine yaklaşmıştır. Histogram analizi de GroES/ATP eklenmesi ile topografik haritada meydana gelen yükseklik artışını net bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu deneylerden elde edilen topografik görüntünün GroES eklenmesi ile oluşan hacim farkı bilgisi simülasyon

yöntemine entegre etmek amacıyla kaydedilmiş ve simülasyonları yönlendirmede kullanılmıştır.

4.4 c-Src Kinaz Proteini Üzerine Çalışmalar

4.4.1 Hesapsal Çalışmalar

c-Src kinaz sistemi inaktif ve aktif yapısının (sırasıyla 2SRC ve 1Y57) bilinmesi, bu yapılar arasında 23 Å RMSD gibi büyük bir fark olması ve açılma-kapanma gibi özetlenebilecek nispeten basit bir dinamik davranışı barındırdığından ANM-LD simülasyonlarıyla çalışmak için oldukça elverişlidir. Bu nedenle 4.1 başlığı altında tartışılan çoğu algoritma değişikliği c-Src sistemi ile değerlendirilmiştir. Bu başlık altında da, c-Src sisteminin dinamik özelliklerine dair bahçi geçen simülasyonlardan elde edilen sonuçlar, ANM-LD Simülasyonlarına Hedefli Kısıt Uygulamaları, ANM-LD Simülasyonlarına Hedefli Kısıt Uygulamaları ve ANM-LD Simülasyonlarına In-Silico Mutasyon Uygulamaları altbaşlıkları altında özetlenmiştir.

ANM-LD Simülasyonlarına Hedefli Kısıt Uygulamaları:

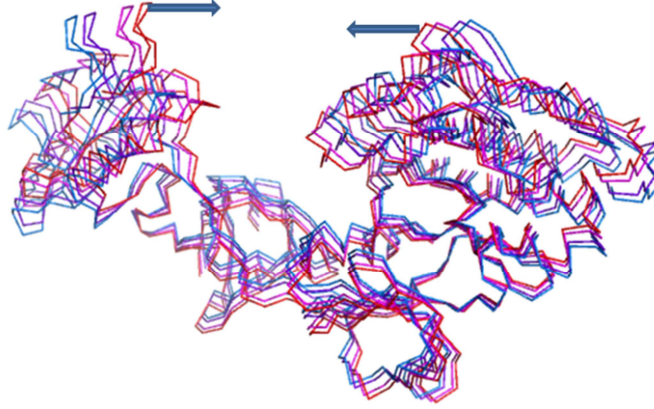
Bu proje kapsamında c-Src kinaz ile yapılan klasik ve hedefli kısıt uygulanmış ANM-LD simülasyonlar Tablo 5'te özetlenmiştir. Hedef yapıya kıyasla RMSD değeri 4 Å'ten düşük olduğundan hedef topolojiye ulaşıldığı düşünülmektedir.

Tablo 5. c-Src kinaz proteini ile gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonlarının özeti.

Simülasyon Yönü	Paralel Sim. Sayısı (Bu Dönem)	Ulaşılan Min RMSD (Bu Dönem)
İnaktif -> Aktif – WT	20	2.98 Å
Aktif -> İnaktif – WT	7	2.79 Å
İnaktif -> Aktif – WT (1 ve 6. en yavaş ANM modları kısıtlanmış)	4	16.04 Å
İnaktif -> Aktif – R95W	5	14.50 Å
Aktif -> İnaktif – R95W	2	2.81 Å
Aktif -> İnaktif – WT	1	22.46 Å

(1, 2 ve 4. en yavaş ANM modları kısıtlanmış)		
İnaktif -> Aktif - R95W+D117N	1	14.10 Å
Aktif -> İnaktif – R95W+D117N	1	5.33 Å
İnaktif -> Aktif - R95W+D117N+L124N	1	14.42 Å

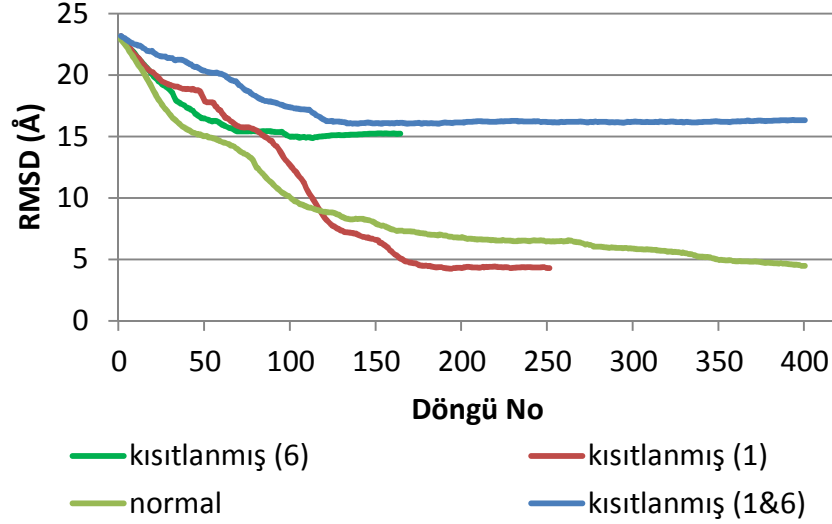
Bu çalışmada aktif>inaktif geçişi için modları kısıtlanmış simülasyonlar verilmiştir. Bu geçişte en çok seçilen üç mod 1, 2 ve 4. en yavaş ANM modlarının kısıtlanması sonucu, geçişin engellendiği ve hedef yapıya yaklaşamadığı görülmüştür. Birinci mod, SH3 ve katalitik bölgenin birbirine doğru kapanmasından sorumlu kolektif bir hareket yaparken büyük ölçüde aktif>inaktif geçişinin temel hareketini oluşturur (Şekil 32) 1, 2 ve 4. modun ise bu bölgelerin ve SH2 bölgesinin rotasyonlarını sağlayarak geçişi optimize edebileceği gözlenmiştir (Eyal vd., 2006).



Şekil 32. 1. mod yönünde oluşan dalgalanmaların 1Y57 yapısının o mod yönünde deforme edilmiş yapılarıyla gösterilmesi. Modun aktif>inaktif yapıları arasındaki geçişe yaptığı etki ok ile gösterilmiştir

Ayrıca, c-Src sisteminin inaktif>aktif konformasyonel geçişinde çok seçilen yavaş modlar olan 1 ve 6 da, modların hem birlikte hem de bireysel olarak kısıtlandığı ANM-LD simülasyonlarıyla çalışılmıştır. 6. modun engellenmesi, birlikte yapılan kısıtlamadan daha az olsa da geçişin tamamlanmasını engellemiş ve RMSD 15 Å civarında sabitlenmiştir. Ancak 1. modun engellenmesi ulaşılan RMSD değerini çok etkilememiştir. Bununla birlikte RMSD

grafiğinde de görüldüğü gibi dinamik davranışı değiştirdiği gözlenmiştir. 6. modun 1. moddan daha çok seçildiği göz önüne alınarak geçiş için daha önemli olduğu düşünülebilir. Ancak 1. modun engellenmesinin sebep olduğu dinamik değişiklikler geçişi engellemese de dinamik farklılıklar nedeniyle işlevsel değişikliklere sebep olabilir.



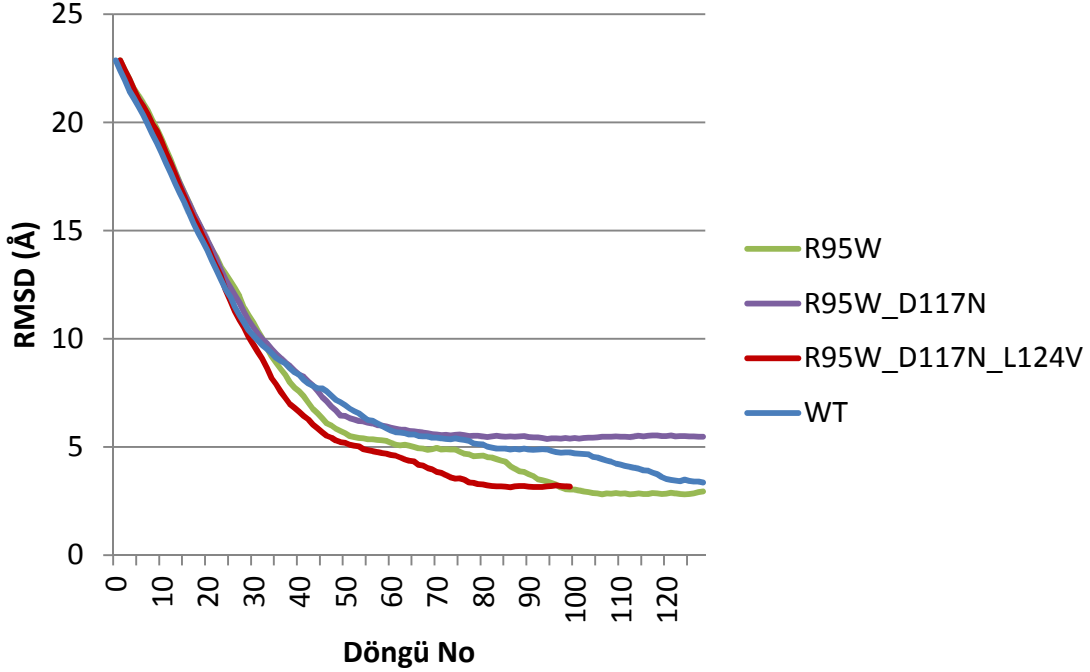
Şekil 33. c-Src kinaz sisteminde inaktif>aktif geçişinin normal ve kısıtlanmış ANM-LD yöntemiyle simülasyonundan elde edilen RMSD değerleri.

