

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI KULLANILARAK LÖSİN
TAŞIYICI PROTEİNLERİN VE DİNEİN MOTOR PROTEİNLERİN
TERMODİNAMİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sema Zeynep YILMAZ

Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Programı

ARALIK 2019

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI KULLANILARAK LÖSİN
TAŞIYICI PROTEİNLERİN VE DİNEİN MOTOR PROTEİNLERİN
TERMODİNAMİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Sema Zeynep YILMAZ
(521171111)**

Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mert GÜR

ARALIK 2019

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 521171111 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Sema Zeynep YILMAZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI KULLANILARAK LÖSİN TAŞIYICI PROTEİNLERİN VE DİNEİN MOTOR PROTEİNLERİN TERMODİNAMİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: **Dr. Öğr. Üyesi Mert GÜR**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri: **Doç. Dr. Gizem DİNLER DOĞANAY**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Pemra ÖZBEK SARICA
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : 15 Kasım 2019
Savunma Tarihi : 12 Aralık 2019





Anneme, Babama ve Elhan'a,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca desteğini üzerimden esirgemeyen ve akademik anlayışımın oluşmasında büyük emeği geçen çok değerli hocam ve danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mert GÜR'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Birlikte çalıştığımız süreç boyunca her zaman erişilebilir, sabırlı ve yardım etmeye istekli olduğu için kendisine minnettarım.

Birlikte çalıştığımız dönem boyunca arkadaşlıkları ve yardımları için GÜRLAB üyeleri Elhan Taka, Ceren Kılınç, Mert Gölcük ve Onur Özer'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca çalışmamı finansal olarak destekleyen TÜBİTAK (Proje No: 215Z398) ve TÜBA GEBİP'e verdiği destekten ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatım boyunca hep yanımda olan desteklerini hiçbir zaman üzerimden eksik etmeyen sevgili anneme, babama, kardeşlerime ve amcama sonsuz teşekkür ederim.

Aralık 2019

Sema Zeynep Yılmaz



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET	xxi
SUMMARY.....	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı.....	1
1.2 Lösin Taşıyıcı Protein.....	1
1.3 Dinein Motor Proteini.....	5
2. YÖNTEMLER	11
2.1 LeuT Başlangıç Yapılarının Seçilmesi	11
2.2 LeuT MD Simülasyonları İçin Sistemlerin Hazırlanması	11
2.3 LeuT MD Simülasyon Detayları	13
2.4 Enerji Yüzeyinin Oluşturulması.....	14
2.5 LeuT İçin Basınç Hesabı.....	14
2.6 Dineinin MTBB'sinin MT'ye Bağlanmasının MD Simülasyonları İçin Sistemlerin Hazırlanması.....	17
2.7 Dineinin MTBB'sinin MT'ye Bağlanmasının MD Simülasyon Detayları.....	21
2.8 Dinein MTBB'sinin MT'den Kopmasının Yönlendirilmiş MD (SMD) Simülasyonları İçin Sistemlerin Hazırlanması.....	21
2.9 Dinein MTBB'sinin MT'den Kopmasının SMD Simülasyon Detayları.....	23
2.10 Serbest Enerji Hesaplaması.....	25
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	29
3.1 LeuT'nin IFo→Ofo Yapısal Geçişi Boyunca Basınç Profilleri	29
3.2 Literatürdeki Dinein MTBB-MT Yapılarının Etkileşimleri	33
3.3 Dineinin MT'ye Bağlanmasının Serbest Enerji Değişimi	41
KAYNAKLAR.....	43
EKLER	47
ÖZGEÇMİŞ	51



KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
ATP	: Adenozin trifosfat
CHARMM	: Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
CUDA	: Compute Unified Device Architecture
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
IF	: Inward-facing/ İçe bakan
IFc	: Inward-facing closed/ İçe bakan kapalı
IFo	: Inward-facing open/ İçe bakan açık
LeuT	: Lösin Taşıyıcı Protein
MD	: Moleküler dinamik
MT	: Mikrotübül
MTBB	: Mikrotübül Bağlama Bölgesi
MTBD	: Microtubule Binding Domain
NAMD	: Nanoscale Molecular Dynamics
NSS	: Neurotransmitter: sodium symporter
OF	: Outward-facing/Dışa bakan
OFc	: Outward-facing closed(occluded)/Dışa bakan dolu
OFo	: Outward-facing open/Dışa bakan açık
PDB	: Protein Data Bank
PMF	: Potential Mean Force
SMD	: Steered MD/Yönlendirilmiş MD
TH	: Termodinamik hal
TM	: Transmembran
VMD	: Visual Molecular Dynamics



SEMBOLLER

$\text{\AA}$	: Ångström
atm	: Atmosfer
$\vec{F}$	: Kuvvet
fs	: Femtosaniye
H	: Hamiltonian
h	: Simülasyon hacmi
K	: Kelvin
k	: Yay sabiti
kcal	: Kilokalori
M	: Molar
N	: Parçacık
$\vec{n}$	: Çekme yönü
nm	: Nanometre
ns	: Nanosaniye
P	: Basınç
p	: Momentum vektörü
P_L	: Yanal basınç
P_N	: Normal basınç
ps	: Pikosaniye
R	: Koordinat
R	: Pozisyon vektörü
$\vec{r}$	: Atomların anlık koordinatı
$\vec{r}_0$	: Atomların başlangıç pozisyonları
t	: Zaman
T	: Sıcaklık
U	: Potansiyel enerjiyi
V	: Hacim
v	: Hız
W	: İş

ΔA	: Serbest enerji değişimi
ξ	: Reaksiyon koordinatı
γ	: Yüzey Gerilimi



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Simülasyonların içerdği lipit ve toplam atom sayıları ile birlikte yapılan simülasyon süreleri.....	14
Çizelge 2.2 : MTBB'nin MT'ye bağlanmasının ve kopmasının modellendiği simülasyonların toplam atom sayıları ve süreleri.....	25





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1 :** *A. aeolicus* LeuT'nin ikincil yapısı ve IF $\rightleftharpoons$ OF yapısal geçişi boyunca TM sarmalların organizasyonu. a) LeuT TM sarmalları 1'den 12 ye kadar gösterilmiştir. Yapıda TM1 ve TM6, lipit tabakanın ortasına doğru bozulmuştur ve iki sarmala ayrılmışlardır. Lösün amino asidi ve iki sodyum iyonu sırasıyla yeşil bir üçgen ve mavi daireler olarak gösterilmiştir. b) Proteinin IF $\rightleftharpoons$ OF halleri arasındaki yapısal değişimler şematik olarak gösterilmiştir. Sol panel LeuT'nin içe bakan halini (IF) gösterir ve bu halde TM1b-TM6a hücre dışına kapalı haldeyken TM1a-TM6b hücre içine açık haldedir. Sağ panel LeuT'nin dışa bakan (OF) halini gösterir ve bu halde TM1a-TM6b kapalı bir halde bulunurken TM1b-TM6a hücre dışına açık haldedir3
- Şekil 1.2 :** Apo LeuT monomer yapısı için Gur ve diğ. (2015) tarafından elde edilen enerji yüzeyi4
- Şekil 1.3 :** Sitoplazmik dinein yapısı. Dineinin birincil yapısı (a), MT'e bağlı halinin şematik gösterimi (b) ve MTBB'nin H1-H6 sarmalları (c) şekilde gösterilmiştir.....8
- Şekil 1.4 :** Sitoplazmik dinein mekanokimyasal çevrimi. 6 adet AAA bölgesinden oluşan AAA halkası, dineinin sarmal-bobin sapının alt kısmındaki MTBB ile MT'ye bağlanır. Dineinin mekanokimyasal çevrim boyunca kuvvet kolu ATP bağımlı bir şekilde konformasyonel değişikliklerden geçerek dineinin hareketini sağlar, bu süreç dineinin MT'ye bağlanma ve kopma durumlarıyla senkronize halde gerçekleşir10
- Şekil 2.1 :** LeuT'nin IFo $\rightarrow$ Ofo halleri arasındaki yapısal geçiş boyunca oluşan 7 termodinamik halinin hücre zarını temsil eden çift tabakalı lipit tabaka, su ve iyonlar varlığında hazırlanmış sistemleri. Şekilde protein, lipit başı, lipit asil zincirleri ve sular VMD programı kullanılarak sırasıyla cartoon, van der Waals, licorice ve quick surface gösterim şekli ile gösterilmiştir12
- Şekil 2.2 :** İnsan dinein-2 yapısı (PDB kodu: 4RH7) ile *M. musculus* dinein-1 (PDB kodu: 3J1T) yapılarının MTBB kısımlarının üst üste getirilmesi. Üst üste getirilmiş yapılar (a), MT'ye bağlı dinein-1 MTBB yapısı (b) ve Can ve diğ. (2019) tarafından modellenen dinein-2 yapısı (c) şekilde gösterilmiştir18
- Şekil 2.3 :** *M. musculus* dinein-1 kristal yapısındaki (PDB kodu: 3J1T) MT ile insan dinein-2 (PDB kodu: 4RH7) MTBB-sap kısmının üst üste getirilmesiyle modellenen yapı. Yapıda meydana gelen yapısal çakışma sağ panelde gösterilmektedir. Şekilde MTBB ve sap bölgesi (E2962-R3126) sarı ile gösterilirken MT'nin α ve β -tübülünleri sırasıyla pembe ve yeşil renk ile gösterilmiştir.....19
- Şekil 2.4 :** Yapısal çakışmanın ortadan kaldırılmasıyla oluşan ve MTBB'nin MT'ye bağlanmasını sağlayan MD simülasyonlarında kullanılan yapı19

- Şekil 2.5 :** MTBB'nin MT'ye bağlanmasını sağlayan MD simülasyonları için su ve iyonlar varlığında hazırlanan sistem..... **20**
- Şekil 2.6 :** MTBB'nin MT'den kopmasının SMD simülasyonları için hazırlanan sistem. SMD reaksiyon koordinat vektörü z eksenine hizalanmıştır ve mavi ok ile gösterilmiştir. **22**
- Şekil 2.7 :** MTBB'nin MT'den kopmasının SMD simülasyonlarında reaksiyon koordinat vektörü. MT'nin β -tübülünün D251-V260 sarmalının amino asitlerinin alfa karbonlarının kütle merkezinden (kırmızı küre), MTBB'nin H1-H6 sarmallarının amino asitlerinin alfa karbonlarının kütle merkezine (turuncu küre) doğru geçecek şekilde belirlenmiştir. SMD reaksiyon koordinat vektörü mavi ok ile gösterilmiştir..... **24**
- Şekil 3.1 :** LeuT'nin IFo→OFo halleri arasındaki yapısal geçiş boyunca TM1a-TM6b ve TM1b-TM6a sarmallarının simülasyonlarda değişimi. TM1, TM3, TM6, TM8 ve EL4 sırasıyla kırmızı, turuncu, açık yeşil, koyu yeşil ve mor renkte gösterilmiştir. Siyah oklar LeuT sarmallarının simülasyonlar boyunca meydana gelen hareket yönlerini göstermektedir. **29**
- Şekil 3.2 :** Apo LeuT'nin TH1-TH7 yapıları için gerçekleştirilen 150 ns'lik MD simülasyonlarından elde edilen enerji yüzeyi. Eflatun renkli kareler Gur ve diğ. (2015) tarafından elde edilen enerji yüzeyinden alınan 7 termodinamik hali temsil eden anlık yapılarıdır. Yıldız ile belirtilen noktalar yeni oluşturulan sistemlerin başlangıç konformasyonlarının alındığı anlık yapılarıdır. Gri ve siyah noktalar literatürde bulunan kristal yapılarının (PDB kodu: 3TT3, 3F3E ve 3TT1) pozisyonlarını göstermektedir. **31**
- Şekil 3.3 :** Apo LeuT'nin TH1-TH7 için MD simülasyonları ile elde edilen basınç profilleri. **31**
- Şekil 3.4 :** Literatürde bulunan kristal yapıların MTBB-MT etkileşimleri. Şekilde MTBB sarı, MT'nin α -tübülün ve β -tübülün kısımları sırasıyla pembe ve sarı renkler ile gösterilmiştir. Kutucuk numaralandırmaları ile MTBB amino asitleri özdeşleştirilmiştir ve aynı amino asit için aynı renk ve numara kullanılmıştır..... **33**
- Şekil 3.5 :** Simülasyon sonucu elde edilen yapıdaki MTBB-MT etkileşimleri. Şekilde MTBB sarı, MT'nin α -tübülün ve β -tübülün kısımları sırasıyla pembe ve sarı renkler ile gösterilmiştir. Kutucuk numaralandırmaları Şekil 3.4, MTBB amino asitleri ile özdeşleştirilmiş ve aynı amino asit için aynı renk ve numara kullanılmıştır. **36**
- Şekil 3.6 :** İnsan dinein-2 (PDB kodu: 4RHY) ve *M. musculus* dinein-1'e (PDB kodu: 3J1T, 3J1U, 6RZB) ait MTBB'lerinin sekans hizalaması. Sekans hizalaması yapılırken, yapıların PDB veri tabanından (www.rcsb.org) (Berman ve diğ, 2003) elde edilen FASTA sekanslarından MTBB'leri alınarak, UniProt veri tabanındaki (Consortium, 2018) hizalama aracı kullanılmıştır. Hizalamada renkli olarak gösterilen amino asitler yapılarıdaki etkileşimleri temsil etmektedir ve renkler önceki şekiller ile özdeşleştirilmiştir. **37**
- Şekil 3.7 :** MTBB-MT etkileşimlerinin simülasyon süresi boyunca değişen Mesafe-Zaman ve Mesafe-Yüzde Dağılım grafikleri. 6 Å mesafedeki etkileşimlerin sınırı kesikli çizgi ile gösterilmiştir Şekilde numaralandırmalar Şekil 3.5 ve MTBB amino asitleri ile özdeşleştirilmiştir **38**

- Şekil 3.8 :** MTBB'nin MT ile etkileşimlerinin simülasyon boyunca değişimleri. Şekilde MTBB'nin MT'nin β -tübülünü ile olan etkileşimleri yeşil ile gösterilirken, α -tübülünü ile olan etkileşimleri pembe ile gösterilmiştir. .41
- Şekil 3.9 :** Serbest enerjinin MTBB-MT arasındaki mesafeye göre değişimi42
- Şekil A.1 :** İnsana ait dinein-2 yapısının (PDB kodu:4RH7) sap ve MTBB kısımlarının sekansı ve sekans üzerinde alfa sarmalların gösterimi48
- Şekil A.2 :** İnsana ait dinein-2 yapısı (PDB kodu:4RH7) ile *M. Musculus* dinein-1 yapısının (PDB kodu:3J1T) MTBB-sap kısımlarının sekans hizalaması. Sekans hizalaması yapılırken, yapıların PDB veri tabanından (www.rcsb.org) (Berman ve diğ, 2003) elde edilen FASTA sekanslarından MTBB'leri alınarak, UniProt veri tabanındaki (Consortium, 2018) hizalama aracı kullanılmıştır48
- Şekil B.1 :** MTBB'nin MT'ye bağlanmasını sağlayan 200 ns'lik MD simülasyonunun 10. ns'si için MTBB-MT etkileşimleri49





MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI KULLANILARAK LÖSİN TAŞIYICI PROTEİNLERİN VE DİNEİN MOTOR PROTEİNLERİN TERMODİNAMİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Hücrelerin düzgün bir şekilde çalışabilmesi ve canlılığın devamı için proteinler temel unsurlardır. Taşıyıcı ve motor proteinler hücrede çok çeşitli görevleri yerine getirerek hücrelerin organizasyonu ve düzenlenmesinde önemli rol alırlar. Biyomoleküler makina olarak çalışan bu proteinler fonksiyonlarını gerçekleştirmek için termodinamik bir çevrim üzerinde çalışır ve çevrim boyunca yapısal bir geçişi tamamlarlar. Çevrim boyunca proteinin termodinamik özellikleri değişmektedir ve proteinin yapı ve fonksiyonunu kavramak için bu değişimin anlaşılması çok önemlidir. Bu tez çalışmasında, iki protein için çevrim boyunca değişen farklı termodinamik özellikler moleküler dinamik (MD) simülasyonları ve istatistiksel termodinamik yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak MD simülasyonları ve istatistiksel termodinamik yöntemleri kullanılarak lösin taşıyıcı proteinin (LeuT) termodinamik çevrimi boyunca serbest enerji yüzeyi oluşturulmuş ve bu proteinin çevrim boyunca çift katmanlı lipit tabaka üzerine yaptığı basınç profili elde edilmiştir. İkinci olarak dinein motor proteininin mikrotübüle (MT) bağlanma ve kopması MD simülasyonları ile modellenmiş ve bu bağlanma kopma çevrimi boyunca proteinin serbest enerji profili Jarzynski eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

LeuT, hücre zarına gömülü halde bulunur ve lösin, alanin gibi küçük amino asitleri hücre zarı boyunca taşımada görevlidir. Bu protein sodyum simport taşıyıcıları (neurotransmitter: sodium symporter, NSS) ailesine aittir. NSS taşıyıcı proteinler ikincil taşıyıcı proteinlerdir ve bu proteinler hücre zarı boyunca iyonların konsantrasyon gradyanından gelen enerjiyi kullanarak substratların taşınmasını sağlarlar. LeuT dimerik bir yapıya sahiptir ve yapıdaki her bir monomer 12 transmembran (TM) sarmaldan oluşur. Bu sarmallar iki ters 5-sarmal tekrarı (TM1-5 TM6-10) halinde düzenlenmişlerdir ve TM1-TM6 ile TM3-TM8 sarmallarının orta kısımları substrat bağlanma bölgesi olarak bulunur. LeuT, lösin veya alanin amino asitlerine ek olarak iki adet sodyum bağlanma bölgesine (Na1 ve Na2) sahiptir. Termodinamik çevrimi boyunca LeuT'nin TM1a-TM6b ve TM1b-TM6a sarmalları hücre içine bakan (IF) ve hücre dışına bakan (OF) yapılar oluşturmak üzere hareket ederler. LeuT IF ve OF yapıları ise hücre içi ve dışı ortamlarına açık (IFo ve OFo) ve kapalı (IFc ve OFc) halde bulunabilmektedir. Substrat taşıma çevrimi boyunca LeuT hücre dışına bakan açık halinden hücre içine bakan açık halleri arasında geçiş yaparken çeşitli termodinamik hallerden geçmektedir. Bu termodinamik haller boyunca LeuT yapısal olarak değişir ve bu değişim çift katmanlı lipit tabaka üzerinde bir basınca neden olur.