ANM-LD Simülasyonlarına *In-Silico* Mutasyon Uygulamaları

ANM-LD simülasyonlarının olası mutasyonların sistemleri dinamik nasıl etkilediğini çalışmaya olanak sağlayıp sağlamayacağı, mutasyonla oluşan farklılıkların tespit edilip edilemeyeceğinin saptanması için, bu proje kapsamında in silico mutant yapılarla ANM-LD simülasyonları koşturulmuştur. Verilen simülasyonlar Tablo 5'te gösterilmiştir.

İnaktif -> aktif geçişi için R95W mutant yapısının simülasyonlarıyla elde edilen son yapının hedefe uzaklığı 14.5 Å değerinde kalmıştır. Doğal formdan elde edilen sonuçlarla fark gösteren bu gözlem, R95W mutasyonunun inaktif>aktif geçişini büyük ölçüde etkilediğini göstermektedir. Ayrıca protein aktivitesini kümülatif olarak artırdığı bilinen (Miyazaki vd., 1999) R95W, D117N, L124N mutasyonları R95W+D117N ve R95W+D117N+L124N formlarında denenmiştir. İnaktif>aktif geçişi için elde edilen RMSD'lerin tek mutant yapısıyla elde edilen RMSD'den farklı olmadığı gözlenmiştir. Aktif>inaktif geçişi için ise R95W+D117N mutantında ulaşılan RMSD'nin doğal yapı ve R95W mutantına kıyasla arttığı gözlenmiştir. Aktif>inaktif geçişi içinse, Şekil 34'e göre R95W tekli mutasyonu ile, R95W&D117N&L124V üçlü mutasyonunun (üçlü mutasyon tekli mutasyondan daha fazla etkili olmak üzere) doğal (WT) forma göre inaktivasyon sürecini kolaylaştırdığı görülmektedir. İkili R95W&D117N

mutasyonunda ise inaktivasyon sürecinin (görülen daha yüksek RMSD sebebiyle) nispeten kısıtlandığı gözlenmektedir. Bu gözlemler farklı mutasyonların kümülatif etkisinin bir göstergesi olabilir, ancak simülasyonların paralel çalışmalarıyla tekrarlanması gerekmektedir.



Şekil 34. c-Src kinazın doğal (WT) ve mutant formları (R95W, R95W&D117N, R95W & D117N & L124V) ile ANM-LD kullanılarak elde edilen RMSD değerleri.

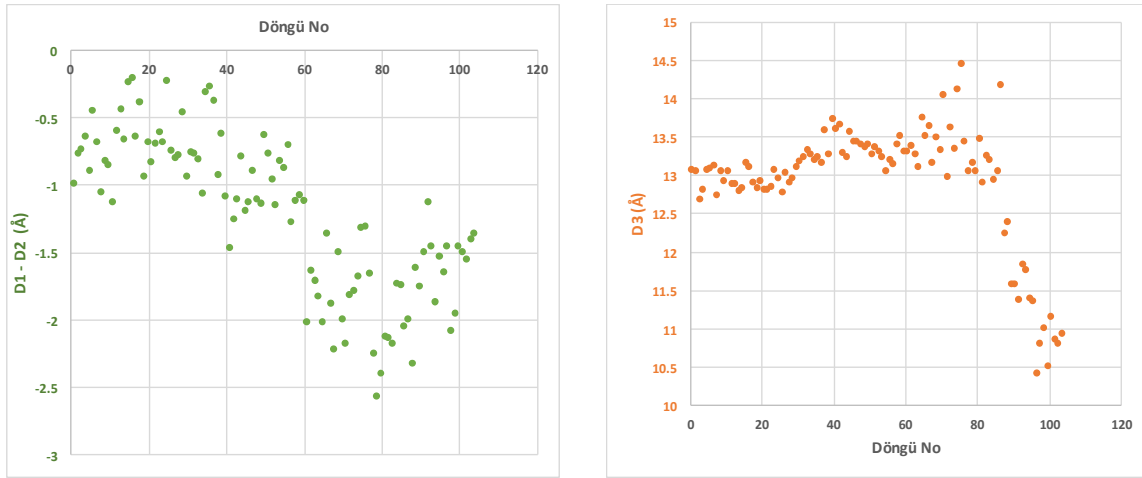
ANM-LD Simülasyonlarına Hedefsiz Kısıt Uygulamaları:

Bu proje kapsamında proteinlerin konformasyonel dönüşümünü tanımlayan belirli atomları arasındaki uzaklık ve/veya atomlarının koordinatlarının merkezini temel alarak tek bir sayıyla proteinin uzayda kapladığı alanı ifade etmek için kullanılan jirasyon yarıçapı kısıt olarak kullanılarak, dönüşümü tanımlayan ölçüte uygulanacak kısıtlara uyan ANM modlarıyla yönlendirilmiş hedefsiz kısıtlı ANM-LD simülasyonları gerçekleştirebilmek için ANM-LD yönteminde revizeler yapılmıştır. ANM-LD yöntemi seçilen belirli uzaklıkları ve jirasyon yarıçapını hesaplayacak şekilde geliştirilmiştir.

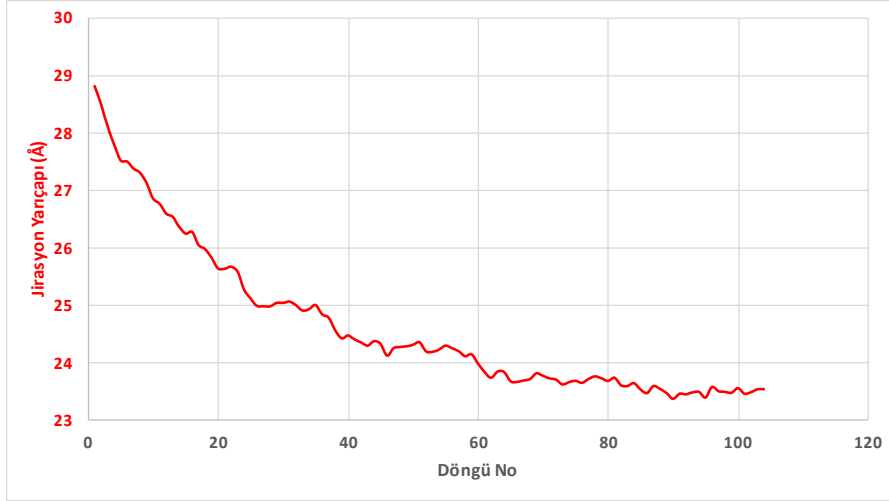
c-Src kinaz proteininin α C-sarmalı bölgesinde bulunan E310 C δ atomu inaktif konformasyonda dışa doğru yer alırken, konformasyonel geçiş sürecinde içe doğru yer alarak katalitik açıdan öneme sahip tuz köprülerinin kurulmasını sağlar. Bu sebeple E310 C δ atomunun R409 C ζ ve K295 N ζ atomları arasındaki uzaklık sırasıyla D1 ve D2, yine aynı bölgede yer alan D413 O ve T417 N, N414 O ve A418 N ve E415 O ve R419 O atomları arasındaki ortalama uzaklık D3; aktif-inaktif konformasyon geçişlerinde önemlidir (Meng vd., 2016). İkinci bir kısıt olarak

sisteme ait atomların koordinatlarının merkezini temel alarak proteinin uzayda kapladığı alanı ifade etmek için kullanılan jirasyon yarıçapı seçilmiştir.

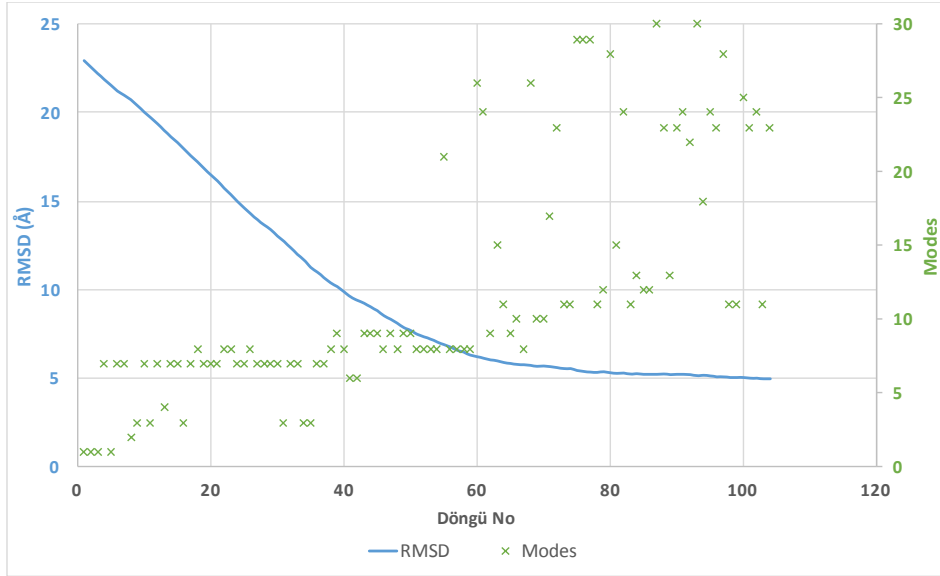
Simülasyonu hedefsiz kısıtlı koşturmak için öncelikle D1-D2 ve D3 uzaklıklarının ve jirasyon yarıçapının aktif (açık) > inaktif (kapalı) geçiş patikasında nasıl değişiklik gösterdiği; hedefli aktif>inaktif simülasyonu gerçekleştirilerek gözlemlenmiştir. D1, D2, D3 uzaklıklarının hesaplanması için belirlenen atomlara karşılık gelen α C atomları kullanılmıştır. D1-D2, D3 uzaklıkları ve jirasyon yarıçapı sonuçları Şekil 35 ve Şekil 36'da sırasıyla verilmiştir. Geçiş patikasında oluşan ara yapıların hedef yapıyla arasındaki RMSD değerleri ve simülasyonda seçilen modlar Şekil 37'de verilmiştir. Şekil 35 ve Şekil 36'ya bakıldığında D1-D2, D3 uzaklıklarının ve jirasyon yarıçapının aktif>inaktif simülasyonunda giderek azaldığı gözlemlenmiştir. Aktif ve inaktif yapıların jirasyon yarıçapları sırasıyla 29.137 Å ve 24.296 Å olarak hesaplanmıştır. Simülasyonda elde edilen son konformasyonun jirasyon yarıçapı 23.552 Å olarak bulunmuştur ve hedef yapıyla arasında 4.954 Å RMSD değeri vardır. Elde edilen bu bilgiler çerçevesinde jirasyon yarıçapının ve D1-D2, D3 uzaklıklarının azalmasını sağlayacak şekilde aktif yapı kullanılarak hedefsiz kısıtlı simülasyonlar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 35. c-Src kinaz proteinin aktif (inaktif)>inaktif (aktif) yapıya geçişinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenen E310 α C atomunun R409 ve K295 α C atomları arasındaki uzaklık sırasıyla D1 ve D2; D413 - T417, N414 - A418 ve E415 - R419 α C atomları arasındaki uzaklık sırasıyla D1 ve D2; D413 - T417, N414 - A418 ve E415 - R419 α C atomları arasındaki ortalama uzaklık D3 olarak hesaplanmıştır. Aktif>inaktif simülasyonu boyunca D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azaldığı gözlemlenmiştir. **(a)** D1 ve D2 uzaklıkları arasındaki fark **(b)** ortalama D3 uzaklığı

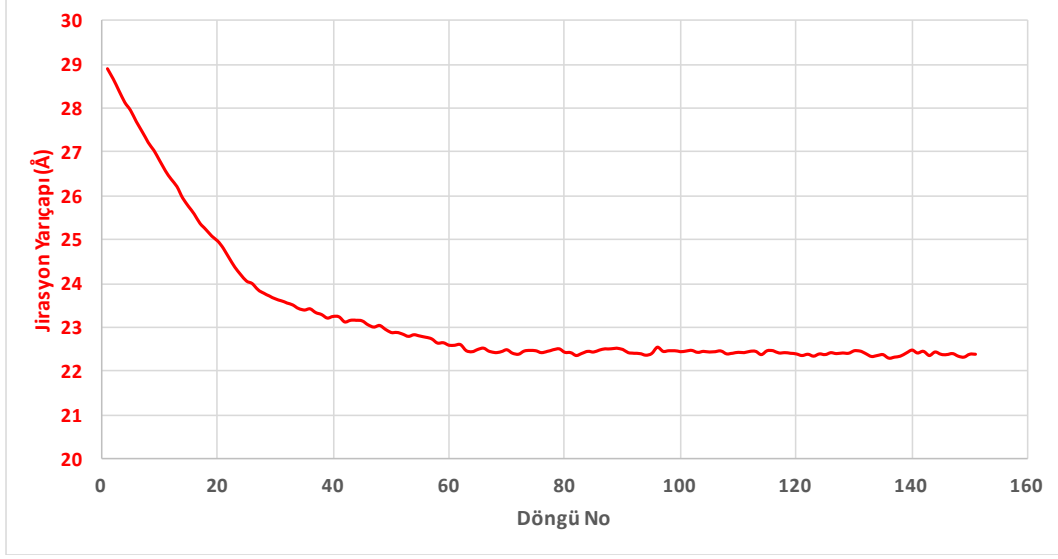


Şekil 36. Aktif>inaktif simülasyonunda jirasyon yarıçapının açık (aktif) yapıdan kapalı (inaktif) yapıya geçerken düştüğü gözlemlenmiştir.

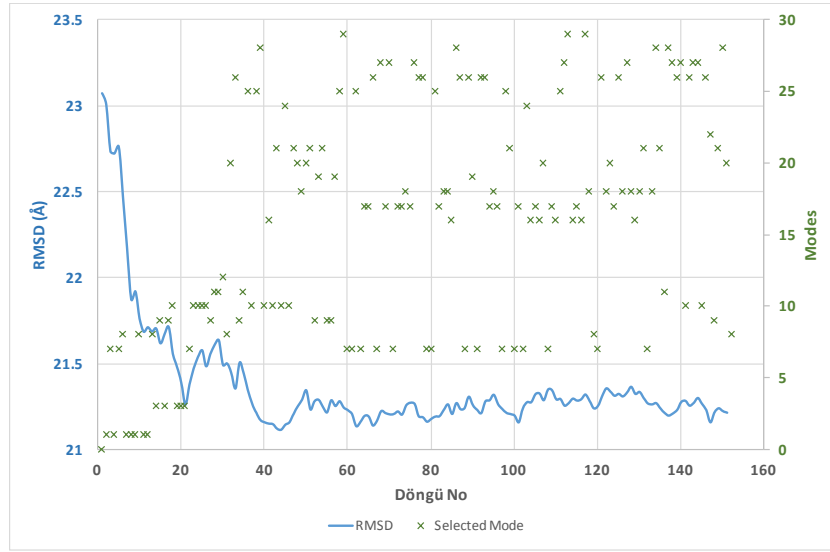


Şekil 37. Aktif>inaktif simülasyonunda seçilen modlar ve elde edilen RMSD değerleri.

Aktif yapı kullanılarak gerçekleştirilen hedefsiz kısıtlı simülasyonlarda öncelikle jirasyon yarıçapı kısıt olarak kullanılmıştır ve simülasyon jirasyon yarıçapını küçültecek şekilde koşturulmuştur. Elde edilen ara konformasyonlara ait jirasyon yarıçapları ve bu yapıların hedef yapıyla arasındaki RMSD değerleri ile geçiş patikasında seçilen modlar ve Şekil 38 ve Şekil 39'da sırasıyla verilmiştir. Jirasyon yarıçapı grafiği incelendiğinde jirasyon yarıçapının simülasyon süresince azaldığı ancak RMSD değerinin hedef yapıya yaklaşık 21 Å kadar yaklaşabildiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla sistemin simülasyon süresince kapandığı ancak doğru modlarla yönlendirilemediği için RMSD değerinin yeterince düşmediği sonucuna varabiliriz.



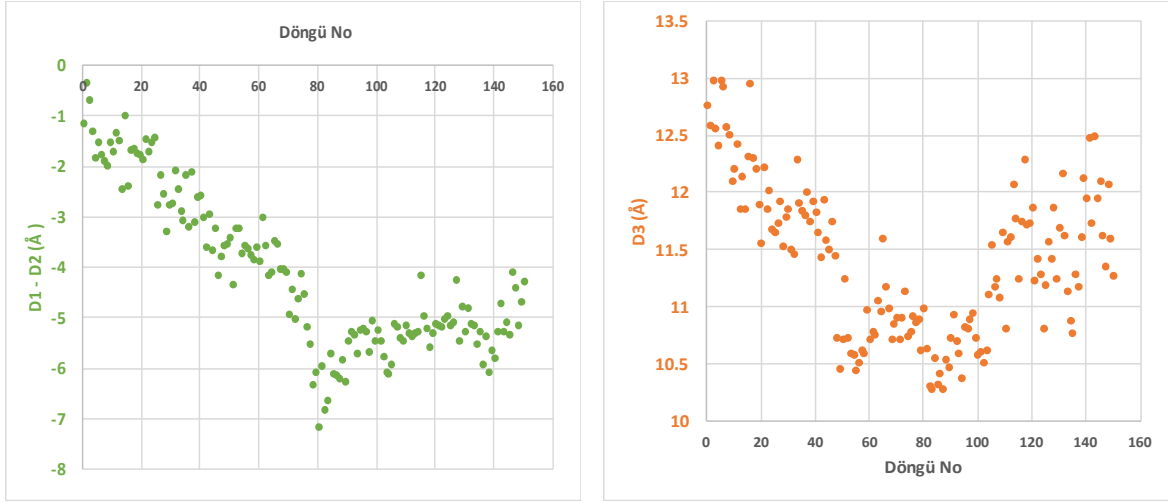
Şekil 38. Aktif yapıdan başlayarak jirasyon yarıçapının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonundan elde edilen jirasyon yarıçapı sonuçları.



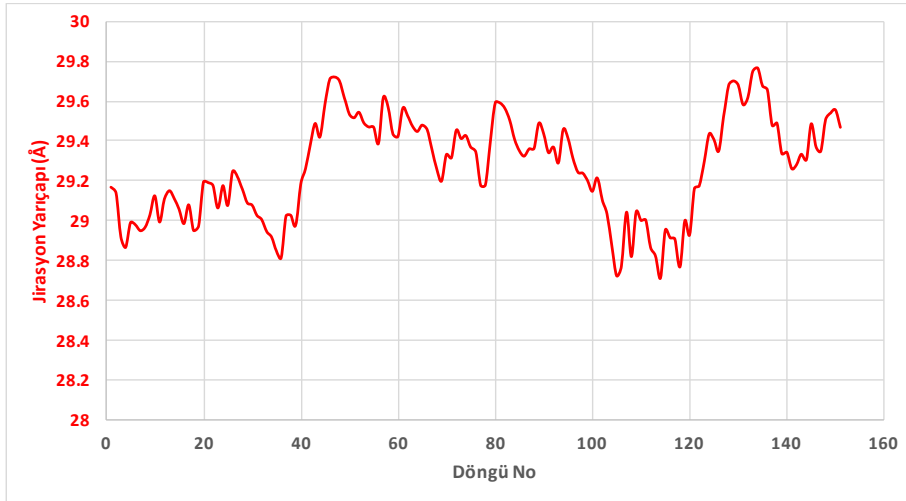
Şekil 39. Aktif yapıdan başlayarak jirasyon yarıçapının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonu ile elde edilen ara yapıların hedef yapı ile arasındaki RMSD değerleri ve geçiş patikasında seçilen modlar.