Bu tez çalışması ile LeuT'nin IFo→OFo halleri arasındaki TM sarmallarının hareketlerindeki değişim geçiş ölçeğinde MD simülasyonları ile incelenmiş ve bu simülasyonlardan gelen basınç verileri kullanılarak lipit tabaka üzerindeki basınç

profilleri 7 farklı termodinamik hal için elde edilmiştir. Gur ve diğ. (2015) tarafından dimerik formdaki LeuT kullanılarak LeuT monomerinin serbest enerji yüzeyi oluşturulmuştur. Bu tez çalışmasında Gur ve diğ. (2015) tarafından oluşturulan enerji yüzeyinden apo LeuT'nin OFo $\rightleftharpoons$ IFo halleri boyunca görülen 7 termodinamik hali temsilen monomer haldeki yapılar seçilmiştir. Seçilen monomer yapılar VMD programı kullanılarak çift katmanlı lipid tabakanın merkezine yerleştirilmiştir. Daha sonra lipid tabaka üzerine yerleştirilen protein yapıları fizyolojik şartların sağlanması için VMD programının "Solvate v1.5" eklentisi kullanılarak su içinde çözülmüş ve "Autoionize v1.5" eklentisi kullanılarak NaCl ile iyonize edilmiştir. Elde edilen sisteme NAMD programı kullanılarak ilk başta minimizasyon ve dengeleme simülasyonları yapılarak sistemin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Dengeye gelen sistemlerin yapısal geçişi boyunca lipid tabaka üzerindeki basınç değişiminin anlaşılması için her bir hal için 150 ns MD simülasyonları yapılmıştır ve bu simülasyonlardan basınç verileri elde edilmiştir. Yapılan MD simülasyonlarından gelen geniş yapısal değişiklik verileri kullanılarak Gur ve diğ. (2015) tarafından oluşturulan serbest enerji yüzeyi monomer haldeki apo LeuT yapıları için yeniden elde edilmiştir. Elde edilen simülasyon verileri kullanılarak lipid tabaka üzerinde oluşan basınç profili basınç hesabı yapılarak oluşturulmuştur. Gur ve diğ. (2015) tarafından dimerik formdaki LeuT kullanılarak oluşturulan serbest enerji yüzeyi LeuT'nin monomer hali için tekrardan simülasyon verilerinden oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen MD simülasyonlarıyla LeuT monomer yapısının toplamda 7 minimum noktadan geçtiği ve bu noktaların sırasıyla IFo, IFc1, IFc2a, IFc2b, IFc2c, IFc3 ve OFo hallerini temsil ettiği bu tez çalışması ile belirlenmiştir. Monomer haldeki LeuT için yapılan MD simülasyonlarından her termodinamik hal için ayrı ayrı basınç profili çıkarılmıştır.

Dinein motor proteini hücre içinde bulunan organeller, virüsler, transkripsiyon faktörleri, proteinler ve mRNA gibi kargoları MT'nin eksi ucuna taşımakla görevlidir. Dinein iki özdeş ağır zincirden oluşan homodimerik haldedir ve her bir ağır zincirde bir motor bölgesi bulunmaktadır. Bu motor bölgesinde baş olarak adlandırılan ve 6 AAA+ bölgesinin bir araya gelmesinden oluşan bir hekzamerik halka bulunmaktadır. Motor bölgesi baş bölgesine ek olarak kuvvet kolu, sap ve payanda olarak adlandırılan ve AAA halkasında uzanan üç çıkıntı içerir. Kuvvet kolunun devamında kuyruk bölgesi bulunmaktadır ve bu bölge dineinin taşıdığı kargoların bağlanmasında görev alır. AAA halkasında AAA1-4 bölgeleri ATP bağlanmasında ve hidrolizinde görev alır ve AAA1 bölgesi dineinin hareketinden sorumludur. ATP hidrolizinden çıkan enerji ile kuvvet kolu hareket eder ve mekanik iş üretir. ATP hidrolizi ile kuvvet kolu AAA3-AAA4 pozisyonundaki düz yapısından AAA2-AAA3 pozisyonundaki bükük yapısına geçer. Dinein sapı CC1 ve CC2 sarmallarından oluşmaktadır ve bu sarmallar birbiriyle etkileşerek sarmal-bobin yapısı oluştururlar. Sapın alt kısmında mikrotübül bağlama bölgesi (MTBB) bulunmaktadır ve bu bölge altı alfa sarmaldan (H1-H6) oluşmaktadır. MTBB'nin H1 sarmalı sapın CC1 sarmalı ile doğrudan bağlanır. Dinein termodinamik çevrimi boyunca en az 5 termodinamik halden (TH1-TH5) geçer ve bu haller ATP bağlanma, hidrolizi ve salınmasına göre değişir. Çevrim, nükleotit bağlı olmayan apo haldeki dinein ile başlar ve bu halde (TH1) kuvvet kolu düz bir yapıdayken dineinin MTBB'si MT'ye bağlı durumdadır. Dineinin AAA1 bölgesine ATP bağlanmasıyla dinein sapının sarmal bobin yapısında bir kayma oluşur ve dinein MT'den kopar (TH2). MT'den kopma üzerine ATP hidrolizi başlar ve kuvvet kolu düz yapıdan bükük yapıya geçer (TH3). Dinein MT'ye tekrar bağlanır ve fosfat salınır (TH4). Fosfat salınmasıyla dineinin kuvvet kolu yeniden düz hale geçer (TH5) ve ADP

salınır. ADP salınması ile dinein bir termodinamik çevrimi tamamlar ve başlangıç yapısına tekrar döner.

Bu tez çalışması ile dineinin MT'ye bağlanması ve kopması ileri MD simülasyonları kullanılarak modellenmiş ve simülasyonlardan elde edilen veriler Jarzynski eşitliği kullanılarak serbest enerji değişiminin hesaplanması için kullanılmıştır. Dineinin MT'e bağlanmasının modellenmesi için ilk olarak eksiksiz bir dinein yapısı ile MT yapısı VMD programı kullanılarak üst üste getirilmiştir. Üst üste getirilen yapıda dinein sap kısmından kesilip MT'e bağlı halde MTBB-sap yapısı elde edilmiştir. MTBB ile MT arasında yapısal çakışma gözlemlenmesinden dolayı dinein MT'den bir miktar uzaklaştırılmış ve yeni yapı oluşturulmuştur. Oluşturulan bu yapı fizyolojik şartların sağlanması için VMD programının "Solvate v1.5" eklentisi kullanılarak su içinde çözülmüş ve "Autoionize v1.5" eklentisi kullanılarak NaCl ile iyonize edilmiştir. Hazırlanan sistem NAMD programı kullanılarak minimizasyon ve dengeleme simülasyonları yapılarak dengeye getirilmiştir. Dengeye gelen sistem MT'ye bağlı MTBB yapısının modellenmesi için 200 ns MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra MT'ye bağlanan dinein yapısının tekrardan koparılması için yönlendirilmiş MD (İngilizcesi steered MD, SMD) simülasyonları yapılmıştır. Bu SMD simülasyonlarında başlangıç noktaları olarak, MD simülasyonlarından elde edilen MT'ye bağlı dinein yapısının 50. ve 100. ns'lerinden anlık yapıların 1 ns aralıklarla 5 kez örneklenmesiyle elde edilen 10 farklı yapı kullanılmıştır. Her bir yapı için ayrı ayrı 10 ns SMD simülasyonu yapılarak dinein MTBB'sinin MT'den kopması modellenmiştir. SMD simülasyonları boyunca elde edilen veriler ve Jarzynski eşitliği kullanılarak serbest enerjinin MTBB-MT arasındaki mesafeye göre değişimini hesaplanmıştır. Dineinin MT'ye bağlanması sırasında oluşan elektrostatik etkileşimlerin analiz edilmesi için literatürdeki MTBB-MT bağlı yapılar incelenmiş ve bu farklı afinitedeki yapıların MTBB ile MT arasındaki etkileşimleri belirlenmiştir. Daha sonra MTBB'nin MT'ye bağlandığı MD simülasyonları incelenerek, literatürdeki etkileşimler ile MD simülasyonlarındaki etkileşimler detaylı olarak karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak MD simülasyonları boyunca söz konusu etkileşimlerin değişimleri incelenmiş ve elde edilen etkileşimlerin simülasyon süresi boyunca değişen Mesafe-Zaman ve Mesafe-Yüzde Dağılım grafikleri elde edilmiştir.



INVESTIGATION OF THERMODYNAMIC PROPERTIES OF LEUCINE TRANSPORTERS AND DYNEIN MOTOR PROTEINS USING MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS

SUMMARY

Proteins are essential for the proper functioning of cells and the maintenance of viability. Proteins such as transporters and motors, are involved in a wide variety of roles in the cell which are providing the regulation and organization of cell function. Operating as a biomolecular machine, these proteins work on a thermodynamic cycle to perform their functions and complete a structural transition. During the cycle, thermodynamic properties of the protein change and it is important to understand the structure and function of the protein. In this thesis, change in the different thermodynamic properties of two proteins during their cycle are investigated using molecular dynamics (MD) simulations. Firstly, energy landscapes during the thermodynamic cycle of leucine transporter (LeuT) was constructed and the pressure profile of this protein on the lipid bilayer during cycle was generated using MD simulations. Secondly, the binding and release of the dynein motor protein to the microtubule (MT) was modeled by MD simulations and the free energy profile of the protein during the thermodynamic cycle was generated using the Jarzynski equality.

LeuT is embedded in the cell membrane and is responsible for transporting small amino acids such as leucine and alanine along the cell membrane. This protein belongs to the family of neurotransmitter: sodium symporters (NSS) which are secondary active transporters. NSS members transports substrates using energy arising from the movement of ions down their concentration gradient along the cell membrane. LeuT has a dimeric structure and each monomer in the structure consists of 12 transmembrane (TM) helices. These helices are arranged in two inverted 5-helix repeats (TM1-5 TM6-10). The substrate binding site is located in the middle regions of TM1-TM6 and TM3-TM8 helices. LeuT has two sodium binding sites (Na1 and Na2) in addition to the leucine or alanine amino acids. During the thermodynamic cycle, the TM1a-TM6b and TM1b-TM6a helices of LeuT move to form the inward-facing (IF) and the outward-facing (OF) states. Based on their accessibility to the intra and extracellular mediums those states can be classified as closed (IF_c and OF_c) and open (IF_o and OF_o) (sub)states. During the LeuT OF_o⇌IF transitions, LeuT visits several (sub)states. The structure and dynamics of LeuT changes during transitions, which in turn affects the pressure on the lipid bilayer.

In this thesis, the movement of TM helices during the IF_o→OF_o LeuT transition pathway were examined by MD simulations. By using pressure data from these simulations, the pressure profiles on the lipid bilayer were obtained for 7 different thermodynamic states. The energy landscape of LeuT monomer was generated by Gur et al. (2015) using LeuT in dimeric form. The monomeric conformers of apo LeuT were selected from the energy landscape generated by Gur et al. (2015) to represent the 7 thermodynamic states seen during the IF_o→OF_o transitions. The selected

monomers were placed in the center of the lipid bilayers and structures were merged with the “MergeStructs v1.1” tool of VMD. The protein structures placed on the lipid bilayer were then solvated in water with “Solvate v1.5” tool of VMD. Using “Autoionize v1.5” tool in VMD, obtained system was ionized with NaCl to provide the ionic charge balance. To equilibrate the generated systems, firstly minimization and equilibrium simulations were performed using NAMD software. In order to understand the pressure profile of the protein on the lipid bilayer during its structural transition, a set of MD simulations each of 150 ns length were performed. Energy landscape generated by Gur et al. (2015) was reconstructed using the conformational transition data obtained from the new set of apo LeuT monomer MD simulations. The following 7 minima along the IFo→OFO transitions were identified; IFo, IFc1, IFc2a, IFc2b, IFc2c, IFc3 and OFo states. Pressure profiles for each thermodynamic state were obtained from the MD simulations performed for apo LeuT monomers.

Dynein motor protein is responsible for transporting cargoes such as organelles, viruses, transcription factors, proteins and mRNA to the minus end of MT. Dynein is in homodimeric structure consisting of two identical heavy chains each having a motor domain. In this motor domain, 6 AAA+ site is arranged as a hexameric ring, called the head. In addition to the head region, the motor domain comprises three protrusions, called the linker, the stalk and the buttress, all extend from the AAA ring. In addition to these protrusions, a tail domain extends from the N terminus of the linker. For dimerization and cargo binding of dynein, this tail domain is necessary. The AAA1-4 sites in the AAA ring are involved in ATP binding and hydrolysis, but only the AAA1 site is responsible for the motility of dynein. With the energy from the ATP hydrolysis, the linker produces a mechanical work with the conformational change. By ATP hydrolysis, linker undergoes a conformational change and moves from straight conformation in which linker is positioned in AAA3-AAA4 to bent conformation in which linker is positioned in AAA2-AAA3. The stalk consists of the two helices (CC1 and CC2), which interact with each other to form a coiled coil. At the end of the stalk, there is microtubule binding domain (MTBD) consists of six alpha helices (H1-H6). During mechanochemical cycle of dynein, there are five thermodynamic states associated with ATP binding, hydrolysis, and release. The cycle begins with apo dynein, which is non-nucleotide bound, and in this state (1) the MTBB is bound to the microtubule (MT) with the linker in its straight conformation. Following the binding of ATP to AAA1, a shift occurs in the coiled coil stalk and MTBD of dynein is released from MT (2). Upon release from MT, ATP hydrolysis begins and linker transforms into the bent conformation (3). Dynein rebinds to the MT and phosphate is released (4). Linker of ADP bound dynein returns back to its straight conformation (5) and dynein releases ADP. With the release of ADP, a thermodynamic cycle of dynein is completed, returning back to its initial state.

In this thesis, MTBD binding to MT and MTBD release from MT were modeled using advanced MD methods and data obtained from simulations were used for calculations of free energy change by Jarzynski equality. In order to model the MT binding of dynein, firstly complete dynein structure and MT structure were superimposed using VMD. MT bound MTBD-stalk structure was obtained from superimposed structure by truncating the structures other than stalk and MTBD of dynein. Due to a steric clash observed between MTBD and MT, dynein was first slightly moved away from MT without changing its relative pose to the MT. To provide physiological conditions, this structure was solvated in water using “Solvate v1.5” tool of VMD and ionized with

NaCl using “Autoionize v1.5” tool in VMD. Subsequently, system was equilibrated by minimization and equilibrium MD simulations using NAMD software.

In order to model the binding of dynein MTBD to MT, MD simulations of the equilibrated system were performed for 200 ns. Subsequently, steered MD (SMD) simulations were performed to investigate the work required to release/unbind dynein from MT. As the starting structure of these SMD simulations, the structures were selected from the 50. and 100. ns of the MD simulations for 200 ns. These structures were sampled 5 times at 1 ns interval by MD simulations and 10 different structures were obtained. For each structure, 10 ns SMD simulation was performed and the unbinding of the dynein MTBD from MT was modeled. Using the data obtained from the SMD simulations and the Jarzynski equality, the free energy profile as a function of the distance between MTBD and MT was constructed. MTBD-MT bound structures in the literature were analyzed and the interactions between MTBD and MT in these different affinity structures were determined. MD simulations of binding of MTBD to MT were investigated and compared in detail with the literature. In addition, the changes of these interactions during MD simulations were investigated, and distance-time and distance distribution graphs for the residues involved in those interactions were constructed.



1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışması ile moleküler dinamik (MD) simülasyonları ve istatistiksel termodinamik yöntemleri kullanılarak lösin taşıyıcı proteinlerin (LeuT) ve dinein motor proteinlerin termodinamik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. MD simülasyonları, atomların ve moleküllerin fiziksel hareketlerini modellemek ve analiz etmek için etkin bir yöntemidir. Tez kapsamında MD simülasyonları ile LeuT'nin işlevsel hareketini yaptığı termodinamik çevrimi boyunca çift katmanlı lipid tabaka üzerinde oluşturduğu basınç etkisi ve dinein motor proteininin termodinamik çevrimi boyunca mikrotübüle (MT) bağlanma ve kopma mekanizması incelenmiştir. MD simülasyonlarından elde edilen verilere istatistiksel termodinamik yöntemleri uygulanarak LeuT'nin çift katmanlı lipid tabaka üzerindeki basınç profilleri ve dinein proteininin MT'ye bağlanma/kopma serbest enerjisi hesaplanmıştır. Böylece termodinamik bir çevrim boyunca LeuT'nin lipid tabaka üzerindeki etkisinin ve dinein proteininin MT'ye bağlanma/kopma mekanizmasının atomik seviyede aydınlatılması amaçlanmıştır.

1.2 Lösin Taşıyıcı Protein

Nörotransmitterler, nöronlar arasındaki iletişimi sağlayan küçük sinyal molekülleridir. Bu moleküller presinaptik nöronların sinir uçlarını ve postsinaptik nöronların dendritlerini birbirine bağlayan sinaps adı verilen nöronal boşlukta sinyalleri iletirler (Jessell ve Kandel, 1993). Nöronal aktivitenin düzenlenmesinde çok çeşitli nörotransmitterler yer almaktadır. Sinyalin nörona gelmesinin bir sonucu olarak nörotransmitterler, presinaptik nöronlardan sinapsa kalsiyum bağımlı bir şekilde salınır. Salınan nörotransmitterler, postsinaptik nöronlar üzerinde bulunan reseptörlere ve iyon kanallarına bağlanarak onları aktive eder. Nörotransmitterler bu nöronlarda uyarıcı veya inhibe edici sinyaller üretir ve postsinaptik nöronlardan akarlar (Amara

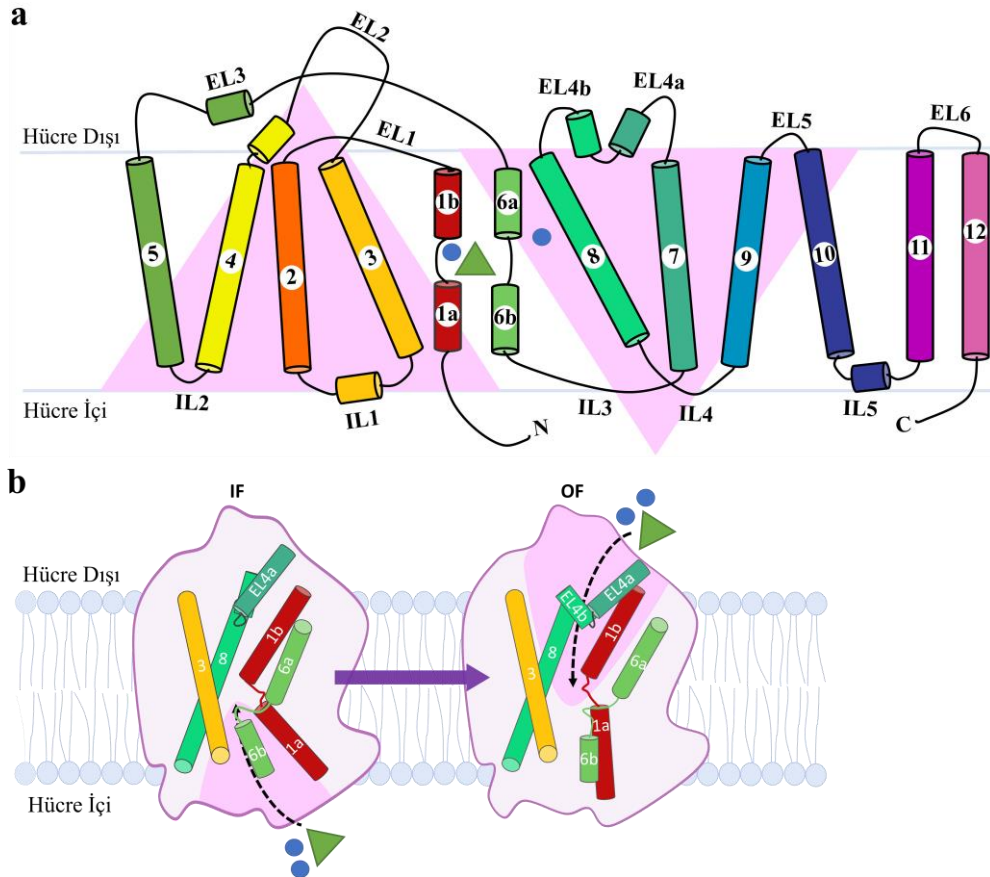
ve Kuhar, 1993). Böylece, sinyal presinaptik nöronlardan postsinaptik nöronlara sinaps boyunca kimyasal olarak iletilir.

Merkezi ve periferik sinir sistemlerindeki kritik işlevleri nedeniyle, nörotransmitterlerin sinapsta belli bir zaman ve yerdeki seviyelerini kontrol etmek son derece önemlidir. Nörotransmitter taşıyıcılar, sinapsta biriken nörotransmitterlerin presinaptik nöronlara veya glia hücrelerine geri alınmasını sağlayarak bu seviyeleri kontrol eder (Iversen ve Kelly, 1975; Amara ve Kuhar, 1993). Bu ikincil taşıyıcı proteinler, hücre zarı boyunca iyonların (Na^+ ve Cl^-) konsantrasyon gradyanından kaynaklanan enerjiyi kullanarak nörotransmitterlerin taşınmasını sağlarlar (Rudnick, 1998). Neurotransmitter taşıyıcı proteinler sodyum simport taşıyıcıları (neurotransmitter:sodium symporter, NSS) ailesine aittir (Kristensen ve diğ, 2011). NSS ailesi; dopamin, serotonin, noradrenalin, GABA gibi nörotransmitterleri ve lösin gibi amino asitleri taşıyan üyeleri içerir (Kristensen ve diğ, 2011). Sinir sistemindeki önemli rollerinden dolayı, NSS taşıyıcılarının yapı ve fonksiyonlarındaki bozukluklar çok sayıda nörolojik hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle NSS ailesi üyeleri söz konusu hastalıklara karşı çok çeşitli ilaçlar için hedef olarak ilgi çekmektedir (Torres ve diğ, 2003).

Kristalografik olarak yapısı çözülen ilk NSS taşıyıcı, *Aquifex aeolicus* bakterisine ait olan lösin taşıyıcı proteindir (LeuT, PDB kodu: 2A65) (Yamashita ve diğ, 2005). Bu taşıyıcı protein, kendisi ile homolog olan memeli NSS üyeleri hakkında bilgi sağlamak için yapısal bir modeldir. LeuT, lösin ve alanin gibi küçük amino asitlerin bakteriyel hücre zarı boyunca taşınmasından sorumludur. LeuT yapısı dimerik haldedir ve dimeri oluşturan her bir monomer 12 adet transmembran (TM) sarmaldan oluşur. Bu sarmallardan on tanesi birbirine ters iki 5-sarmal tekrarı (TM1-5 ve TM6-10) halinde organize olmuştur (Şekil 1.1a) (Yamashita ve diğ, 2005; Forrest ve diğ, 2008). TM1 ve TM6'nın α -sarmal geometrileri, çift katmanlı lipid tabakanın ortasına doğru bozulur. Bu sarmalların α -karbonil ve α -amid grupları ile TM3 ve TM8'in orta bölgeleri substrat (Leu, Ala veya diğer amino asitler) için bağlama bölgesi olarak görev alır. Bakteriyel LeuT yapısında, TM1 ve TM6'nın lösin bağlanma bölgesinin yakınında ayrıca iki sodyum iyonu için Na1 ve Na2 olarak adlandırılan bağlanma bölgeleri mevcuttur (Yamashita ve diğ, 2005). Lipid tabaka boyunca, LeuT'nin TM1a-TM6b ve TM1b-TM6a sarmalları sırasıyla hücre içine ve hücre dışına bakan açıklıkları oluşturacak şekilde hareket etmektedirler (Şekil 1.1b) (Yamashita ve diğ, 2005; Gur

ve diğ, 2017). Bu hareket sonucunda hücre içi ve dışına bakan kapıların açılıp kapanması sağlanır.

LeuT'nin hücre içine bakan (inward-facing, IF) ve hücre dışına bakan (outward-facing, OF) halleri, TM sarmallarının paketlenme durumuna göre bağlanma cebinin sırasıyla hücre içi ve hücre dışı bölgeye bakmasını temsil etmektedir. Bu ana hallere ek olarak LeuT, IF $\rightleftharpoons$ OF halleri arasındaki yapısal geçişi boyunca birçok (alt)hali ziyaret eder.



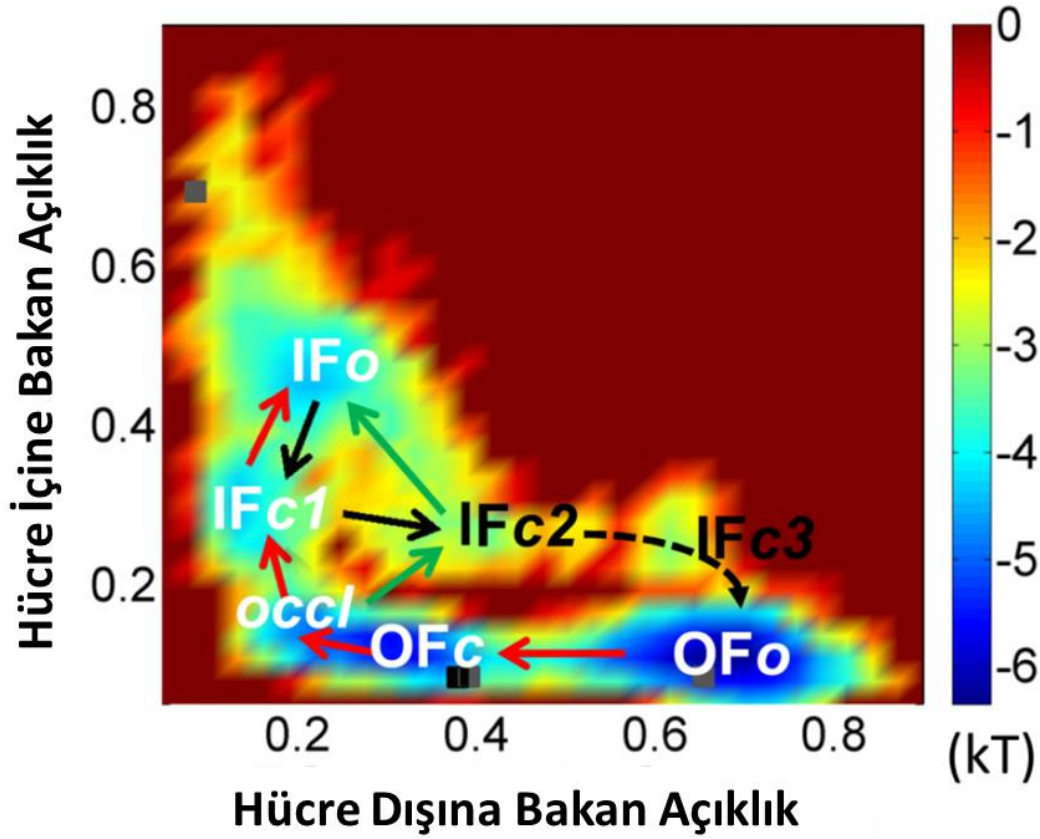
Şekil 1.1 : A. *aeolicus* LeuT'nin ikincil yapısı ve IF⇌OF yapısal geçişi boyunca TM sarmallarının organizasyonu. a) LeuT TM sarmalları 1'den 12'ye kadar gösterilmiştir.

Yapıda TM1 ve TM6, lipid tabakanın ortasına doğru bozulmuştur ve iki sarmala ayrılmışlardır. Lösin amino asidi ve iki sodyum iyonu sırasıyla yeşil bir üçgen ve mavi daireler olarak gösterilmiştir. b) Proteinin IF⇌OF halleri arasındaki yapısal değişimler şematik olarak gösterilmiştir. Sol panel LeuT'nin içe bakan halini (IF) gösterir ve bu halde TM1b-TM6a hücre dışına kapalı haldeyken TM1a-TM6b hücre içine açık haldedir. Sağ panel LeuT'nin dışa bakan (OF) halini gösterir ve bu halde TM1a-TM6b kapalı bir halde bulunurken TM1b-TM6a hücre dışına açık haldedir.

A. *aeolicus* bakterisine ait olan LeuT (PDB kodu: 2A65) yapısal olarak dışa bakan (OF) haldedir ve yapıya substrat bağlıdır (Yamashita ve diğ, 2005). Söz konusu yapının hücre dışına bakan açıklığı substrat tarafından doldurulmuştur ve bu yüzden

yapı dışı bakan dolu (outward-facing closed(occluded), OFc) alt hal olarak isimlendirilir.

OFc alt halinde, TM sarmallar hücre dışına doğru bir açıklık oluşturur ve bu açıklık substrat ve iyonların tekrar hücre dışına kaçmasını önlemek için tıkanmış haldedir. LeuT yapısı OFc alt haline ek olarak diğer (alt)hallerde de çözülmüştür. Literatürde Na^+ bağlı, substrat bağlı olmayan OF açık (OFo) hal (PDB kodu: 3TT1) (Krishnamurthy ve Gouaux, 2012), sodyum ve substrat taşınmadan önceki Na^+ bağlı olmayan hal (PDB kodu: 5JAG) (Malinauskaite ve diğ, 2016), ve substrat/ Na^+ bağlı olmayan IF açık (IFo) (PDB kodu: 3TT3)(Krishnamurthy ve Gouaux, 2012) hal gibi sayısız yapı mevcuttur ve bu yapılar moleküler dinamik (MD) simülasyonları için çok geniş bir yapısal data sunmaktadır. Dahası, Gur ve diğ. (2015), dimerik formdaki apo LeuT'nin OFo $\rightleftharpoons$ IFo halleri arasındaki yapısal geçişi örneklemiş ve bu geçiş boyunca LeuT monomerinin serbest enerji yüzeyini elde etmişlerdir. Söz konusu enerji yüzeyinde protein yapısal geçiş boyunca minimum noktalardan geçmektedir ve OFo $\rightleftharpoons$ IFo halleri arasındaki (alt)halleri ziyaret etmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 : Apo LeuT monomer yapısı için Gur ve diğ. (2015) tarafından elde edilen enerji yüzeyi.