İkinci kısıt olarak c-Src kinaz proteini için katalitik açıdan öneme sahip olduğu belirlenen atomların arasındaki uzaklıklar kullanılmıştır. Hedefli aktif>inaktif simülasyonunda da görüldüğü üzere aktif yapıdan inaktif yapıya geçişte belirlenen uzaklıklar azalmaktadır. Bu sebeple ANM-LD simülasyonu uzaklıkların azalması yönünde hedefsiz olarak koşturulmuştur. Elde edilen ara yapılar için D1-D2, D3 uzaklıkları, jirasyon yarıçapları ve ara

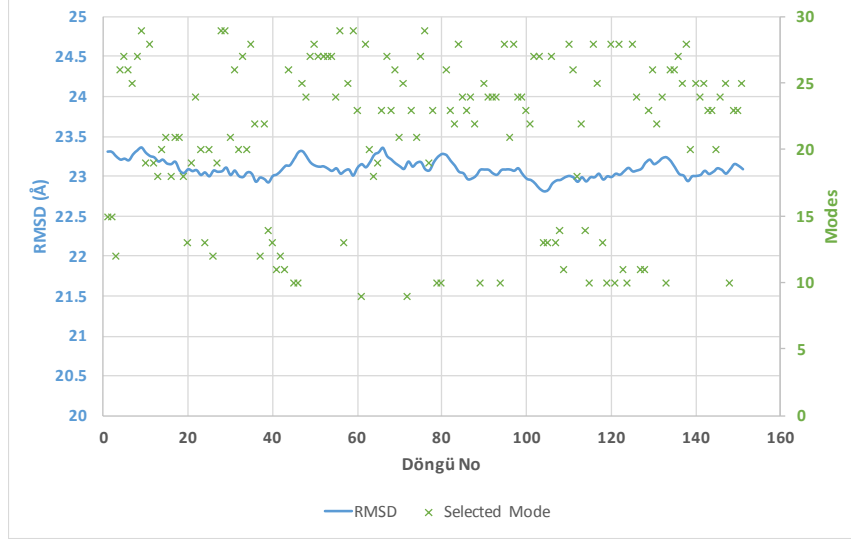
yapıların hedef yapı ile arasındaki RMSD değerleri ile patika boyunca seçilen modlar Şekil 40, Şekil 41 ve Şekil 42’de sırasıyla verilmiştir. Simülasyona ait grafikler incelediğinde D1-D2 ve D3 uzaklıklarının simülasyon süresince azaldığı; ancak RMSD değerinin yaklaşık 23 Å olduğu ve jirasyon yarıçapının da azalmak yerine arttığı ve yaklaşık 29.5 Å olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır.



Şekil 40. Aktif yapıdan başlayarak D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonu ile elde edilen (a) D1 ve D2 uzaklıkları arasındaki fark (b) ortalama D3 uzaklığı



Şekil 41. Aktif yapıdan başlayarak D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonundan elde edilen jirasyon yarıçapı sonuçları.



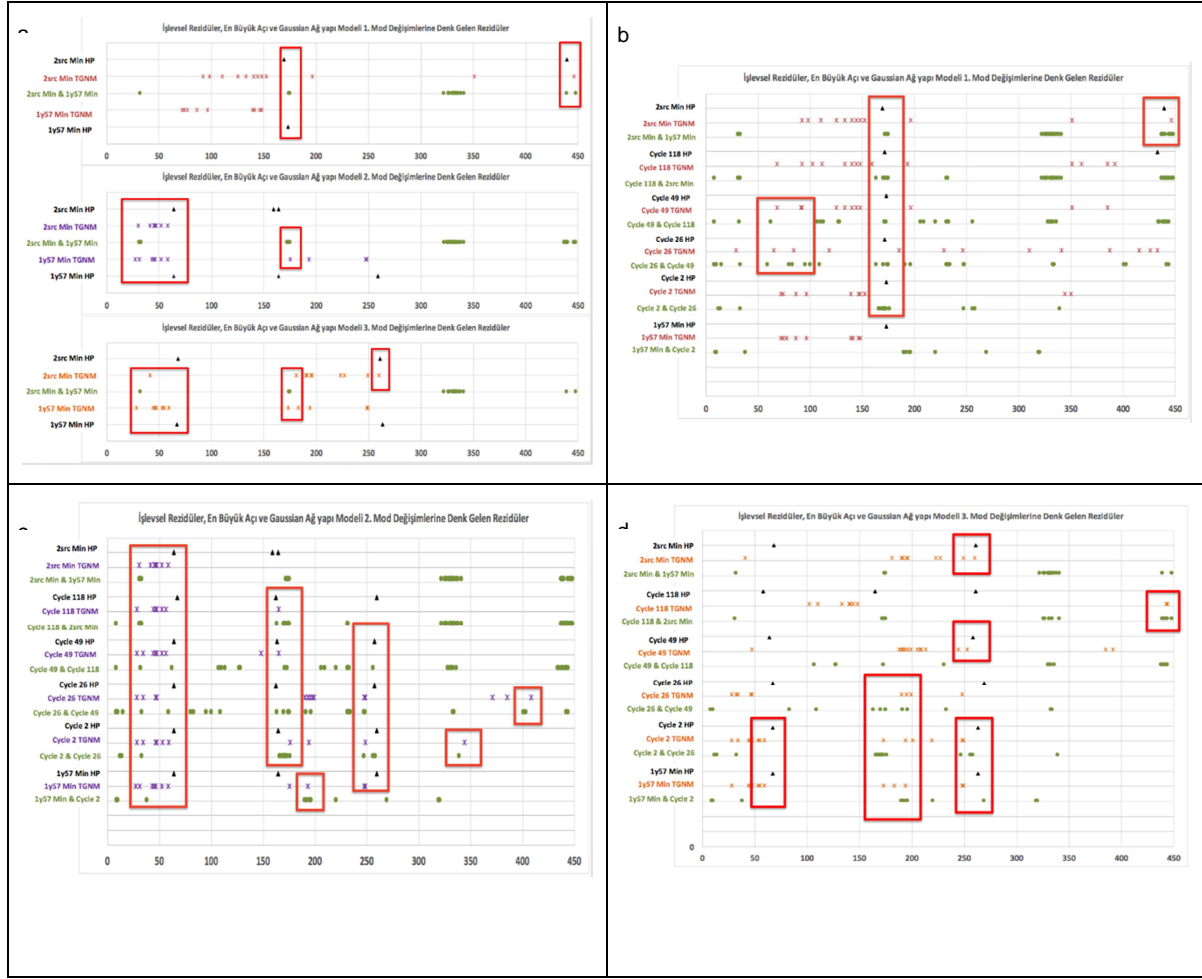
Şekil 42. Aktif yapıdan başlayarak D1-D2 ve D3 uzaklıklarının azalacağı yönde hedef yapı gösterilmeden gerçekleştirilen ANM-LD simülasyonu ile elde edilen ara yapıların hedef yapı ile arasındaki RMSD değerleri ve geçiş patikasında seçilen modlar.

Bu noktada jirasyon yarıçapının ve katalitik açıdan önemli atomlar arasındaki mesafelerinin c-Src proteinin aktivasyonu ile ilgili önemli bilgiler içermelerine rağmen tek başlarına aktif>inaktif dönüşümünü tanımlamada yeterli olmadığını söyleyebiliriz. Bu yüzden bu parametrelerin birleştirilmesi ve yeni kolektif değişkenlerin tanımlanmasıyla ilgili çalışmalarımız devam etmektedir. BtuCD'de olduğu gibi doğru kolektif değişkenlerin tanımlanmasıyla ve/veya beraber kullanılmasıyla hedefsiz simülasyonlarda ilerleme kaydedilmesi planlanmaktadır. Ayrıca belirli uzaklıkların ve jirasyon yarıçapının kısıt olarak kullanılmasının yanında dinamik bölgelerin menteşe noktalarını belirleyerek bu noktalardan dinamik bölgelerin ağırlık merkezlerine doğru olan uzaklık vektörlerini kullanarak da hedefsiz simülasyonlar gerçekleştirilebilir.

Açısal Uzayda Gaussian Ağyapı Modeli

c-Src kinaz proteini için en yavaş üç moda ait sonuçlar Şekil 43'de verilmiştir. Menteşe rezidüleri ve yapılar arasındaki açı farkları Gaussian ağyapı modeli sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 43.a'da verilen c-SRC kinaz kristal yapısının 1. mod sonuçları incelendiğinde menteşe rezidüleri ile büyük açısal değişimlerin kesiştiği görülmektedir. Gaussian ağyapı modelinin 1. mod sonuçlarında menteşe rezidüleri büyük açı değişimlerine denk gelmese de, 2. mod sonuçlarında çok büyük bir uyum gözükmemektedir (özellikle 25-60 rezidüleri arasında). Kristal yapılar tarafından elde edilemeyen hareketleri incelemek için ara yapılar da kullanılmıştır. Şekil 43.b ve Şekil 43.c'de de verildiği üzere, 1. ve 2. mod sonuçlarında büyük açı değişimleri, menteşe rezidülerinin bulunduğu alana denk

gelmektedir. Gaussian ağ yapı modelinin 2. mod sonuçlarında 25-60., 150-170. Ve 240-260 arası rezidüler arasında menteşe rezidüleri ve büyük açılal değişimler uyum göstermektedir. Gaussian ağyapı sonuçları ise Şekil 43.d'de de verildiği gibi 150-200 rezidüleri arasında büyük açılal değişimlerle uyumlu sonuçlar vermekte ve 245-260 rezidüler arasında menteşe rezidüleri ile kesişmektedir.