LeuT taşıma çevrimi boyunca protein önemli yapısal değişikliklerden geçer. Bu yapısal değişiklikler boyunca TM helislerinin hareketi ile çift katmanlı lipid tabakanın yan yüzeylerine bir itme oluşur ve bu itme lipid tabaka üzerinde basınca neden olur. Bu tez çalışması ile monomer haldeki apo LeuT'nin IFO→OFO halleri arasındaki yapısal geçiş geniş ölçekte MD simülasyonları ile simüle edilerek, TM sarmallarının hareketleri gözlemlenmiş ve bu hareketlerin çift katmanlı lipid tabaka üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada Gur ve diğ. (2015) tarafından elde edilen enerji yüzeyi yeniden oluşturulmuş ve LeuT için IFO→OFO halleri arasındaki (alt)haller ayrıntılı olarak belirlenmiştir. Belirlenen her biri alt hal için dimerik formdaki proteinden tek bir monomer alınarak çift katmanlı lipid tabaka varlığında MD simülasyonları yapılmıştır. Simülasyonlar ile lipid tabaka üzerinde proteinin oluşturduğu basınç etkisi incelenmiş ve her bir alt hal için basınç profili elde edilmiştir. Bu tez çalışması ile literatürde ilk kez bir taşıyıcı proteininin termodinamik çevrimi boyunca yapısal değişimleri incelenerek basınç profili oluşturulmuştur.

1.3 Dinein Motor Proteinini

Ökaryotik hücrelerin düzgün çalışması için hücre içi organizasyon, düzenleme ve hareketlilik gereklidir. Bu organizasyonun çoğu motor proteinler tarafından hücre içi kargoların taşınması ile sağlanır. Motor proteinler hücre iskeleti boyunca ATP'ye bağımlı olarak farklı yönlerde kargo taşınmasını sağlayan miyozin, kinezin ve dinein olmak üzere üç aileye sahiptir (Mocz ve Gibbons, 2001) Bir MT filament ağında, kinezin proteini kargoları MT'nin artı ve eksi ucuna taşırken, dinein proteini yalnızca eksi uca doğru taşıma gerçekleştirir (Vallee ve diğ, 2004; Roberts ve diğ, 2013; Reck-Peterson ve diğ, 2018). Sitoplazmik dinein hücre içinde çeşitli yolaklarla etkileşim halindedir. Hücre bölünmesi sırasında dineinler; zara bağlı organeller, virüsler, transkripsiyon faktörleri, proteinler ve mRNA'lar gibi kargoları hücre çekirdeğine doğru taşırlar. Dinein, nöronlarda kargoların geri yönde taşınmasında görev alarak nöronal göç, büyüme ve sinaps oluşumunda önemli rol oynar. Dinein fonksiyonunda bozukluklar olması, motor nöronlarda dejenerasyon ve duyuşal nöropati, amiotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer, lissensefali ve şizofreni dahil olmak üzere sayısız nörodejeneratif hastalık ve bozuklukla ilişkilendirilmiştir (Roberts ve diğ, 2013; Reck-Peterson ve diğ, 2018). Ayrıca dineinin hücre bölünmesinde de çok önemli roller oynaması, dineini kanser tedavisinde potansiyel bir hedef haline getirmektedir.

Tıbbi bir tedavinin geliştirilmesinin ilk aşaması hastalığa sebep olan fonksiyonel aksaklığın ne olduğunun belirlenmesidir. Fonksiyonel bir aksaklığın belirlenebilmesi için ise söz konusu proteinin sağlıklı bir bireyde nasıl çalıştığının bilinmesi gerekmektedir. Bu bilgi bilindiği takdirde sağlıklı ve sağlıklı bireylerdeki proteinlerin yapısı ve nasıl çalıştığı karşılaştırılabilir. Bu karşılaştırma sonucu aradaki farklılıkları giderecek tıbbi tedavi yöntemi ve stratejileri geliştirebilir. Tıbbi önemine ek olarak, dinein proteini nanoteknoloji alanında da son derece önemli bir yere sahiptir. Dineinlerin hem bütün olarak hem de parçalar halinde nanoteknolojik uygulamalarda kullanılması son yıllarda gündeme gelmiş ve ilgi çekmeye başlamış bir konudur (Burgess ve diğ., 2003; Roberts ve diğ., 2009; Schmidt ve diğ., 2015; Furuta ve diğ., 2017). Furuta ve diğ. (2017) bu konuda dinein motor bölgesini kullanarak uyguladıkları sentetik stratejileri ile, yapay bir yol boyunca çalışan nano ölçekli biyomoleküler makinaların üretilmesine yönelik bir yaklaşım sunmuşlardır. Hem tıbbi hem de nanateknolojik önemi göz önüne alındığında sitoplazmik dinein motor proteininin nasıl çalıştığının anlaşılması ve bu protein çalışırken ne tür fonksiyonel aksaklıkların meydana geldiğinin anlaşılması son derece önem arz etmektedir.

Sitoplazmik dinein, iki özdeş ağır zincir ve birkaç ilişkili zincirden oluşan homodimerik (1.4 MDa) bir yapıya sahiptir. Ağır zincirlerden her birinde bir motor bölgesi mevcuttur (Perrone ve diğ., 2003). Bu motor bölgesi baş olarak adlandırmıştır ve katalitik bir hekzamerik halka yapısında düzenlenmiş altı tane AAA+ (AAA1-6) bölgesi içermektedir (Vale, 2003). Baş bölgesi 130 Å çapında ve 65 Å kalınlığında olmakla beraber ortasında 35 Å çapında bir boşluk bulunmaktadır (Kon ve diğ., 2012). Dinein motoru baş bölgesine ek olarak, AAA+ bölgelerinden çıkan üç uzantı içerir ve bu uzantılar sırasıyla kuvvet kolu, sap, payanda olarak adlandırılır (Şekil 1.3). Ayrıca sitoplazmik dineinde iki ağır zinciri birbirlerine bağlayan ve kuvvet kolunun devamında bulunan kuyruk bölgesi mevcuttur. Sitoplazmik dineinlerin taşıdığı kargolar bu kuyruk bölgesine bağlanmaktadır.

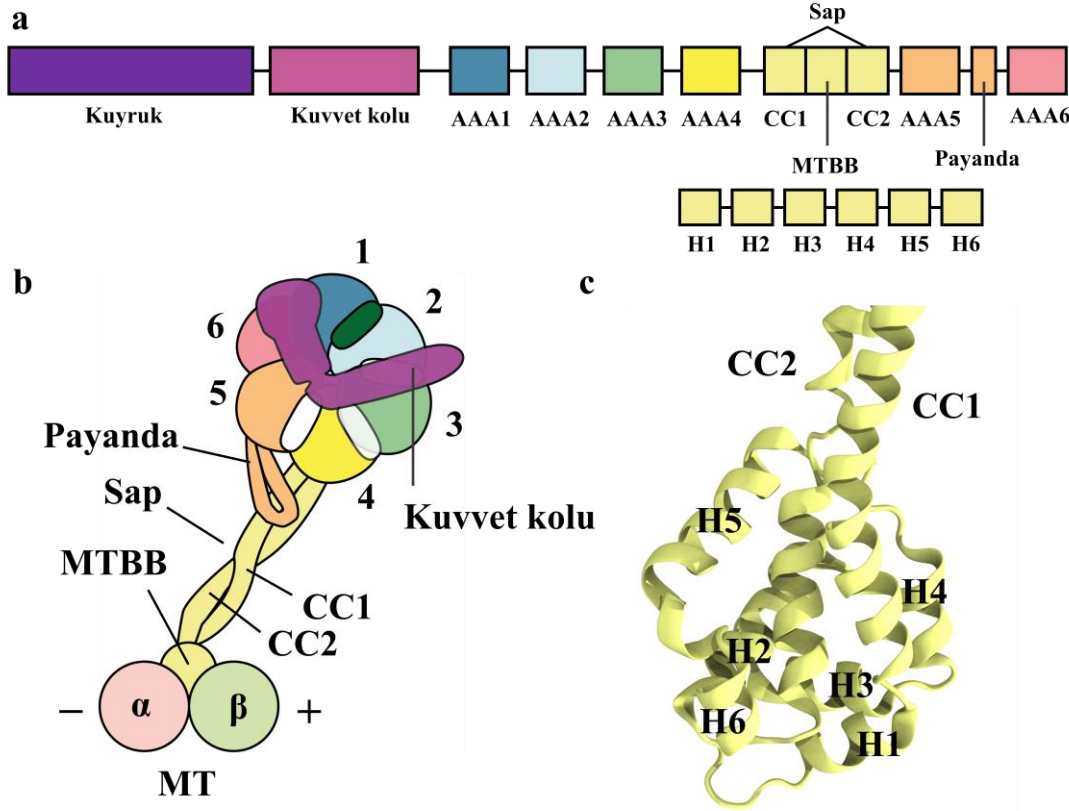
Sitoplazmik dinein katalitik halkasının ilk dört bölgesi (AAA1-4), nükleotit bağlanmasını sağlayan Walker A motifine sahiptirler. AAA5 ve AAA6 bölgeleri bilinen herhangi bir nükleotit bağlama motifi içermemektedir ve bu bölgelerin yapısal bir gövde olarak görev aldığı düşünülmektedir. Dinein motor proteininde dört ATP bağlanma bölgesinden yalnızca AAA1, hareket için kesinlikle gereklidir (Kon ve diğ., 2004; Schmidt ve diğ., 2015). Diğer bölgeler ise dineinin hareketi için yardımcı ve

düzenleyici rol oynamaktadır. ATP hidrolizinden çıkan enerji, motor bölgesinde bulunan kuvvet kolunun hareket ettirilmesi ile mekanik işe dönüşmektedir. Kuvvet kolu 4 alt bölgeden oluşmaktadır ve 1-2 bölgeleri rijit bir gövde şeklinde hareket edebilirken, 3-4 bölgeleri AAA1'e bağlı halde sabittir. Baş bölgesine ATP bağlı olduğunda kuvvet kolu, AAA3 ile AAA4 arasından çıkacak pozisyonda düz bir yapıda bulunmaktadır (Schmidt ve diğ, 2015). Yani kuvvet kolunun tüm alt bölgeleri tek bir düzlem üzerindedir. ATP hidroliz edildikten sonra açığa çıkan enerji ile kuvvet kol eklem bölgesinden bükülüp (Schmidt ve diğ, 2015) AAA2 ile AAA3 arasından çıkacak bir pozisyona hareket etmektedir (Gee ve diğ, 1997).

Sitoplazmik dinein sapı, 10-15 nm uzunluğunda hafif esnek bir yapıya sahiptir (Gee ve diğ, 1997) ve dineinin baş bölgesine AAA4'ten bağlanmaktadır. Bu yapı birbiriyle etkileşen iki sarmaldan (CC1 ve CC2) oluşmaktadır ve sarmallardaki hidrofobik amino asitler karşılıklı olarak düzenli temaslarda bulunarak sapa sarmal-bobin yapısını vermektedir. Sapın alt kısmındaki son derece korunmuş iki prolin amino asidi (P3285 ve P3409) sapın yapısındaki düzeni bozarak sarmal-bobin yapıda bir kıvrım oluşturmaktadır (Carter ve diğ, 2008; Redwine ve diğ, 2012). Sapın alt kısmında mikrotübül bağlama bölgesi (MTBB) mevcuttur ve bu bölge dineinin MT'ye bağlanması sağlar (Schmidt ve Carter, 2016). MTBB bir demet halinde organize olmuş altı alfa sarmaldan (H1-H6) oluşmaktadır (Şekil 1.3c). Sapın CC1 sarmalı, MTBB'nin H1 sarmalı ile doğrudan bağlantı halindedir ve MTBB'nin diğer sarmalları ile sınırlı temas yapmaktadır. Dinein yapısında sapa ek olarak, payanda olarak adlandırılan küçük bir sarmal-bobin daha bulunmaktadır ve bu bölge AAA5 bölgesinden çıkarak sapın üst kısmına yapısal bir destek olarak görev almaktadır (Carter ve diğ, 2011; Kon ve diğ, 2011).

Dineinin hareketi sap, kuvvet kolu ve MTBB arasındaki değişimler ile organize olmaktadır. Sapın CC1 ve CC2 sarmalları arasındaki amino asit etkileşimleri α ve β olarak adlandırılan iki farklı durumu içerir (Carter ve diğ, 2008). α durumunda dinein MTBB'si MT'ye yüksek afiniteyle bağlanma özelliğine sahipken β durumunda MT'ye düşük afiniteye sahiptir (Gibbons ve diğ, 2005). Dineinin AAA1 bölgesine ATP bağlanmasıyla MTBB'nin MT'ye olan afinitesi azalır, diğer bir deyişle sarmallar α durumdan β duruma geçer. CC1 ve CC2 sarmallarındaki yapısal kayma ile MTBB ile AAA halkası arasında sinyal iletimi gerçekleşir. ATP hidrolizinden sonra MTBB'nin H1 sarmalı MT ile güçlü bir etkileşim yüzeyi oluşturmak için içe doğru kaymaktadır.

H1'in doğrudan sapın CC1 sarmalına tutunmasıyla sap bölgesinin β durumundan α durumuna geri döndüğü gösterilmiştir (Redwine ve diğ, 2012). Sap bölgesindeki değişimlerin yanı sıra α durumunda MT ile daha fazla hidrojen bağı ve MTBB'nin H1, H3 ve H6 sarmallarında elektrostatik etkileşimlerin varlığı gözlemlenmesi, yüksek afiniteli bağlanmayı desteklemektedir (Redwine ve diğ, 2012).



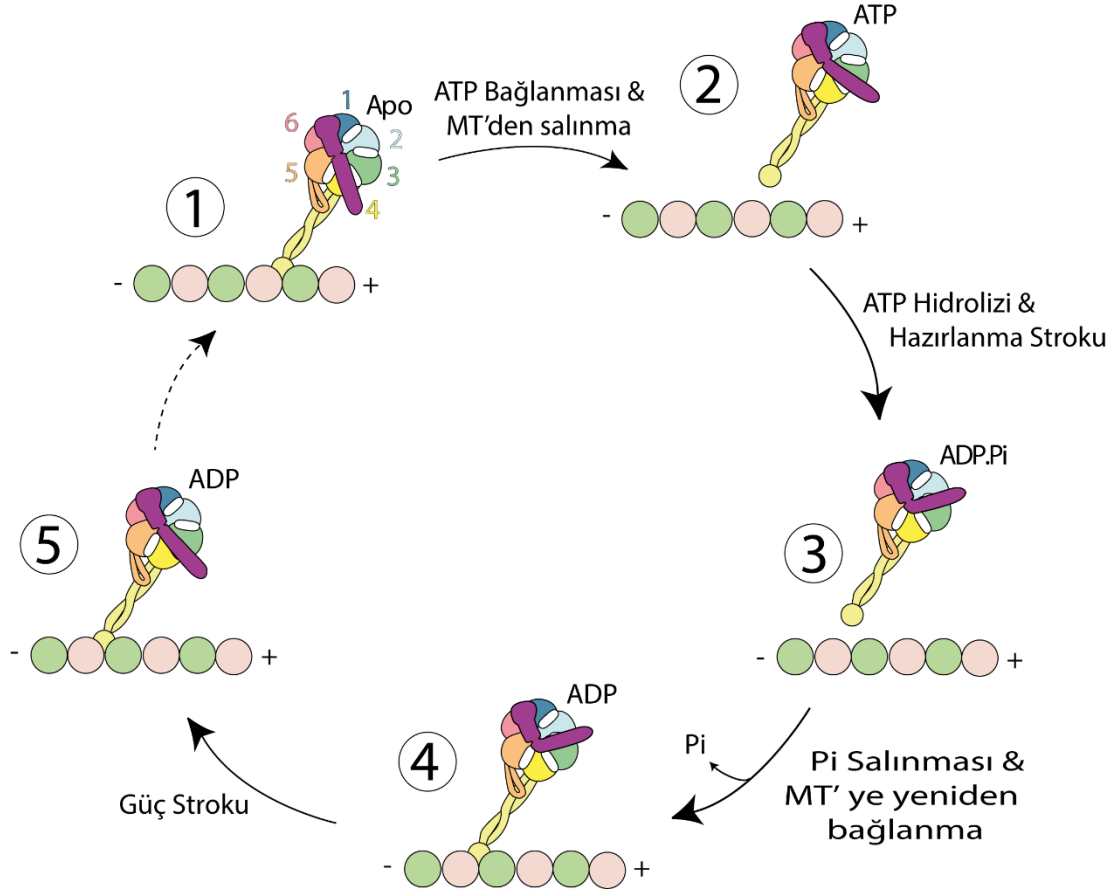
Şekil 1.3 : Sitoplazmik dinein yapısı. Dineinin birincil yapısı (a), MT'ye bağlı halinin şematik gösterimi (b) ve MTBB'nin H1-H6 sarmalları (c) şekilde gösterilmiştir.

Literatürde α ve β durumlar için çeşitli kristal yapılar bulunmaktadır. Carter ve diğ. (2008), β durumunda ve sap bölgesinin bir kısmı ile MTBB'yi içeren *Mus musculus* organizmasına ait dinein kristal yapısını elde etmiştir. Kon ve diğ. (2012) *Dictyostelium discoideum* organizmasına ait ve α durumunda bulunan tam bir motor bölgesine sahip dinein kristal yapısını elde etmiştir. Sap bölgesinin α ve β durumları arasında kayması ile MT'ye bağlanmanın kontrol edildiği düşük afiniteli MTBB'ye sahip *M. Musculus* yapısı (Carter ve diğ, 2008) ve yüksek afiniteli MTBB'ye sahip *M. Musculus* yapısının (Redwine ve diğ, 2012) karşılaştırılmasıyla gözlemlenmiştir. *D. discoideum* dinein motor bölgesine ait kristal yapıda, sap α durumundadır ancak yapıda CC1'in bir kısmı bozuk olduğundan dolayı MTBB zayıf bağlanma özelliği

sergilemektedir (Kon ve diğ, 2012). Bu sonuçlar güçlü bağlanmanın MT ile etkileşimler sayesinde kritik bir şekilde stabilize edildiğini göstermektedir. Saptaki değişikliklere ek olarak, payanda bölgesinin sapta sebep olduğu yeniden düzenlenmeler ile AAA halkasında değişiklikler meydana geldiği önerilmektedir. Sap ile payanda arasındaki etkileşim yapıdan payanda kesilerek ortadan kaldırıldığında, yapıda MT varlığında ve yokluğunda AAA halkasında ATP hidroliz hızının kontrolsüz bir şekilde yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Kon ve diğ, 2012). Sapın CC2 sarmalındaki 3 amino asidin (E3570, R3573 ve W3574) ve payandada 4 amino asidin (E3831, L3835, L3838 ve L3846), sap ile payanda arasındaki etkileşimin yapı ve dinamiği için önemli olduğu ve H1 sarmalı ile sapın CC1 sarmalı arasındaki ilişkinin de sinyal iletiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sap ve payandaya ek olarak, dineinin kuvvet kolu mekanik bir eleman olarak görev almaktadır (Roberts ve diğ, 2009). Kuvvet kolu, ATP hidrolizi boyunca AAA halkasına göre göreceli olarak yapısal bir değişikliğe uğrar ve yapısındaki bu değişim dineinin MT'ye bağlanma afinitesiyle ilişkilendirilir (Kon ve diğ, 2005). Kuvvet kolu ile AAA halkası arasındaki temasların bozulması, halkanın katalitik aktivitenin azalmasına neden olur (Kon ve diğ, 2012; Schmidt ve diğ, 2012). Böylece, kuvvet kolu mekanik işlevinin yanı sıra, aynı zamanda nükleotit hidroliz çevriminde de düzenleyici rol oynar. Kuvvet kolunun N-ucundan çıkan uzantı kuyruk olarak adlandırılır ve bu kuyruk bölgesi kargo bağlanması ve dimerizasyondan sorumludur (Vallee ve diğ, 2004).

Dinein; nükleotit bağlanması, hidrolizi ve kopması boyunca 5 termodinamik hali (TH1-TH5) içeren bir mekanokimyasal çevrimden geçer (Şekil 1.4). Çevrim, dineinin ATP bağlanmadan önce apo haliyle başlar ve bu halde (TH1) kuvvet kolu düzken MTBB MT'ye yüksek afiniteye ile bağlı (a durumu) durumdadır. ATP bağlanmasıyla (TH2), dinein sapının sarmal bobin yapısında bir kayma meydana gelir ve dinein MT'den kopar (β durumu) (Burgess ve diğ, 2003; Kon ve diğ, 2004; Kon ve diğ, 2009). MT'den koptuktan sonra ATP hidroliz olur ve kuvvet kolu düz yapısından bükük yapıya geçer (TH3). Kuvvet kolunun yapısındaki bu değişiklik hazırlama stroku (*İngilizcesi* priming stroke) olarak adlandırılır ve bu değişim dineinin MT'nin eksi ucuna doğru adım atmasına kesin bir eğilim (*İngilizcesi* net bias) oluşturur (Roberts ve diğ, 2009; Kon ve diğ, 2012; Schmidt ve diğ, 2012). ATP hidrolizinden sonra sapın sarmal bobin yapısının yeniden eski haline dönmesiyle dinein MT'ye yeniden bağlanır ve fosfat salınır (TH4). Fosfat salınmasıyla kuvvet kolu bükük yapıdan düz yapıya

geçer (TH5) ve bu geçiş kuvvet üreten güç stroku (*İngilizcesi* powerstroke) olarak adlandırılır (Roberts ve diğ, 2009; Kon ve diğ, 2012; Schmidt ve diğ, 2012). ADP salınmasından sonra dinein kuvvet kolu ve sap bölgesinde önemli bir konformasyonel değişiklik olmaksızın çevrimin başlangıç yapısına geri döner.



Şekil 1.4 : Sitoplazmik dinein mekanokimyasal çevrimi. 6 adet AAA bölgesinden oluşan AAA halkası, dineinin sarmal-bobin sapının alt kısmındaki MTBB ile MT'ye bağlanır. Dineinin mekanokimyasal çevrimi boyunca kuvvet kolu ATP bağımlı bir şekilde konformasyonel değişikliklerden geçerek dineinin hareketini sağlar, bu süreç dineinin MT'ye bağlanma ve kopma durumlarıyla senkronize halde gerçekleşir.

2. YÖNTEMLER

2.1 LeuT Başlangıç Yapılarının Seçilmesi

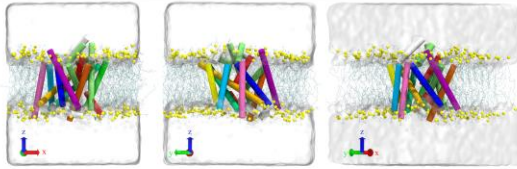
Gur ve diğ. (2015) dimerik formdaki LeuT kullanarak gerçekleştirdikleri simülasyon verilerinden apo LeuT monomeri için serbest enerji yüzeyi elde etmişlerdir (Şekil 1.2). Elde edilen enerji yüzeyi LeuT'nin OFo $\rightleftharpoons$ IFo halleri arasındaki yapısal geçiş boyunca oluşan (alt)halleri içermektedir. Enerji yüzeyinde minimum noktalar incelenerek apo LeuT monomerinin yapısal geçişi boyunca oluşan 7 termodinamik halini (TH1-TH7) temsil eden yapılar belirlenmiştir. Belirlenen her bir termodinamik hali temsilen iki anlık yapı VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) kullanılarak seçilmiştir. Enerji yüzeyinde OFo $\rightleftharpoons$ IFo geçişi boyunca, TH1 LeuT'nin hücre içine bakan (IFo) açık halini temsil ederken TH7, LeuT'nin hücre dışına bakan açık (OFo) halini temsil etmektedir. TH2-TH6 termodinamik halleri ise apo formdaki LeuT'nin hücre içine bakan açık halinden hücre dışına bakan açık haline geçerken üzerinden geçtiği hücre içine bakan kapalı (IFc) termodinamik hallerdir. Söz konusu yapılar basınç hesapları yapmak için kullanacağımız simülasyonların başlangıç noktaları olarak belirlenmiştir.

2.2 LeuT MD Simülasyonları İçin Sistemlerin Hazırlanması

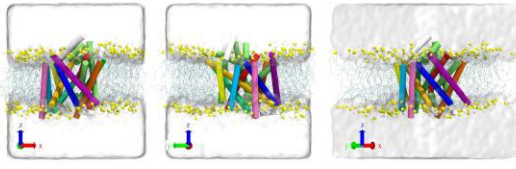
MD simülasyonu gerçekleştirilecek biyolojik sistemlerin hazırlanması için enerji yüzeyi üzerinden seçilen TH1-TH7 anlık yapıları kullanılmıştır. Gur ve diğ. (2015) tarafından yapılan simülasyon datasından seçilen bu yapılar LeuT'nin dimerik halini (iki zincir) içerir. Dimer haldeki LeuT yapılarından tek bir monomer seçilmiş ve bu LeuT monomeri ile onun 10 Å etrafındaki su molekülleri seçilerek yeni yapılar elde edilmiştir. Söz konusu yapılar ~16000 atom içermektedir ve bu atomlardan 8091'i proteini, 2'si protein yapısı içerisinde bulunan sodyum iyonlarını ve geri kalan atomlar ise su moleküllerini oluşturmaktadır. Elde edilen yapıların hücre içi ve dışı arasındaki açıklığın yönü z eksenini olarak tanımlandı ve bu açıklık z eksenine hizalandı (Şekil 2.1). Daha sonrasında x ve y eksenleri doğrultusunda 100x100x54 Å³ olacak şekilde çift katmanlı lipid tabaka sistemin merkezine yerleştirildi. Protein, çift katmanlı lipid tabakanın merkezine yerleştirildi ve 2 yapı VMD programının (Humphrey ve diğ,

1996) “MergeStructures v1.1” eklentisi kullanılarak birleştirildi. Protein ile yapısal olarak üst üste gelen lipidler sistemden çıkarıldı. Elde edilen sistem VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) “Solvate v1.5” eklentisi kullanılarak su içerisinde çözüldü ve suda çözülmüş sistemin boyutları 100x100x105 Å³ olarak elde edildi. Bu sistemde, çift katmanlı lipid tabaka içerisinde kalan su molekülleri temizlendi ve sistem VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) “Autoionize v1.5” eklentisi kullanılarak 0.15 M NaCl ile iyonize edildi ve sistemin yükü nötr hale getirildi. Tüm sistemler VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) ve eklentileri kullanılarak hazırlanmıştır. MD simülasyonları için hazırlanmış sistemler Şekil 2.1’de gösterilmektedir.

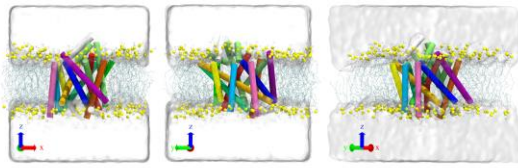
a) Termodinamik hal 1 (IFo)



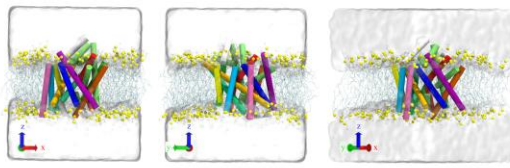
e) Termodinamik hal 5 (IFc2c)



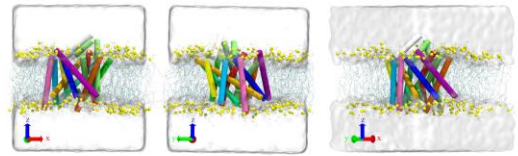
b) Termodinamik hal 2 (IFc1)



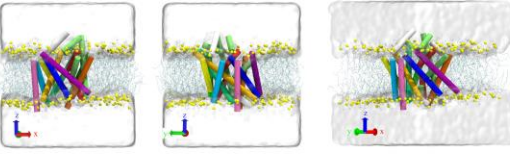
f) Termodinamik hal 6 (IFc3)



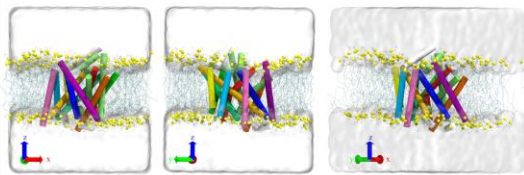
c) Termodinamik hal 3 (IFc2a)



g) Termodinamik hal 7 (Ofo)



d) Termodinamik hal 4 (IFc2b)



Şekil 2.1 : LeuT’nin IFo→Ofo halleri arasındaki yapısal geçiş boyunca oluşan 7 termodinamik halinin hücre zarını temsil eden çift tabakalı lipid tabaka, su ve iyonlar varlığında hazırlanmış sistemleri. Şekilde protein, lipid başı, lipid asil zincirleri ve sular VMD programı kullanılarak sırasıyla cartoon, van der Waals, licorice ve quick surface gösterim şekli ile gösterilmiştir.

2.3 LeuT MD Simülasyon Detayları

Bütün simülasyonlar NAMD (Phillips ve diğ, 2005) programında CHARMM36 (Best ve diğ, 2012) kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan sistemlerin (TH1-TH7) dengeye gelebilmesi için öncelikle sistemde bulunan lipit kuyrukları 10000 adım minimizasyon ve 0.5 ns dengeleme adımından oluşan eritme prosesi (melting process) uygulandı. Eritme adımı yapılırken lipit kuyrukları hariç tüm atomlar sabitlendi. Bu işlemde sonra, sistemde proteinin omurgasının hareketi harmonik yay sabiti $1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ olacak şekilde sanal bir yay ile kısıtlandı. Buna ek olarak, simülasyon boyunca çift katmanlı lipit tabaka arasına su moleküllerinin girmesini önlemek için lipit tabakasını merkezinden lipit başlarına doğru $0.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$ 'lik bir kuvvet dışarıdan uygulanarak su molekülleri lipit tabakanın dışına doğru itildi. Bu simülasyon adımı gerçekleştirilirken öncelikle 10000 adım minimizasyon işlemi, daha sonrasında ise 1 ns'lik dengeleme simülasyonu yapıldı. Bu adımdan sonra su moleküllerinin lipit tabakanın arasına girmesini engellemek için uygulanan kuvvet kaldırıldı, sistemin sınırları her yönde 3 Å genişletildi ve proteinin alfa karbonlarının hareketleri aynı yay sabiti kullanılarak 2 ns boyunca kısıtlandı. Bu simülasyonu takiben proteinin alfa karbonlarına uygulanan yay sabiti $0.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ 'a indirilerek 4 ns boyunca proteinin hareketleri kısıtlandı. Son dengeleme aşaması olarak tüm sistem serbest bırakılarak 5 ns boyunca simüle edildi. Bu aşamaya kadar her bir sistem için ayrı ayrı toplamda 12.5 ns dengeleme simülasyonu gerçekleştirildi. Simülasyonlarda sıcaklık 310 K, adım sayısı 2 olarak belirlendi. Aynı zamanda sistemin sıcaklığını ve basıncını sabit tutmak için sırasıyla Langevin dinamik parametreleri ve Langevin pistonu kullanıldı. Sistemin basıncı 1 atm'ye eşitlendi.

Dengeye getirilen sistemlerin MD simülasyonları boyunca yaptığı yapısal geçişlerin basınç üzerinde nasıl etki ettiğini anlamak için her sistem (TH1-TH7) 150 ns boyunca simüle edildi ve 2 ps aralıklarla basınç değerleri toplandı. NAMD programı basınç hesaplamalarını yaparken z ekseninde sistemi bölümlere ayırmaktadır. Sistemin z ekseninde elde edilen her bir paçası dilim olarak adlandırılmaktadır ve dilimler birbirine eşittir. Tüm sistemlerin dilim kalınlığı 1 Å (Gullingsrud ve Schulten, 2004) olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Oluşturulan biyolojik sistemlerin büyüklüğü ve simülasyon süreleri gibi detaylar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Simülasyonların içerdiği lipid ve toplam atom sayıları ile birlikte yapılan simülasyon süreleri.

Simülasyon Numarası	Lipit Sayısı	Atom Sayısı	Denge Simülasyonu (ns)	Basınç Hesabı Simülasyonları (ns)
1	201	85,970	12.5	150
2	198	85,466	12.5	150
3	198	84,355	12.5	150
4	201	86,602	12.5	150
5	201	83,612	12.5	150
6	197	84,050	12.5	150
7	198	86,680	12.5	150

2.4 Enerji Yüzeyinin Oluşturulması

Enerji yüzeyi elde edilirken Gur ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi LeuT'nin hücre içine bakan açıklığındaki amino asitler (k) = ((R11, D369) ve (I187, A268)) ile hücre dışına bakan açıklığındaki amino asitlerin (l) = ((V33, D401) ve (I245, I410)) alfa karbonlarının arasındaki uzaklık reaksiyon parametresi oluşturulmak için kullanılmıştır. Mesafelerin her biri 0 ile 1 arasında olacak şekilde $s(k, l) = |\mathbf{R}_k - \mathbf{R}_l| / |\mathbf{R}_k - \mathbf{R}_l|_{max}$ formülü ile normalize edilmiştir. Hücre içine bakan açıklığı belirleyen reaksiyon parametresi ((R11, D369) ve (I187, A268)) amino asitlerin arasındaki mesafelerin ortalamasıyken hücre dışına bakan açıklık derecesini belirten reaksiyon parametresi ise ((V33, D401) ve (I245, I410)) amino asitleri arasındaki mesafelerin ortalamasıdır. MD simülasyonlarından elde edilen konformasyonların tamamı bu iki reaksiyon parametresinden oluşan düzleme yansıtılmıştır. Söz konusu düzlem, kafeslere bölünerek her kafes içerisine düşen konformasyon sayısı belirlenmiştir. Her kafes içerisindeki konformasyon sayısı toplam sayıya bölünerek düzlem üzerindeki konformasyonel dağılım $f(\mathbf{R})$ elde edilmiştir. Elde edilen bu dağılımdan serbest enerji yüzeyi $A(\mathbf{R}) = -kT \ln\{f(\mathbf{R})\} + ct$ formülü ile hesaplanmıştır.