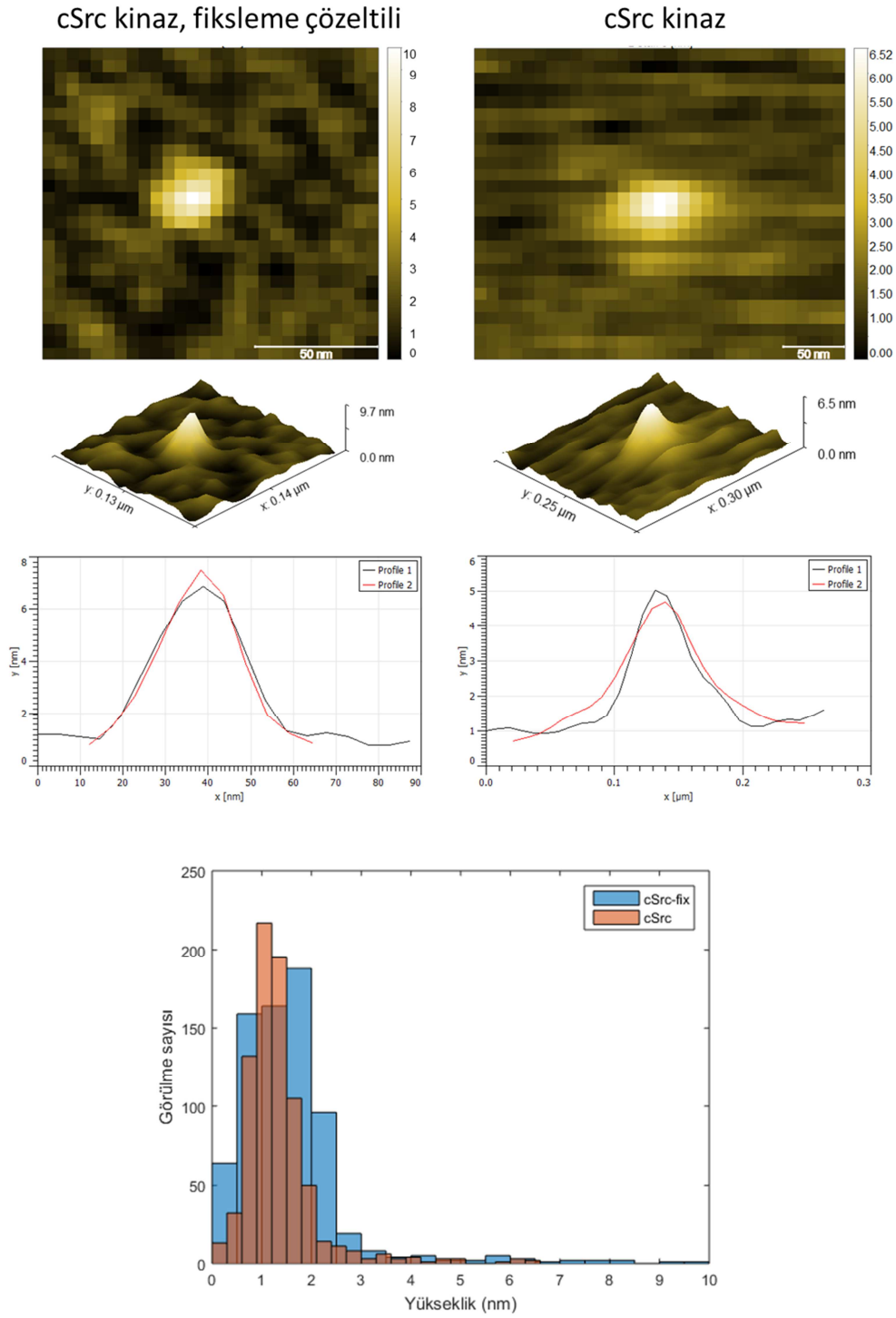
Şekil 43. En yavaş üç mod için c-Src kinaz Gaussian ağyapı modeli sonuçları. (a) c-Src kinaz açık (1y57) ve kapalı (2src) kristal yapıları için 1., 2. ve 3. mod sonuçları (b) c-Src kinaz kristal yapıları ve ANM-LD programından elde edilen ara yapıları 1. mod sonuçları (c) c-Src kinaz kristal yapıları ve ANM-LD programından elde edilen ara yapıları 2. mod sonuçları (d) c-Src t kinaz kristal yapıları ve ANM-LD programından elde edilen ara yapıları 3. mod sonuçları

4.4.2 AFM Görüntüleme Deneyi Sonuçları

c-Src kinaz proteini kullanılarak AFM temas modu görüntüleme deneyleri farklı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Projenin ilk dönemlerinde Creative Biomart şirketinden satın aldığımız kataloglarında hazır bulunan insan organizmasına ait kuru toz haldeki c-Src kinaz proteini (Recombinant Human SRC protein, His/GST-tagged) ile gerçekleştirilen deneylerde, proteinin amino (N) terminalinde yer alan 220 amino asitlik -GST (Glutathione S-transferases) işareti (tag), beklenen c-Src kinaz protein profilinden çok daha yüksek ya da geniş değerlerin görülmesine sebep olmuştur. Bu sebeple AFM görüntülerinin analizi sonucunda özel olarak sadece -His işaretli ya da hiç işaret içermeyen (tag-free) c-Src kinaz proteini ürettirilmesine karar verilmiştir.

MyBioSource firmasından kuru toz halde satın alınan ve yapısında herhangi bir His ya da GST içermeyen (önceki satın aldığımız proteinin aksine) c-Src kinaz proteini, üretici firma ile temasa geçilerek çözelti konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde steril ultra saf su (ddH₂O) içerisinde sulandırılmış ve uygun koşullarda (sıvı azot ile dondurulmasını takiben -80°de) sonraki kullanımlar için saklanmıştır.

Deney protokolüne sonradan eklenen kütlece %2.5 gluturaldehit fiksleme çözeltisi kullanımından da güzel sonuçlar elde edilmiş ve fiksleme yapılan ve yapılmayan işaretsiz (tag-free) formdaki c-Src kinaz proteini ile yapılan AFM temas modu deney sonuçlarına aşağıda değinilmiştir.



Şekil 44. c-Src kinaz proteinin AFM topografik görüntüleri ve yüzeye fiksleme çözeltilisi eklendiği ve eklenmediği durumlara ait yükseklik profilleri değişimi

c-Src kinaz proteinine ait AFM görüntülerine ait örnek profiller Şekil 44'de verilmiştir. Buna göre, yüzeyde Şekil 12c'deki konformasyonda olmasını beklediğimiz c-Src kinaz proteini yaklaşık 4 nm lik yükseklikler verirken, fiksleme çözeltilisinin eklendiği durumda daha net

topografi elde edilebilmiştir. Topografik haritanın yükseklik histogramı da ayrıca verilmiştir. Projede AFM deneylerinden elde edilen c-Src kinaz proteinine ait topografik görüntülerin temel bileşen eksenleri hesaplanarak ANM-LD simülasyonlarının deney kısıtlarıyla yönlendirilmesi amaçlanmıştır, bunun üzerine sonuçlar 4.1 başlığı kapsamında tartışılmıştır.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Bu projede hesaplamalı ve deneysel yöntemlerin birbirlerini tamamlayan yönlerinden faydalanılarak protein dinamiğinin anlaşılması hedeflenmiştir, bu hedef doğrultusunda proteinlerin farklı yapıları arasındaki konformasyonel geçişi örnekleyebilecek bir hibrid yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Proteinlerin farklı koşul ya da işlevsel durumlarındaki çeşitli üç boyutlu yapılarının bilinmesi durumunda var olan hesapsal örnekleme yöntemleriyle çalışılması nispeten daha kolaydır. Sistemin büyüklüğü ya da diğer fizyokimyasal özelliklerinin standardın dışına çıktığı durumlarda ise pekiştirilmiş örnekleme (enhanced sampling) yöntemlerinden faydalanılmaktadır (Maximova vd., 2016). ANM-LD yönteminin de pek çok farklı sisteme uygulanabilmesi açısından bu alanda başarılı bir yöntem olduğu bu proje kapsamında gösterilmiştir (Yang vd., 2018). Ayrıca proje grubu tarafından özel olarak geliştirildiğinden algoritma, paket programlardan farklı olarak, çeşitli bileşenlerle birlikte kullanılmaya veya dinamik davranışın hesapsal manipülasyonuna uygundur. Bu sayede hedefli kısıtlamalı simülasyonların geçiş dinamiğinde alternatif geçiş yollarını saptayabildiği gözlenmiştir (Ek 1). Bu yöntem, dinamik davranışın farklı özelliklerini değerlendirmeyi mümkün kılmaktadır. Ayrıca dinamik davranışın farklı bileşenlerinin saptanmasıyla, bu bileşenlerin *in silico* ve *in vitro* olmak üzere manipüle edilip değerlendirilmesinin önü açılmıştır. Örneğin Ek 3'te BtuCD için verilen ANM-LD sonuçları, işbirliği içinde çalışılan Oded Lewinson Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen mutasyon deneyleri için hedef rezidü belirlenmesinde kullanılmıştır. Elde edilen ANM-LD sonuçları deneysel sonuçlar ile birleştirilerek, hakemli bir dergiye gönderilecektir.