2.5 LeuT İçin Basınç Hesabı

Hücre zarları, çift katmanlı lipid tabakadan ve bu tabakaya gömülü proteinlerden oluşur. Lipid tabakası iyonlar ve yüklü/polar moleküller için büyük bir enerji bariyeri oluşturur ve yalnızca çok küçük, yüksüz ve suda çözünme özelliğine sahip birkaç molekül bu tabakayı geçilebilir. Amino asitler, şekerler, iyonlar, yüklü moleküller ve diğer suda çözünmeyen moleküller için lipid tabakanı geçmek son derece zordur.

Bu moleküller, hücre zarına gömülü olan taşıyıcı proteinlerin yardımı ile lipid tabakayı geçebilir (Alberts ve diğ, 2015). Söz konusu proteinler molekül taşırken son derece önemli yapısal değişiklikler geçirirler. Hücre dışı ve içi arasındaki yön z eksenini olarak tanımlanıp derinlik ölçüsü olarak kabul edilirse, proteinin yapısal geçişi boyunca kesit alanı derinliğe bağlı olarak değişir. Kesit alanındaki değişikliklere ek olarak, yanıl basınçlar da proteinin yapısal geçişinden dolayı değişir. Hücrenin çift tabakalı lipid tabakasındaki basınç profili, onu oluşturan lipidlerin amfipatik doğasından kaynaklanmaktadır. Protein yapısal bir değişiklik geçirirken, lipidlerin hidrofilik (suyu seven) baş grupları, hidrofobik (suyu sevmeyen) kuyrukların çözücüye maruz kalmasını önlemek için bir araya gelecek şekilde sıkışırken, çekici dağılma kuvvetleri ve lipid kuyrukları arasındaki entropik itme nedeniyle sabit bir hacim korumaktadırlar. Baş gruplarının sıkışma etkisi, lipid kuyrukların daha büyük bir hacmi doldurarak entropiyi maksimum seviyeye ulaştırmaları ile dengelemektedir. Böylece lipid tabakadaki net gerilim sıfır olmaktadır (Gullingsrud ve Schulten, 2004).

MD simülasyonlarının her bir adımındaki anlık basınç tüm kinetik enerjilerin ve iki parçacık arası etkileşimlerin toplamı ile hesaplanmaktadır. İki parçacık arası etkileşimler, bağlı olmayan iki atom arası kuvvetler ve bağlı olan iki atom arası kuvvetler olmak üzere iki toplama ayrılmaktadır. Bağlı olmayan iki atom arasında görülen etkileşimler van der Waals ve elektrostatik etkileşimlerdir. Bağlı olan atomlar arası etkileşimler ise kovalent bağ etkileşimleridir. Bu durumda basınç tensörü denklem 2.1 ile hesaplanabilir (Gullingsrud ve Schulten, 2004).

$$P = \frac{1}{\Delta V} \left[\sum_i m_i v_i \times v_i - \sum_{i < j} F_{ij} \times r_{ij} \right] \quad (2.1)$$

Denklem 2.1 kullanılarak denklem 2.2 ile yüzey gerilimi hesaplanır (Gullingsrud ve Schulten, 2004).

$$\gamma = \int_{-h/2}^{h/2} dz (P_N - P_L) \quad (2.2)$$

Burada h simülasyon hacmini, P_N normal basıncı ve P_L yanıl basıncı ifade etmektedir. Başka bir deyişle, P_N z eksenini yönündeki (proteinlerin hücre içi ve dışı doğrultusundaki açıklığının eksenini) basınç ($P_N = P_{zz}$) ve P_L ise x ve y eksenleri

yönündeki basınç ($P_L = 1/2 (P_{xx} + P_{yy})$) olarak tanımlanmaktadır (Gullingsrud ve Schulten, 2004).

Bu tez kapsamında hücre zarındaki basıncın z eksenine (derinlik) bağlı değişimi ile ilgilendiğimiz için öncelikle bölgesel basıncı tanımlamamız gerekmektedir. Lindahl ve Edholm'un çalışmalarına (Lindahl ve Edholm, 2000) göre, bölgesel basıncın hesaplanması için simülasyonu yapılan biyolojik sistemin z eksen yönünde üst üste gelen Δz kalınlığına sahip kafeslere ayrılması gerekmektedir. Bu durumda o kafes içerisinde bulunan parçacıkların etkileşiminden ve kafesin iki farklı tarafında bulunan parçacıkların etkileşiminden oluşan bölgesel basınç tensörü denklem 2.3 ile hesaplanır (Gullingsrud ve Schulten, 2004).

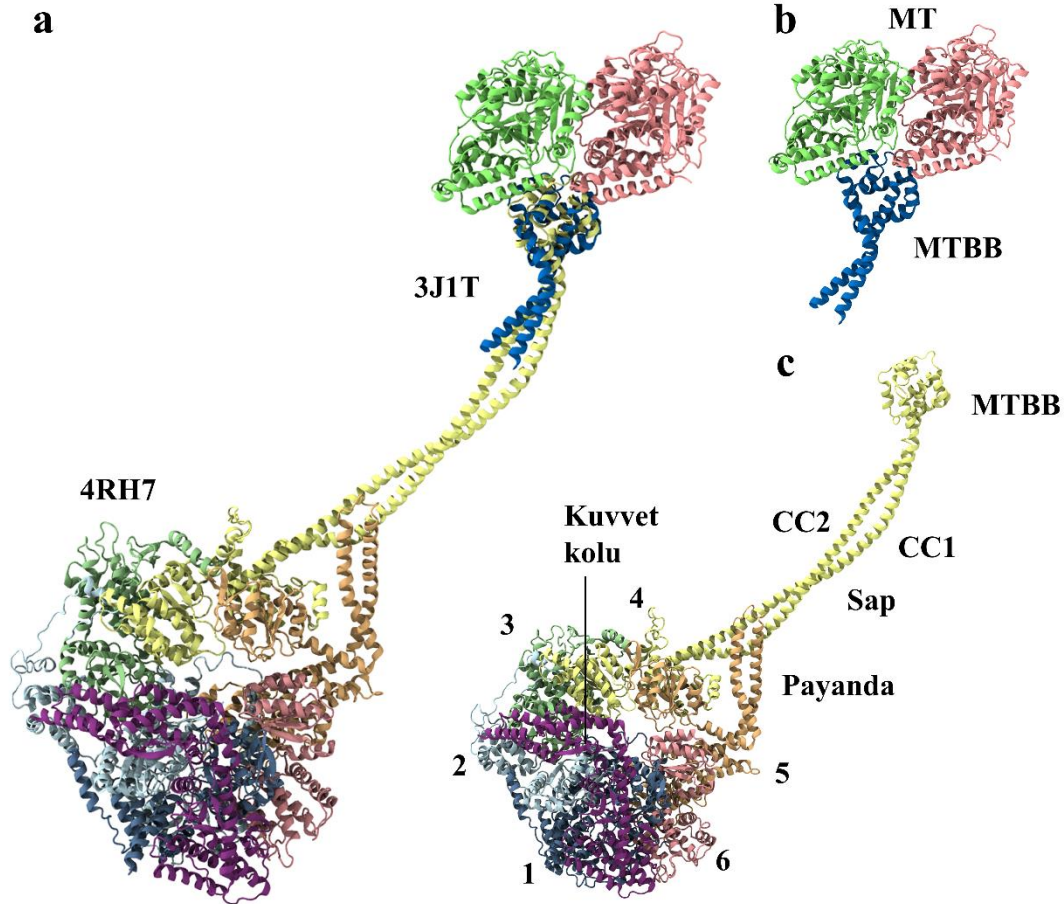
$$P_{bölgesel}(z) = \frac{1}{\Delta V} \left[\sum_{i^*} m_i v_i \times v_i - \sum_{i < j} F_{ij} \times r_{ij} f(z, z_i, z_j) \right] \quad (2.3)$$

Denklemde z kafesin tam ortasındaki z koordinatıdır. z_i ve z_j ise sırasıyla i ve j parçacıklarının z koordinatıdır. i^* kafes içerisindeki atomları tanımlamaktadır. Dolayısıyla $\sum_{i^*} m_i v_i \times v_i$ kafes içerisinde kalan atomların kinetik enerjilerinin bir toplamıdır. $f(z, z_i, z_j)$ ağırlık fonksiyonudur ve eğer i ve j parçacıkları kafesin içerisinde ise $f(z, z_i, z_j) = 1$. Parçacığın sadece biri kafes içerisinde ise $f(z, z_i, z_j) = \frac{dz}{|z_1 - z_2|}$ olarak hesaplanmaktadır. dz kafes içerisindeki parçacığın diğer parçacığa yakın kafes sınırına olan uzaklığıdır. İki parçacığın kafes içerisinde bulunmaması ve kafesin bu iki parçacık arasında kalması durumunda ağırlık fonksiyonu $f(z, z_i, z_j) = \frac{\Delta z}{|z_1 - z_2|}$ olarak hesaplanmaktadır (Gullingsrud ve Schulten, 2004).

MD simülasyonlarından elde edilen basınç verileri analiz edildi ve denklem 2.3 ile hesaplamalar yapıldı. Her bir termodinamik hal (TH1-TH7) için 150 ns'lik simülasyon verisinden 75000 adet anlık basınç profili verisi elde edildi. Bu profillerin ortalamaları hesaplanarak Şekil 2.1'de verilmiş her bir termodinamik hal için basınç profilleri oluşturulmuştur. Minimum noktaların basınç profillerini hesaplamak için, minimum noktaların bulunduğu kuyulardaki tüm yörüngeler belirlendi. Bu yörüngelere karşılık gelen basınç profili verileri toplandı. Veriler daha sonra z eksen merkez olacak şekilde yörüngelerin üzerine yerleştirildi. Bu profillere göre basınç profili grafikleri oluşturuldu.

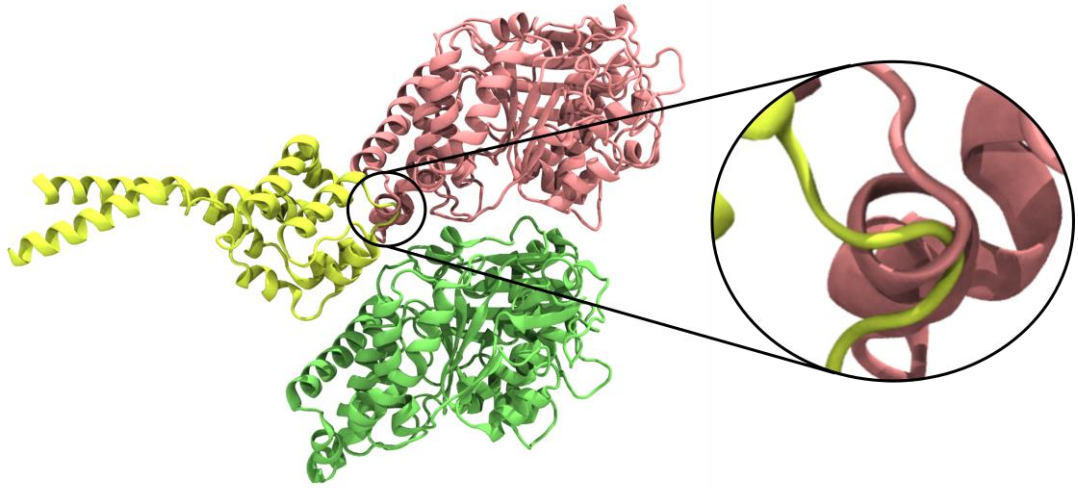
2.6 Dineinin MTBB'sinin MT'ye Bağlanması MD Simülasyonları İçin Sistemlerin Hazırlanması

MTBB'nin MT'ye bağlanmasını incelemek için gerçekleştirilen simülasyonlarda iki farklı dinein kristal yapısı bir araya getirilerek yeni bir MT'ye bağlı dinein MTBB yapısı modellenmiştir. İlk olarak Schmidt ve diğ. (2015) tarafından elde edilen insana ait sitoplazmik dinein-2'ye ait motor bölgesinin ATP hidrolizinin geçiş hali analogu olan ADP.Vi bağlı kristal yapısı (PDB kodu: 4RH7) MTBB elde edilmek için kullanılmıştır. Söz konusu kristal yapı K1413R, R2871Q ve A3680V olmak üzere üç adet mutasyon bulundurmaktadır. Dahası, proteinin C-ucunda fazladan bir valin amino asidi bulunmaktadır ve insana ait sitoplazmik dinein-2'nin kristal yapısında önemli yapısal eksiklikler mevcuttur. Bunlar AAA3-AAA4 bölgeleri arasında 2584-2586 indeksli 3 amino asit (ARA), AAA4'de 2827-2846 indeksli 20 amino asit (TGGGEKYNDKKRKEEKKKNS), AAA5-AAA6 bölgeleri arasındaki 3596-3611 indeksli 16 amino asit (VVGDMRLRKADSQQKIR), ve AAA6 bölgesinin C-ucundan sonraki 3953-3962 indeksli 10 amino asit (IDVFNQNRNKK) olarak sıralanmaktadır. Can ve diğ. (2019), insan dinein-2 yapısının eksiksiz ve ATP bağlı halini VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) kullanarak modellemişlerdir (Şekil 2.2c). Sonuç olarak ATP bağlı düşük afiniteli eksiksiz bir dinein-2 yapısı elde etmişlerdir. Elde edilen dinein yapısı MT'ye bağlanmak istendiği için, *M. musculus* organizmasına ait MT'ye yüksek afinite ile bağlı dinein-1 MTBB kristal yapısı (PDB kodu: 3J1T) (Redwine ve diğ, 2012) seçilmiştir. Bu yapı α ve β tübülinden oluşan MT, MT'ye yüksek afinite ile bağlı MTBB ve dinein sapının bir kısmını içerir (Şekil 2.2b). Seçilen iki yapının MTBB'lerinin hizalanması için Can ve diğ. (2019) tarafından modellenen insan dinein-2 yapısının alfa sarmallarının amino asitleri ve bu sarmallara *M. musculus* dinein-1 yapısında karşılık gelen amino asitler belirlendi (EK A). Belirlenen amino asit indeksleri insan dinein-2 için E2998-S3005 (H1), D3011-M3024 (H2), W3031-A3039 (H3), R3041-T3049 (H4), K3057-N3070 (H5) ve P3076-A3082 (H6) iken, *M. musculus* dinein-1 için Q3300-S3307 (H1), A3313-L3326 (H2), W3333-M3341 (H3), E3343-N3351 (H4), D3359-S3371 (H5), Y3377-A3383 (H6) amino asitleridir. İki yapıda birbirine karşılık gelen ve korunmuş olan bu bölgeler VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) kullanılarak hizalandı ve yapılar üst üste getirildi (Şekil 2.2a).



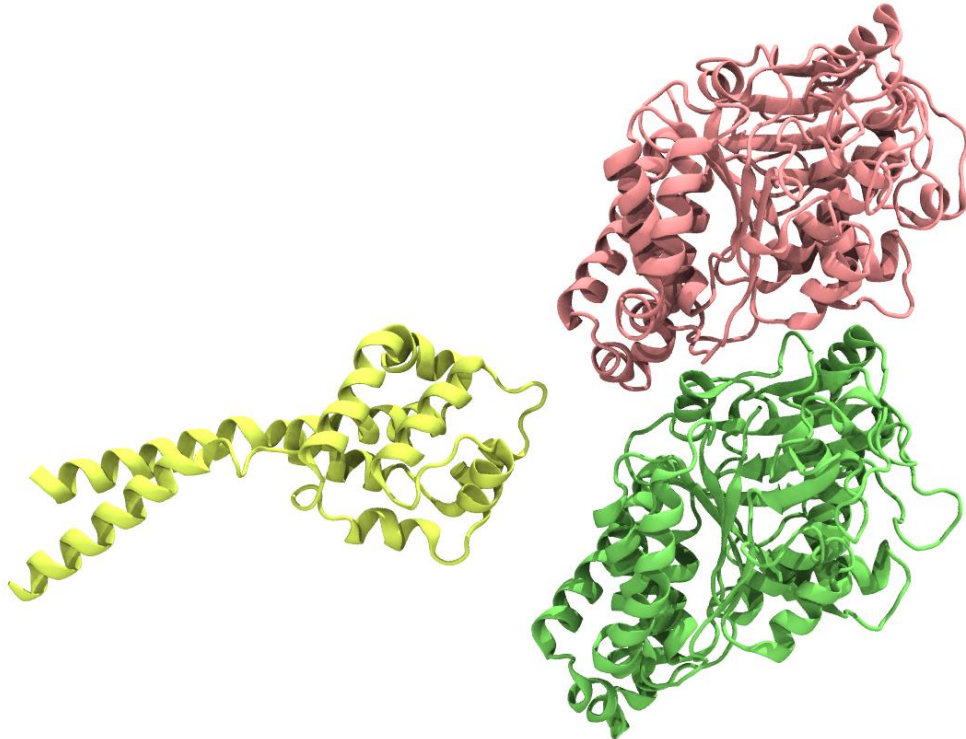
Şekil 2.2 : İnsan dinein-2 yapısı (PDB kodu: 4RH7) ile *M. musculus* dinein-1 (PDB kodu: 3J1T) yapılarının MTBB kısımlarının üst üste getirilmesi. Üst üste getirilmiş yapılar (a), MT'ye bağlı dinein-1 MTBB yapısı (b) ve Can ve diğ. (2019) tarafından modellenen dinein-2 yapısı (c) şekilde gösterilmiştir.

Yapılar üst üste getirildikten sonra, üst üste olan yapılardan insan dinein-2 yapısının çok büyük olması, hesaplamaların masraflı olması ve incelenecek bölgenin MTBB olmasından dolayı eksiksiz dinein-2 yapısının sadece MTBB ve sap bölgesinin bir kısmını (E2962-R3126) içeren yapısı daha sonraki aşamalarda kullanılmıştır. Bu kısmı *M. musculus* dinein-1 (PDB kodu: 3J1T) yapısındaki MTBB-sap kısmı(K3264-K3427) referans alınarak seçilmiştir (EKA). Ayrıca dinein-2 yapısının MT'ye bağlı hali modellenmek istendiği için üst üste olan yapıdan dinein-1 yapısındaki MTBB-sap kısmı atılarak yalnızca MT alınmıştır. Sonuç olarak dinein-2 MTBB-sap kısmını (E2962-R3126) ve MT'yi içeren yapı VMD programında (Humphrey ve diğ, 1996) koordinatları birleştirilerek elde edilmiştir (Şekil 2.3). Kaydedilen yapı görsel olarak incelendiğinde insan dinein-2 yapısı ile MT'nin α -tübülünü arasında yapısal çakışma gözlemlendi.



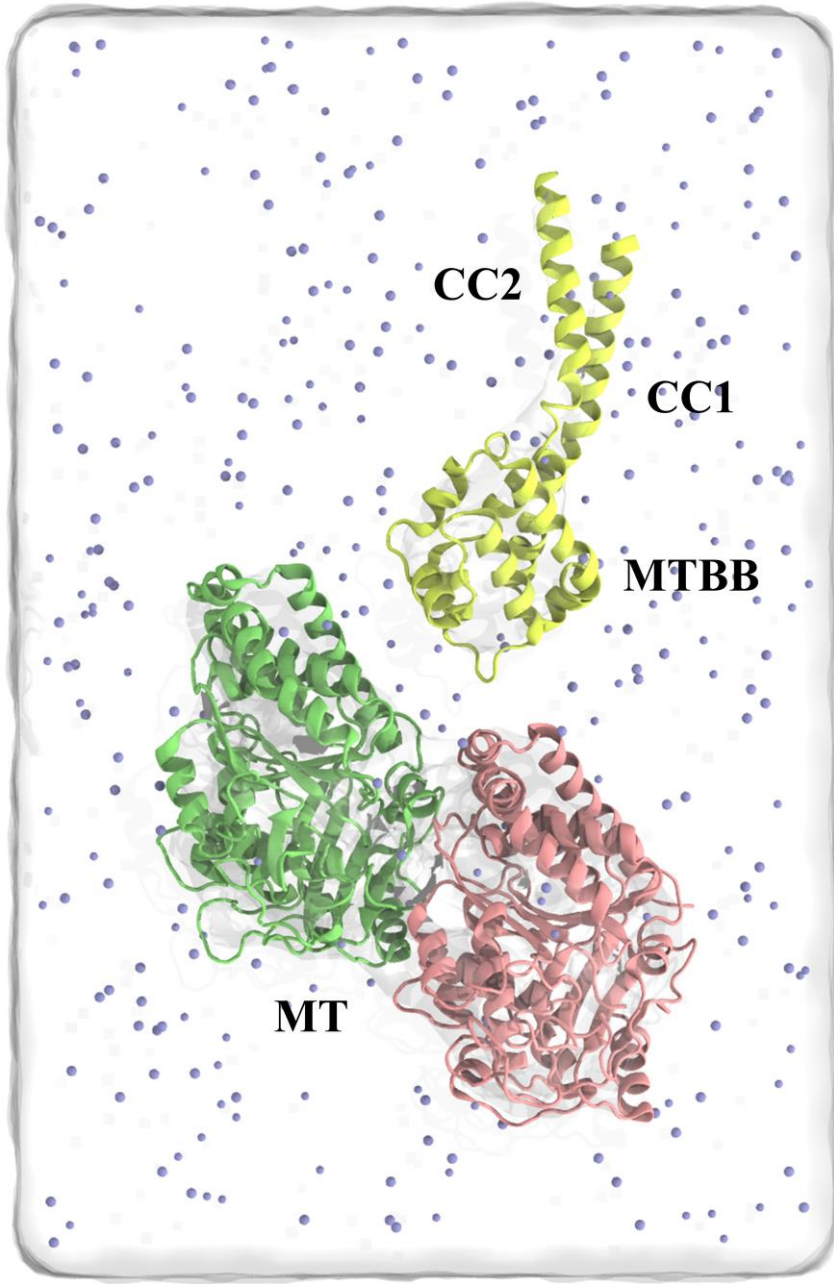
Şekil 2.3 : *M. musculus* dinein-1 kristal yapısındaki (PDB kodu: 3J1T) MT ile insan dinein-2 (PDB kodu: 4RH7) MTBB-sap kısmının üst üste getirilmesiyle modellenen yapı. Yapıda meydana gelen yapısal çakışma sağ panelde gösterilmektedir. Şekilde MTBB ve sap bölgesi (E2962-R3126) sarı ile gösterilirken MT'nin α ve β -tübülinleri sırasıyla pembe ve yeşil renk ile gösterilmiştir.

Yeni elde edilen yapıdaki yapısal çakışmayı önlemek için insan dinein MTBB'si MT'den VMD programı kullanılarak yaklaşık 10 Å uzaklaştırılmıştır ve bu uzaklaştırma sonucu değişen koordinatlar kaydedilerek yapısal çakışma olmayan yapı elde edilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 : Yapısal çakışmanın ortadan kaldırılmasıyla oluşan ve MTBB'nin MT'ye bağlanmasını sağlayan MD simülasyonlarında kullanılan yapı.

Elde edilen yapı, VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) “Solvate v1.5” eklentisi kullanılarak her yöne 15 Å uzaklık olacak şekilde su kutusu içerisinde çözüldü. Daha sonra su içerisinde çözülen sistem VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) “Autoionize v1.5” eklentisi kullanılarak 0.15 M NaCl ile iyonize edildi ve sistemin yükü nötr hale getirildi. İyonizasyondan sonra sistemin toplam atom sayısı 170514 atom oldu. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 : MTBB’nin MT’ye bağlanmasını sağlayan MD simülasyonları için su ve iyonlar varlığında hazırlanan sistem.

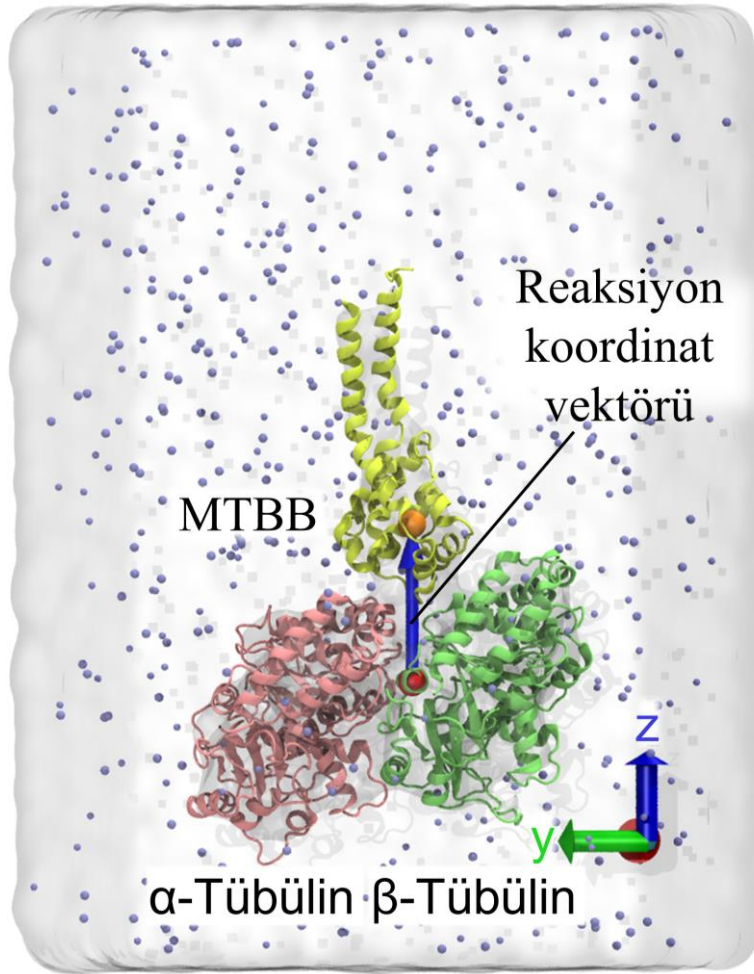
2.7 Dineinin MTBB'sinin MT'ye Bağlanması MD Simülasyon Detayları

MT'ye bağlı MTBB yapısının dengeye gelmesini sağlamak için, hazırlanan sistem NAMD (Phillips ve diğ, 2005) programı (CUDA hızlandırması ile birlikte) ve CHARMM36 (Best ve diğ, 2012) kuvvet alanı (*İngilizcesi* force field) kullanılarak simüle edilmiştir. Elde edilen sistemin dengeye gelebilmesi için öncelikle proteinin alfa karbonları sabitlenerek 10000 adım minimizasyon işlemi gerçekleştirildi. Adım aralığı 2 fs olarak belirlendi. Van der Waals (vdW) etkileşimlerinin hesaplanması sırasında iki atom arasındaki uzaklık (*İngilizcesi* cutoff distance) en çok 12 Å olacak şekilde seçildi ve mantık fonksiyonu 10 Å'dan başlayıp 12 Å'a ulaşacak şekilde ayarlandı. Uzak mesafeli elektrostatik etkileşimlerin hesaplanması parçacık ağ Ewald metodu kullanılarak yapıldı. Minimizasyon işleminin ardından proteinin alfa karbonları sabit tutularak 1 ns boyunca dengeleme simülasyonu yapıldı. Minimizasyon ve dengeleme simülasyonları süresince sistemin parçacık (**N**), hacim (**V**) ve sıcaklık (**T**) değerleri sabit tutuldu, başka bir deyişle NVT yaklaşımı uygulandı. Bu yaklaşımın uygulanmasının sebebi yeni oluşturulan sistemin basıncının dengelenebilmesi ve sistemin denge durumuna yaklaşmasıdır. Daha sonrasındaki simülasyonlarda sistemin parçacık (**N**), basınç (**P**) ve sıcaklık (**T**) değerleri sabit tutularak (NPT yaklaşımı) sistemin hacminin dengeye gelmesi için 2 ns dengeleme simülasyonu yapıldı. Bu simülasyonda proteinin alfa karbonlarının hareketi yay sabiti 1 kcal/mol/Å^2 olan bir yay ile harmonik hareket edebilecekleri bir şekilde kısıtlandı. Bu adımdan sonra sistemdeki tüm atomlar serbest bırakıldığı 4 ns'lik dengeleme simülasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamaya kadar sistemin dengeye ulaşması toplamda 7 ns dengeleme simülasyonu gerçekleştirildi. Dengeleme simülasyonlarından sonra sistem 200 ns boyunca MD simülasyonu yapıldı ve MTBB'nin MT'ye bağlanması bu simülasyon ile sağlandı.

2.8 Dinein MTBB'sinin MT'den Kopmasının Yönlendirilmiş MD (SMD) Simülasyonları İçin Sistemlerin Hazırlanması

Dinein proteininin termodinamik halleri arasındaki geçiş boyunca MT'den kopmasının modellenmesi için, dinein MTBB'sinin MT'den kopmasını sağlayan yönlendirilmiş MD (SMD) simülasyonları yapılacaktır. SMD simülasyonları için başlangıç noktaları olarak önceki simülasyonlarda 200 ns boyunca örneklenen MTBB-MT yapısından 50. ve 100. ns'lerden farklı bağlanma pozlarına sahip anlık yapılar

VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) kullanılarak elde edilmiştir. Alınan yapıların su kutuları SMD simülasyonları sürecinde sistem için küçük kaldığından anlık yapılar bulundukları su kutusundan alındı. SMD simülasyonlarında reaksiyon koordinatı MT'nin β -tübülün bölgesinin D251-V260 amino asit indeksine sahip sarmalının alfa karbonlarının kütle merkezinden, MTBB'nin H1-H6 sarmallarının alfa karbonlarının kütle merkezine doğru geçecek şekilde belirlendi. Bu reaksiyon koordinatının vektörü z eksenine hizalanarak sistemin koordinatları kaydedildi. Daha sonrasında VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) "Solvate v1.5" eklentisi kullanılarak sistem su içerisinde tekrardan çözüldü. Bu kutunun boyutları $\pm x$, y yönlerinde 20 Å, $-z$ yönünde 15 Å ve $+z$ yönünde 50 Å olarak seçildi. Yeni sistem VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) "Autoionize v1.5" eklentisi kullanılarak 0.15 M NaCl ile iyonize edildi ve daha sonrasında sistemin yükü nötr hale getirildi. Yeni oluşan sistem 267.644 atom içermektedir (Şekil2.6).



Şekil 2.6 : MTBB'nin MT'den kopmasının SMD simülasyonları için hazırlanan sistem. SMD reaksiyon koordinat vektörü z eksenine hizalanmıştır ve mavi ok ile gösterilmiştir.

2.9 Dinein MTBB'sinin MT'den Kopmasının SMD Simülasyon Detayları

SMD simülasyonları, MD simülasyonları ile erişebileceğimiz zaman ölçeğinde biyolojik prosesleri keşfetmemizi sağlar. Bu yöntem, ligandların bağlanma yolağının tanımlanmasından, proteinlerin elastik özelliklerinin açıklanmasına kadar çok geniş yelpazedeki prosesleri incelemek için kullanılabilir (Isralewitz ve diğ, 2001). SMD simülasyonlarının ana fikri atom veya atomlara dış kuvvet uygulanarak reaksiyon koordinatı üzerinde bir yöne doğru çekmektir. Çekme prosesi sabit bir hızla ya da sabit bir kuvvet uygulanarak gerçekleştirilebilir (Phillips ve diğ, 2003; Phillips ve diğ, 2005).