Proteinin farklı işlevsel durumlarına karşılık gelen yapılarının bilinmediği durumlar ise daha zorlu bir örnekleme problemi oluştururlar. Bu nedenle bu çalışmada, AFM deneylerinin proteinin doğal yapısında çalışılmasına imkan veren, örneği kristalleşme ya da dondurma işlemleri gerektirmeyen doğası da düşünülerek (Dufrene vd., 2017), bilinmeyen yapılarla ilgili bu deneylerden elde edilen görüntülerden faydalanılması düşünülmüştür. Metodun geliştirilmesi için, karşılaştırma imkanı verecek şekilde, birden fazla üç boyutlu yapıları bilinen

BtuCD, GroEL/ES ve c-Src kinaz sistemleri üzerinde çalışılmıştır. Deney odasının ses yalıtımı sıkıntısı, şebeke sistemi kaynaklı sinyal gürültüsü gibi teknik nedenler dolayısıyla elde edilen AFM görüntülerinin çözünürlükleri düşük olmasına rağmen, yine de elde edilen görüntüler ANM-LD simülasyonlarına dahil etmek, bu simülasyonları yönlendirmek için kullanılacak kolektif değişkenin saptanması ve hesaplanmasında kullanılabilir. Bu nedenle üç sistem için elde edilen görüntülerden BtuCD ve c-Src kinaz için temel bileşen eksenleri, GroEL/ES için ise hacim oranı kolektif bileşenler olarak tayin edilmiştir. Bu değişkenler, ilgili sistemlerin ANM-LD simülasyonlarını yönlendirmek için kullanılmıştır. c-Src kinaz için temel bileşen eksenini değişkeninin geçiş dinamiğini örneklemekte başarılı olduğu gözlenmiştir, bunun yanında hacmin tek başına yeterli bir parametre olmadığı saptanmıştır. Ayrıca SAXS verilerinin literatürde moleküler dinamik yöntemleriyle birleştirilmesi (Debiec vd., 2018) göz önünde bulundurularak, SAXS profillerinin ANM-LD simülasyon yöntemine de entegre edilmesi üzerine çalışılmıştır. Bu sayede farklı deneylerden elde edilen bilgilerin ANM-LD yöntemine rahatça dahil edilebileceği bir platform yaratılması amaçlanmıştır. SAXS profillerinin doğrudan simülasyonlara yön vermek için kullanılması denenmiş, ancak elde edilen sonuçlarda tek başına bir parametre olarak yeterli görülmemiştir. Bu noktada farklı bileşenlerin denenmesi uygun olabilir. Cryo-EM ise elde edilen veri ve görüntünün tarzı ile AFM görüntüleme deneylerine çok benzemektedir. Bu nedenle AFM için kullanılan kısıtlar benzer şekilde cryo-EM verilerinin simülasyonlara dahil edilmesi için de kullanılabilir.

Bu çalışmada AFM deneyleri öncelikle hibrid örnekleme yöntemine katkıda bulunmak amacıyla gerçekleştirilse de, buna ilaveten daha önce literatürde çalışma protokolü bulunmayan c-Src kinaz ve BtuCD proteinleri için bir AFM görüntüleme protokolü geliştirilmesi sağlanmıştır. Özellikle bir membran proteini olan BtuCD'nin deterjan koşullarında çalışılması araştırılmış ve daha önce yapılan FRET deneyleri baz alınarak (Yang vd., 2018) ortaya bir BtuCD protokolü konulmuştur, ancak görüntü çözünürlüğünün artırılmasıyla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Deterjanın stabiliteyi negatif anlamda etkilediği durumlarda, lipozom gibi basit zar sistemleri de proteinlerin yerleştirilmesi için kullanılabilir. GroEL/ES sistemi için ise literatürde var olan örnek protokollerden faydalanılsa da (Mou vd., 1996), nihai protokol farklı yaklaşımlar denenerek elde edilmiştir.

AFM görüntülerinden elde edilen yükseklikler deneysel verilere oldukça yakındır, elektrostatik potansiyel analizinden elde ettiğimiz beklenen mika yüzeyindeki protein konfigürasyonları ile de uyumludur. Ancak, AFM'nin bir özelliği olarak (z-ekseninde atomik düzeyde çözünürlüğe rağmen), AFM görüntülerinin en ve boy büyüklükleri manivela ucu kaynaklı genişleme (tip broadening effect) nedeniyle normalin epey üstündedir. Manivela ucu (tip) parametrelerinin

protein büyüklüğünden daha büyük olduğu durumlarda bu genişleme etkisi kaçınılmazdır. Simülasyonlarda kullanılan kısıtlar bu bilgi göz önünde tutularak seçilmiştir. GroEL gibi büyük bir sistemde bahsi geçen genişleme etkisi diğerlerine nazaran daha sınırlı olacağından, apo ve GroES/ATP bağlı GroEL'in AFM görüntülerinden elde edilen hacim oranları kısıt olarak kullanılmıştır. Nispeten daha küçük olan sistemler BtuCD ve c-Src kinaz için ise temel bileşen eksenleri, boy ve enlem bilgisine doğrudan ihtiyaç duymadan kullanılmıştır. Bu sonuçlar içinde en başarılı sonuç c-Src kinaz sisteminde temel bileşen eksenleri ile sağlanmıştır. BtuCD için ise daha net görüntüler elde edilmesine çalışılmaktadır. GroEL yapısı heptamer olarak epey büyük olduğundan, ve ANM-LD'ye entegre edilen deneysel kısıtlarla birlikte gerektirdiği hesapsal yük fazla olduğundan simülasyonlar hala devam etmektedir. Daha kaba ölçekli bir modelleme bu sistem için uygun olabilir.

Yukarıda belirtilen yöntemsel ve deneysel gelişmeler dışında bu projenin literatüre sistem bazlı sonuçlarda katkıları da olmuştur. BtuCD'nin kararlı yapıları arasındaki geçiş yolları belirlenerek BtuF ve ATP bağlanmalarıyla gerçekleşen alosterik mekanizma çözümlenmiştir. Elde edilen sonuçlar FRET deney sonuçlarıyla birleştirilerek Yang vd. (2018) makalesinde paylaşılmıştır (Ek 2), ayrıca BtuCD'deki alosterik etkileşimin, hangi yapısal değişikliklerde gözlemlendiği, hangi rezidüel arasında ve ne yönde oluştuğu gibi özelliklerinin değerlendirildiği sonuçlar mutasyon deneyleriyle birleştirilerek yayına hazırlanmaktadır (Ek 3). GroEL/ES sistemi AFM görüntüleme deneyleri ile çok çalışılmış bir sistem olmasına rağmen, GroEL şaperon proteininin GroES ve ATP bağlanması sonucu geçirdiği büyük konformasyonel değişiklikler ANM-LD yöntemi ile ilk kez atomistik olarak çalışılmış ve dinamik bileşenleri karakterize edilmiştir. Ayrıca hedef yapının hacim bilgisinin kısıt olarak yöntem entegrasyonu açısından da ANM-LD metodu çerçevesinde bir ilktir. Sistem bazında yapılan çalışmalarda, en başarılı deney verisi entegrasyonu c-Src kinaz proteini ile elde edilmiştir. Ayrıca c-Src kinazın aktivasyonu ve inaktivasyonu sırasında geçirdiği konformasyonel geçiş patikaları saptanmıştır. Bu Fajer vd. (2017) tarafından gerçekleştirilen simülasyonlarla birlikte, literatürde proteinin bütünü ile gerçekleştirilmiş tek örneklemedir. Fajer vd. (2017)'den farklı olarak geçişin dinamik bileşenleri olarak geçiş dinamiğinde etkili olan modlar belirlenmiş, ve bu modları tayin eden rezidü bölgeleri saptanmıştır. Bu rezidüel gelecek çalışmalar için hedef oluşturmakla birlikte, bilinen onkogenik mutasyonlar ile alosterik etkileşimleri de belirlenmiştir. Tüm bu sistemler için elde edilen sonuçlar, ileriki deney çalışmalarında işleve katkısı değerlendirilecek hedef bölgelerin saptanması için kullanılabilir.

Sonuç olarak, geliştirilen metot pek çok deneysel verinin ANM-LD simülasyonlarına entegre edilmesine olanak vererek protein dinamiğinin incelenmesi alanına katkıda bulunmuştur.

Deneysel koşulların iyileştirilip, teknik problemlerin çözülmesiyle daha iyi çözünürlükte elde edilen görüntülerin kullanılması metodu daha da iyi bir hale getirilebilir. Bunun yanı sıra, farklı deney verisinin metoda kısıt olarak eklenmesi de mümkün olabilecektir. Bu sayede ANM-LD yönteminin kullanım alanını genişletip, çalışılması zor (globüler olmayan proteinler gibi) sistemlere uygulanabilecektir.

KAYNAKÇA

Abrams, C., Vanden-Eijnden, E. 2010. "Large-scale conformational sampling of proteins using temperature-accelerated molecular dynamics." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107, 4961–4966. 10.1073/pnas.0914540107.

Aleshin, A., Finn, R.S. 2010. "SRC: a century of science brought to the clinic.", *Neoplasia*, 12, 599–607. doi: 10.1593/neo.10328.

Atilgan, A.R., Durell, S.R., Jernigan, R.L., Demirel, M.C., Keskin, O., Bahar, I. 2001. "Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model.", *Biophys J.*, 80, 505–515.

Baclayon, M., Roos, W.H., Wuite, G.J.L. 2010. "Sampling protein form and function with the atomic force microscope.", *Mol. Cell. Proteomics*, 9, 1678–1688.

Bahar, I., Lezon, T.R., Bakan, A., Shrivastava, I.H. 2010. "Normal mode analysis of biomolecular structures: functional mechanisms of membrane proteins.", *Chem. Rev.*, 110, 1463–1497. doi: 10.1021/cr900095e.

Bernardi, R. C., Melo, M. C., Schulten, K. 2015. "Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems.", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(5), 872-877.

Beckstein, O., Denning, E. J., Perilla, J. R., & Woolf, T. B. 2009. "Zipping and unzipping of adenylate kinase: atomistic insights into the ensemble of open↔ closed transitions.", *Journal of molecular biology*, 394(1), 160-176.

Binnig, G., Rohrer, H. 1986. "Scanning tunneling microscopy". *IBM Journal of Research and Development*, 30 (4), 355–69.

Blume-Jensen, P., Hunter, T. 2001. "Oncogenic kinase signalling.", *Nature*, 411, 355–365. doi: 10.1038/35077225.

- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., Sigler, P.B. 1994. "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å." *Nature*, 371, 578–586. doi: 10.1038/371578a0.
- Cadioux, N., Bradbeer, C., Reeger-Schneider, E., Köster, W., Mohanty, A.K., Wiener, M.C., Kadner, R.J. 2002. "Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.*, 184, 706–717.
- Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, III, T.E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Götz, A. W., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R. M., Liu, J., Wu, X., Brozell, S.R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, J., Wang, H., Hsieh, M. J., ...Cui, G., Roe D. R., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A., Kollman, P. A. 2012. AMBER 12, University of California, San Francisco.
- Chow, A. M., Ferrier-Pagès, C., Khalouei, S., Reynaud, S., Brown, I. R. 2009. "Increased light intensity induces heat shock protein Hsp60 in coral species." *Cell stress and Chaperones*, 14(5), 469-476.
- Cui, Q., Bahar, I. 2006. "Normal Mode Analysis: Theory and applications to biological and chemical systems", London, UK: Chapman & Hall/CRC.
- Debiec, K. T., Whitley, M. J., Koharudin, L. M. I., Chong, L. T., Gronenborn, A. M. 2018. "Integrating NMR, SAXS, and Atomistic Simulations: Structure and Dynamics of a Two-Domain Protein." *Biophys. J.*, 114, 839–855. 10.1016/j.bpj.2018.01.001.
- Dufrêne, Y.F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., Gerber, C., Müller D. J. 2017. "Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology", *Nat. Nanotechnol.*, 12, 295.
- Emekli, U., Schneidman-Duhovny, D., Wolfson, H. J., Nussinov, R., Haliloglu, T. 2008. "HingeProt: Automated Prediction of Hinges in Protein Structures." *Proteins*, 70(4), 1219-27.
- Eyal, E., Lum, G., Bahar, I. 2006. "Anisotropic network model: systematic evaluation and a new web interface." *Bioinformatics*, 22, 2619-2627.
- Fajer, M., Meng, Y., Roux, B. 2017. "The activation of c-Src tyrosine kinase: conformational transition pathway and free energy landscape." *J. Phys. Chem. B.*, 121, 3352–3363. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b08409.

- Gaczynska, M., Osmulski, P. A., Jiang, Y., Lee, J. K., Bermudez, V., Hurwitz, J. 2004. "Atomic force microscopic analysis of the binding of the Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex and the spOrc4 protein with origin DNA.", *Proc Natl Acad Sci*, 101, 17952–17957.
- Gan, W., Yang, S., Roux, B. 2009. "Atomistic view of the conformational activation of Src kinase using the string method with swarms-of-trajectories.", *Biophysical Journal* 97:L8–L10. doi: 10.1016/j.bpj.2009.06.016.
- Griffiths, G. J., Koh, M. Y., Brunton, V. G., Cawthorne, C., Reeves, N. A., Greaves, M., Tilby, M. J., Pearson, D. G., Ottley, C. J., Workman, P., Frame, M. C., Dive, C. 2004. "Expression of kinase-defective mutants of c-Src in human metastatic colon cancer cells decreases Bcl-xL and increases oxaliplatin- and Fas-induced apoptosis", *J Biol Chem.*, 279(44), 46113-21.
- Haliloglu. T., Bahar, I., Erman, B. 1997. "Gaussian Dynamics of Folded Proteins", *Physical Review Letters*, 79, 3090-3093.
- Hall, B. A., Kaye, S. L., Pang, A., Perera, R., Biggin, P. C. 2007. "Characterization of protein conformational states by normal-mode frequencies", *Journal of the American Chemical Society*, 129(37), 11394-11401.
- Hartl, F. U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. 2011. "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis.", *Nature*, 475, 324–332. doi: 10.1038/nature10317.
- Higgins, C. F. 2001. "ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview.", *Res. Microbiol.*, 152, 205–210.
- Hollenstein, K., Frei, D. C., Locher, K. P. 2007. "Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein.", *Nature*, 446(7132), 213–6. 10.1038/nature05626
- Hyeon, C., Lorimer, G. H., Thirumalai, D. 2006. "Dynamics of allosteric transitions in GroEL.", *Proc. Natl Acad. Sci.*, 103, 18939–18944.
- Hurth, C., Tassius, C., Talbot, J. C., Maali, A., Moskalenko, C., Minard, P., Argoul, F. 2007. "Enzymatic activity of immobilized yeast phosphoglycerate kinase.", *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2449-2455.
- Im, W., Beglov, D., Roux, B. 1998. "Continuum Solvation Model: Computation of Electrostatic Forces from Numerical Solutions to the Poisson-Boltzmann Equation.", *Comput. Phys. Comm.*, 111, 59-75.

- Jo, S., Kim, T., Iver, V. G., Im, W. 2008. "CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM.", *J. Comput. Chem.*, 29, 1859-1865.
- Jo, S., Vargyas, M., Vasko-Szedlar, J., Roux, B., Im, W. 2008. "PBEQ-Solver for Online Visualization of Electrostatic Potential of Biomolecules.", *Nucl. Acids Res.*, 36, 270-275.
- Klein, J. S., Lewinson, O. 2011. "Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence.", *Metallomics*, 3, 1098–1108.
- Korkhov, V. M., Mireku, S. A., Locher, K. P. 2012. "Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD–F.", *Nature*, 490, 367-10.1038/nature11442
- Leung, C., Palmer, RE. 2008. *J. Phys., Condens. Matter*, 20, 353001.
- Lin, C. H., Yu, M. C., Chiang, C. C., Bien, M. Y., Chien, M. H., Chen, B. C. 2013. "Thrombin-induced NF- κ B activation and IL-8/CXCL8 release is mediated by c-Src-dependent Shc, Raf-1, and ERK pathways in lung epithelial cells.", *Cell. Signal.*, 1166–1175.
- Locher, K. P., Lee, A. T., Rees, D. C. 2002. "The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism.", *Science*, 296(5570), 1091-1098.
- Locher, K. P. 2009. "Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters.", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2009, 364, 239–245. doi: 10.1098/rstb.2008.0125.
- Lovera, S., Sutto, L., Boubeva, R., Scapozza, L., Dolker, N., Gervasio, F.L. 2012. "The Different Flexibility of c-Src and c-Abl Kinases Regulates the Accessibility of a Druggable Inactive Conformation.", *J Am Chem Soc.*, 134(5), 2496–2499.
- Lovera, S., Morando, M., Pucheta-Martinez, E., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Saladino, G., Gervasio, F. L. 2015. "Towards a Molecular Understanding of the Link between Imatinib Resistance and Kinase Conformational Dynamics.", *PLoS Comput Biol.*, 11, e1004578
- Lu, H. M., Liang, J. 2009. "Perturbation-based Markovian Transmission Model for Probing Allosteric Dynamics of Large Macromolecular Assembling: A Study of GroEL-GroES.", *PLoS Comput Biol.*, 5, e1000526.
- Maximova, T., Moffatt, R., Ma, B., Nussinov, R., Shehu, A. 2016. "Principles and Overview of Sampling Methods for Modeling Macromolecular Structure and Dynamics.", *PLoS Comput. Biol.*, 12, e1004619.

- Meena, S., Saxena, A. K. 2016. "Crystal Structure of Escherichia coli GroEL in Substrate and ADP Unloaded State.", *J Phys Chem Biophys*, 6(222), 2161-0398.
- Meng, Y., Roux, B. 2013. "Locking the Active Conformation of c-Src Kinase through the Phosphorylation of the Activation Loop.", *J. Mol. Biol.*, 426, 423–435. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.001.
- Meng, Y., Shukla, D., Pende, V. S., Roux, B. 2016. "Transition path theory analysis of c-Src kinase activation.", *PNAS*, 113(33), 9193-9198.
- Miyagi, A., Tsunaka, Y., Uchihashi, T., Mayanagi, K., Hirose, S., Morikawa, K., Ando, T. 2008. "Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy.", *Chem Phys Chem.*, 9, 1859–1866. doi: 10.1002/cphc.200800210.
- Miyazaki, K., Senga, T., Matsuda, S., Tanaka, M., Machida, K., Takenouchi, Y., Nimura, Y., Hamaguchi, M. 1999. "Critical amino acid substitutions in the Src SH3 domain that convert c-Src to be oncogenic", *Biochem Biophys Res Commun.*, 263(3), 759-64.
- Moparthy, S.B., Sjölander, D., Villebeck, L., Jonsson, B. H., Hammarström, P. 2013. "Transient conformational remodeling of folding proteins by GroES-individually and in concert with GroEL.", *J Chem Biol.*, 7, 1–15.
- Moradi, M., Tajkhorshid, E. 2013. "Mechanistic picture for conformational transition of a membrane transporter at atomic resolution.", *PNAS*, 110, 18916–18921. doi: 10.1073/pnas.1313202110.
- Mou, J., Sheng, S., Ho, R., Shao, Z. 1996. "Chaperonins GroEL and GroES: views from atomic force microscopy.", *Biophys J*, 71, 2213–2221.
- Ojha, B., Fukui, N., Hongo, K., Mizobata, T., Kawata, Y. 2016. "Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain.", *Sci. Rep.*, 6, 31041.
- Oloo, E. O., Tieleman, D. P. 2004. "Conformational transitions induced by the binding of MgATP to the vitamin B12 ATP-binding cassette (ABC) transporter BtuCD.", *J. Biol. Chem.*, 279, 45013–45019.
- Ozkirimli, E., Post, C. 2009. "Src kinase activation: a switched electrostatic network". *Protein Sci.*, 15, 1051-1062.
- Pan, C., Weng, J., Wang, W. 2016. "Conformational Dynamics and Protein–Substrate Interaction of ABC Transporter BtuCD at the Occluded State Revealed by Molecular Dynamics Simulations.", *Biochemistry*, 55(49), 6897-6907.

- Piggot, T. J., Sessions, R. B., Burston, S. G. 2012. "Toward a detailed description of the pathways of allosteric communication in the GroEL chaperonin through atomistic simulation.", *Biochemistry*, 51, 1707–1718. doi: 10.1021/bi201237a.
- Puchner, E. M., Alexandrovich, A., Kho, A. L., Hensen, U., Schäfer, L. V., Brandmeier, B., Gautel, M. 2008. "Mechanoenzymatics of titin kinase.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13385-13390.
- Roskoski, R. 2004. "Src protein-tyrosine kinase structure and regulation". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1155-1164.
- Sakkiah, S., Arullaperumal, V., Hwang, S., Lee, K. W. 2014. "Ligand-based pharmacophore modeling and Bayesian approaches to identify c-Src inhibitors.", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29:1, 69-80. DOI: 10.3109/14756366.2012.753881
- Schiener, J., Witt, S., Hayer-Hartl, M., Guckenberger R. 2005. "How to orient the functional GroEL-SR1 mutant for atomic force microscopy investigations.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 477-483.
- Sen, B., Johnson, FM. 2011. "Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers", *Journal of Signal Transduction*, 865819.
- Shukla, D., Meng, Y., Roux, B., Pande, V. S. 2014. "Activation pathway of Src kinase reveals intermediate states as targets for drug design", *Nature Commun*, 5:3397.
- Skjaerven, L., Grant, B., Martinez, A. 2011. "Conformational sampling and nucleotide-dependent transitions of the GroEL subunit probed by unbiased molecular dynamics simulations.", *PLoS Comput. Biol.*, 7, e1002004.
- Snyder, M. A., Bishop, J. M., McGrath, J. P., Levinson, A. D. 1985. "A mutation at the ATP-binding site of pp60v-src abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity", *Mol Cell Biol.*, 5(7), 1772-9.
- Svergun D.I., Barberato C. and Koch M.H.J. 1995. "CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates", *J. Appl. Cryst.*, 28, 768-773.
- Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., Gottesman M. M. 2006. "Targeting multidrug resistance in cancer.", *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 219–234. 10.1038/nrd1984

- Tal, N., Ovcharenko, E., Lewinson, O. 2013. "A single intact ATPase site of the ABC transporter BtuCD drives 5% transport activity yet supports full in vivo vitamin B12 utilization.", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110-14, 5434–9. 10.1073/pnas.1209644110
- Taylor, S., Kornev, A. 2011. "Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins". *Trends Biochem. Sci.*, 36, 65-77.
- Thirumalai, D., Lorimer, G. H. 2001. "Chaperonin-Mediated Protein Folding.", *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 30, 245-269.
- Trinh, M. H., Odorico, M., Pique, M. E., Teulon, J. M., Roberts, V. A., Ten Eyck, L. F., Getzoff, E. D., Parot, P., Chen, S. W., Pellequer, J. L. 2012. "Computational reconstruction of multidomain proteins using atomic force microscopy data.", *Structure*, 20, 113–120.
- Uyar, A., Kantarci-Carsibasi, N., Haliloglu, T., Doruker, P. 2014. "Features of large hinge-bending conformational transitions. Prediction of closed structure from open state", *Biophysical journal*, 106(12), 2656-2666.
- Vahabi, S., Nazemi Salman, B., Javanmard, A. 2013. "Atomic force microscopy application in biological research: a review study." *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38, 76–83.
- van der Vaart A, Ma JP, Karplus M. The unfolding action of GroEL on a protein substrate. *Biophys J.* 2004;87(1):562–573. doi: 10.1529/biophysj.103.037333.
- Wen, P. C., Tajkhorshid, E. 2011. "Conformational coupling of the nucleotide-binding and the transmembrane domains in ABC transporters.", *Biophys. J.*, 101, 680–690.
- Weng, J., Ma, J., Fan, K., Wang, W. 2009. "Asymmetric conformational flexibility in the ATP-binding cassette transporter Hl1470/1.", *Biophys J.*, 96, 1918–1930. 10.1016/j.bpj.2008.11.035
- Weng, J., Fan, K., Wang, W. 2012. "The conformational transition pathways of ATP-binding cassette transporter BtuCD revealed by targeted molecular dynamics simulation.", *PLoS One*, 7, e30465
- Whited, A. M., Park, P. S. H. 2014. "Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands." *Biochim. Biophys. Acta*, 1838, 56–68. 10.1016/j.bbamem.2013.04.011
- Xu, Z., Horwich, A. L., Sigler, P. B. 1997. "The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex.", *Nature*, 388, 741–750. 10.1038/41944

- Yamamoto, D., & Ando, T. 2016. "Chaperonin GroEL–GroES Functions as both Alternating and Non-Alternating Engines". *Journal of Molecular Biology*, 428(15), 3090-3101.
- Yang, Z., Májek, P., Bahar, I. 2009. "Allosteric transitions of supramolecular systems explored by network models: application to chaperonin GroEL", *PLoS Comput Biol*, 5(4), e1000360.
- Yang, M., Livnat Levanon, N., Acar, B., Aykac Fas, B., Masrati, G., Rose, J., Ben-Tal, N., Haliloglu, T., Zhao, Y., Lewinson, O. 2018. "Single-molecule probing of the conformational homogeneity of the ABC transporter BtuCD.", *Nat Chem Biol*, 14, 715–722.
- Yokokawa, M., Wada, C., Ando, T., Sakai, N., Yagi, A., Yoshimura, S. H. "Fast-scanning atomic force microscopy reveals the ATP/ADP-dependent conformational changes of GroEL.", *EMBO J.*, 25, 4567–4576. doi: 10.1038/sj.emboj.7601326
- Zhang, L., Zhao, H., Qiu, Y., Loh, H. H., Law, P.Y. 2009. "Src phosphorylation of micro-receptor is responsible for the receptor switching from an inhibitory to a stimulatory signal.", *J Biol Chem.*, 284, 1990–2000.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. TÜRKAN HALİLOĞLU
Proje No:	115M418
Proje Başlığı:	Proteinlerin İşlevsel Enerji Yüzeylerinin ve Dinamiğinin Moleküler Simülasyon ve Atomik Kuvvet Mikroskobu ile İncelenmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	HAMDİ TORUN, BORA GARİPCAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	BOĞAZIÇI Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2015 - 01/01/2019
Onaylanan Bütçe:	592638.0
Harcanan Bütçe:	556328.63
Öz:	<p>Proteinlerin farklı kararlı durumlarında (states) ve kararlı durumları arasındaki geçişlerde (transition) işlevsel enerji yüzeyleri (energy landscape) doğrultusunda gösterdiği dinamik davranışlarının anlaşılması, protein fonksiyonunun moleküler mekanizmasının deşifre edilebilmesi için esastır.</p> <p>Hem hesaplamalı hem de deneysel alanda yapılan çalışmalar uzun zaman ölçeğinde gerçekleşen konformasyonel değişimleri ile ilgili bilgileri açığa çıkarmayı hedeflemektedir. Son derece güncel ve giderek önemi artan bu alan çerçevesinde, bu projede globular ve membran proteinlerin büyük ve karmaşık dinamik geçişleri ve süreçlerini incelemek için ANM-LD hibrid yöntemi (Anizotropik Ağ Modeli modları güdümlü Langevin Dinamiği) geliştirilmiştir. ANM-LD yapıları bilinen iki kararlı durum arasındaki konformasyonel geçiş yollarını tek başına öngörme ve modüle etme kapasitesine sahip olmasının yanısıra, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve diğer görüntüleme tekniklerinden gözlemlenen topolojik değişkenleri de kısıt olarak kullanabilmektedir. Bu amaçla, AFM görüntüleme deneyleri ve ANM-LD simülasyonları üç farklı sistemde ayrı ayrı ve birlikte kullanılarak gerçekleştirilmiştir: BtuCD membran sistemi, GroEL/ES şaperon kompleksi ve c-Src kinaz globular sistemi. Bunlardan c-Src kinaz, ANM-LD simülasyonlarına farklı kolektif değişkenlerin entegrasyonunu test etmek için model sistem olarak kullanılmıştır.</p> <p>Hedef yapıların AFM görüntülerinden hesaplanan ilk iki temel bileşen eksenini, ANM-LD sırasında dinamik modların hedef yapıya yönlendirilmesinde c-Src kinaz ve BtuCD için denenmiştir. GroEL şaperon sistemi için ise AFM görüntülerinden elde edilen başlangıç ve hedef yapılar arasındaki hacim oranı kolektif değişken olarak kullanılmıştır. Büyük bir konformasyonel değişiklik gösteren c-Src kinaz için başarılı sonuç elde edilmiştir. Ancak BtuCD ve GroEL/ES için daha iyi bir sonuç elde edilebilmesi için birden fazla global yapısal kısıtın kullanılması ile ilgili protokollerin oluşturulması gerektiği sonucu çıkarılmıştır.</p> <p>AFM sonuçları veya diğer deneysel veriler ile beraber veya yalnız başına ANM-LD, çalışılan sistemlerin her birinin işlevselliklerinin altında yatan temel fonksiyonel mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunabilecek önemli dinamik davranış bilgileri açığa çıkarmıştır. Sistemlerin geçiş dinamiklerini kendine özgü hareket modlarına ayırarak her birinin ileriki çalışmalarda manipüle edilebilecek hedef yapısal ve dinamik birimleri belirlenmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Langevin Dinamiği, GNM, ANM, AFM, ABC Taşıyıcı BtuCD, GroEL/ES, c-Src Tirozin Kinaz
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Single-molecule probing of the conformational homogeneity of the ABC transporter BtuCD (Makale - İndeksli Makale), 2- Collective Dynamics Underlying Gating Mechanism of Repeat Protein FimD (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),