Bu tez çalışmasında MTBB MT'den sabit bir hızla çekileceği için SMD simülasyonu sabit hızla yapılacaktır. Sabit hızla yapılan SMD simülasyonlarında belirlenen atomların kütle merkezlerine kukla atom sanal bir yay ile bağlanır. Daha sonrasında ise kukla atom sabit hızla çekilir. Çekme prosesi sırasında iki atom arasındaki sanal yaya bağlı uygulanan kuvvet denklem 2.4 ve 2.5 ile hesaplanır (Phillips ve diğ, 2005).

$$\vec{F} = -\nabla U \quad (2.4)$$

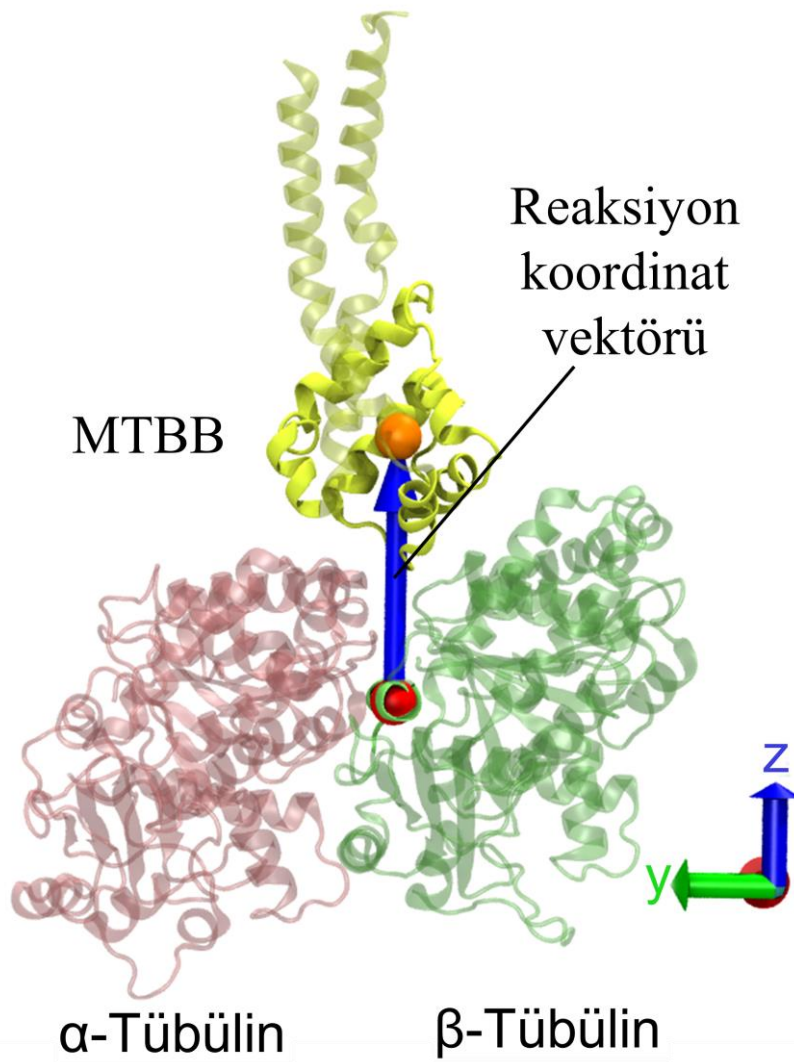
$$U = \frac{1}{2} \cdot k \cdot [v \cdot t - (\vec{r} - \vec{r}_0) \cdot \vec{n}]^2 \quad (2.5)$$

Burada, U potansiyel enerjiyi, k bağlanan sanal yayın yay sabitini, v çekme hızını, t zamanı, $\vec{r}$ belirlenen atom/atomların anlık koordinatı, $\vec{r}_0$ belirlenen atom/atomların başlangıç pozisyonları ve $\vec{n}$ ise çekme yönünü ifade etmektedir (Phillips ve diğ, 2005).

200 ns'lik MD simülasyonunun 50. ve 100. ns'lerinden alınan anlık yapılar ile hazırlanan sistemler 2.7 başlığında olduğu gibi minimizasyon ve dengeleme simülasyonları yapılarak dengeye getirildi. Bu adım sonucunda iki anlık yapı için ayrı ayrı toplamda 7 ns dengeleme simülasyonu yapıldı.

MD simülasyonlarının 50. ve 100. ns'lerinden alınan anlık yapıların bağlanma enerjisini bulabilmek için, söz konusu yapılar her biri 5 kez olmak üzere 1 ns aralıklarla örneklenerek toplamda 10 yapı elde edildi. Bu 10 yapı için ayrı ayrı 10 ns SMD simülasyonu (toplamda 100 ns) gerçekleştirildi. SMD simülasyonlarında reaksiyon koordinatı MT'nin β -tübülün bölgesinin D251-V260 amino asit indeksine sahip sarmalının alfa karbonlarının kütle merkezinden, MTBB'nin H1-H6 sarmallarının alfa karbonlarının kütle merkezine doğru olacak şekilde reaksiyon

koordinatı belirlendi. (Şekil 2.7). Reaksiyon koordinatı belirlenirken kullanılan MTBB'nin amino asitlerinin alfa karbonları sanal bir yay ile kukla atomlara bağlandı. Buna ek olarak MT'nin β -tübülün bölgesinin D251-V260 amino asit indeksine sahip sarmalının alfa karbonları seçildi ve sabitlendi. Her bir SMD simülasyonu boyunca seçilen atomlar 2.5 Å/ns sabit hız ile 10 ns çekildi. SMD simülasyonlarında yay sabiti 200 kcal/mol/Å^2 olarak belirlendi. 10 farklı andaki örnek için toplamda 100 ns SMD simülasyonu gerçekleştirildi ve böylece 10 farklı örnek için MTBB'nin MT'den kopması modellenmiş oldu. Dinein MTBB'sinin MT'ye bağlanmasının ve kopmasının simülasyon detayları Çizelge 2.2 ile gösterildi.



Şekil 2.7 : MTBB'nin MT'den kopmasının SMD simülasyonlarında reaksiyon koordinat vektörü. MT'nin β -tübülünün D251-V260 sarmalının amino asitlerinin alfa karbonlarının kütle merkezinden (kırmızı küre), MTBB'nin H1-H6 sarmallarının amino asitlerinin alfa karbonlarının kütle merkezine (turuncu küre) doğru geçecek şekilde belirlenmiştir. SMD reaksiyon koordinat vektörü mavi ok ile gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 : MTBB'nin MT'ye bağlanmasının ve kopmasının modellendiği simülasyonların toplam atom sayıları ve süreleri.

Simülasyon Tipi	Atom Sayısı	Dengeleme Simülasyonu (ns)	MD/SMD Simülasyonları (ns)
MD (MT'ye Bağlanma)	170,514	7	200
SMD (MT'den Kopma)	267,644	7	100

2.10 Serbest Enerji Hesaplaması

SMD simülasyonlarında çekme işlemi sırasında kullanılan hız sınırlı bir hızdır. Hızın sınırlı olmasının sebebi çekme işlemi sırasında sistemde sürtünme olmasıdır. Sürtünmenin olması sistemde entropi üretir. Entropi oluşmasından dolayı süreç dengesizlik (geri dönüşümsüz) durumdadır. Çekme hareketi esnasında sisteme uygulanan işlerden bazıları, çekme prosesinin geri dönüşümsüzlüğünü bozabilir. Bu yüzden sistemin serbest enerji değişimi, sisteme uygulanan iş değerinden daha düşük olmalıdır. Termodinamiğin ikinci yasası gereği sistemin ilk ve son durumları arasındaki serbest enerji değişimi sisteme uygulanan ortalama iş değerinden büyük olamaz (Denklem 2.6).

$$\Delta A = A_{son} - A_{ilk} \leq \langle W \rangle \quad (2.6)$$

Bu yaklaşım serbest enerji farkına bir üst sınır sağlamış olur. Jarzynski eşitliği (Denklem 2.7) kullanılarak serbest enerji değişiminin sürecin hızından bağımsız elde edilmesi sağlanır (Jarzynski, 1997a; Jarzynski, 1997b).

$$e^{-\beta \Delta A} = \langle e^{-\beta W} \rangle \quad (2.7)$$

Jarzynski eşitliği, denge serbest enerji farkları ile denge dışı prosesler yoluyla yapılan iş arasındaki ilişkidir (Park ve diğ, 2003). Jarzynski eşitliğinin asıl zorluğu ortalamaya sadece nadiren gözlemlenen küçük iş değerlerinin hâkim olmasıdır. Bu nedenle, az sayıda SMD simülasyonu yapılırsa, hızın bu kadar küçük iş değerlerine izin verecek kadar küçük olması gerekir.

Sistem, sabit sıcaklık (**T**) ve basınçtaki (**P**) MD simülasyonu ile ifade edilen **N** parçacıktan oluşan klasik mekanik bir sistem olarak tanımlanmaktadır. Sistemin mikroskobik konfigürasyonu 3N boyutlu pozisyon vektörü (**R**) ve momentum vektörü

(**p**) tarafından tanımlanır. SMD simülasyonlarında, λ parametresine bağlı, dış harmonik yönlendirme potansiyeli $h_\lambda(\mathbf{R})$ uygulanır ve böylece λ değiştirilerek sistem, ξ koordinatı boyunca denklem 2.8 ile yönlendirilir (Park ve Schulten, 2004).

$$h_\lambda(\mathbf{R}) = \frac{k}{2}(\xi(\mathbf{R}) - \lambda)^2 \quad (2.8)$$

Bu denklemdeki k , yay sabitidir. Değiştirilmiş Hamiltonian denklem 2.9 ile tanımlanır.

$$H_\lambda(\mathbf{R}, \mathbf{p}) = H_0(\mathbf{R}, \mathbf{p}) + h_\lambda(\mathbf{R}) \quad (2.9)$$

Burada, $H_0(\mathbf{R}, \mathbf{p})$ orijinal sistemin Hamiltonian'ıdır. Başlangıç durumları $\mathbf{R}_0, \mathbf{p}_0$ olan yörünge topluluğunun ortalaması $\langle W \rangle$, Hamiltonian denklemi $H_0(\mathbf{R}_0, \mathbf{p}_0)$ 'a göre kanonik topluluktan örneklandı (Park ve diğ, 2003). Sabit hızlı SMD simülasyonları yapıldı, bu simülasyonlarda λ sabit bir hızla denklem 2.10'daki gibi değiştirildi (Humphrey ve diğ, 1996; Jarzynski, 1997b; Park ve diğ, 2003; Park ve Schulten, 2004; Best ve diğ, 2012).

$$\lambda(t) = \lambda(0) + vt \quad (2.10)$$

Burada t zaman ve $\lambda(t)$ ise t simülasyon zamanındaki λ parametresinin değeridir. Dış iş denklem 2.11 ile hesaplanır.

$$W_{\lambda(0) \rightarrow \lambda(t)} = \int_{\lambda(0)}^{\lambda(t)} F d\lambda \quad (2.11)$$

Sisteme uygulanan kuvvet olan F ise denklem 2.12 ile hesaplanır.

$$F = \frac{dh_\lambda(\mathbf{R})}{d\lambda} = -k[\xi(\mathbf{R}_{t'}) - \lambda(0) - vt'] = vdt \quad (2.12)$$

F kuvvetini çekme yönünde elde etmek için, kuvvetin skaler çarpımı ($\vec{f}$) simülasyondaki SMD atomlarına uygulanır ve çekme yönü reaksiyon koordinatı ($\vec{n}$) hesaplanmalıdır ($F = \vec{f} \cdot \vec{n}$) (Phillips ve diğ, 2005).

Jarzynski eşitliği, iş değerlerini $W_{\lambda(0) \rightarrow \lambda(t)}$ kullanarak serbest enerji farklılıklarının $A(\lambda(t)) - A(\lambda(0))$ hesaplanmasını sağlar. Reaksiyon koordinatının ξ bir fonksiyonu olan serbest enerji profili, potansiyel ortalama kuvvet (*İngilizcesi* potential mean force, PMF) olarak adlandırılır (Park ve diğ, 2003). $\xi(\mathbf{R}_t)$, yörüngeler boyunca aynı $\lambda(t)$

değeri ile dalgalandığı için, farklı reaksiyon koordinatları $\xi(\mathbf{R}_t)$ görülebilir. Bu durumda, PMF $\Phi(\xi)$ değerini hesaplamak için, aynı reaksiyon koordinatında ξ fakat farklı t zamanında olan $W_{\lambda(0) \rightarrow \lambda(t)}$ değerleri birleştirilmelidir. Yönlendirici potansiyelin yay sabiti k , reaksiyon koordinatı kısıtlama merkezini λ yakından takip edebileceği kadar yeterli büyüklükte olduğunda, sert yay yaklaşımı ortaya çıkar (Park ve diğ, 2003). Bu yaklaşım denklem 2.13 ile ifade edilir.

$$A(\lambda) \approx \Phi(\lambda) \quad (2.13)$$

SMD simülasyonlarımızda reaksiyon koordinatı, kısıtlama merkezini λ yakından takip edebilmektedir ve sert yay yaklaşımı uygulanabilir. Dolayısıyla, $W_{\lambda(0) \rightarrow \lambda(t)}$ iş değerleri kullanılarak Jarzynski eşitliği ile $A(\lambda)$ ve $\Phi(\lambda)$ hesaplandı.

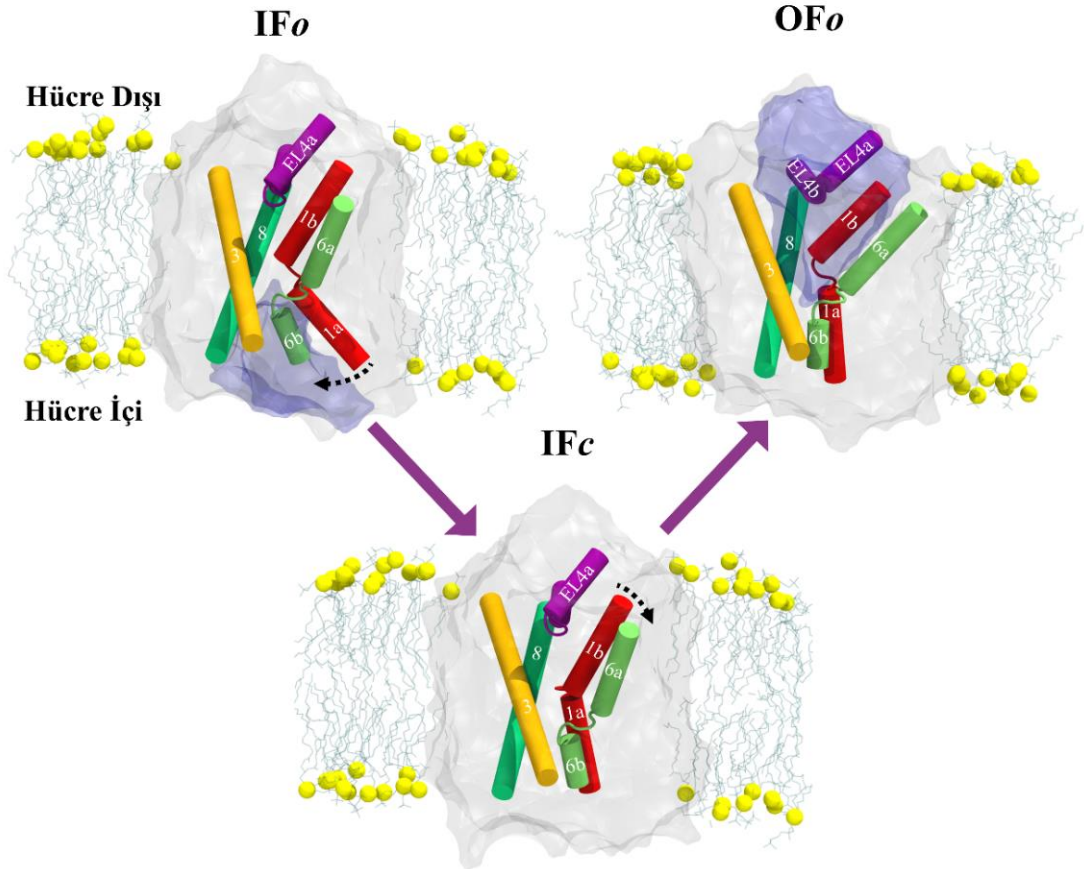
SMD simülasyonlarındaki atomlara uygulanan dış potansiyel sebebiyle, MTBB etki altında kalmış olacaktır. Bu sebeple, son konformasyonlar denge durumunda olmayacaktır. Ancak, bu son durumları dengeye getirmek için bir dış iş gerekmez. Dolayısıyla, Jarzynski eşitliği denge durumları arası geçişler açısından ifade edilebilir (Park ve Schulten, 2004).



3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 LeuT'nin IFo→Ofo Yapısal Geçişi Boyunca Basınç Profilleri

IFo→Ofo yapısal geçişinin modellenmesini sağlayan MD simülasyonlarından elde edilen veriler VMD programı kullanılarak görsel olarak incelenmiştir. Simülasyonlardan alınan yapılar için ayrı ayrı elde edilen sonuçlar incelendiğinde IFo halini (TH1) temsil eden yapının hücre içine bakan açık halde bulunduğu ve bu durumda TM1a-TM6b sarmallarının hücre içine bakan açıklığı oluşturacak şekilde paketlenmişti (Şekil 3.1).



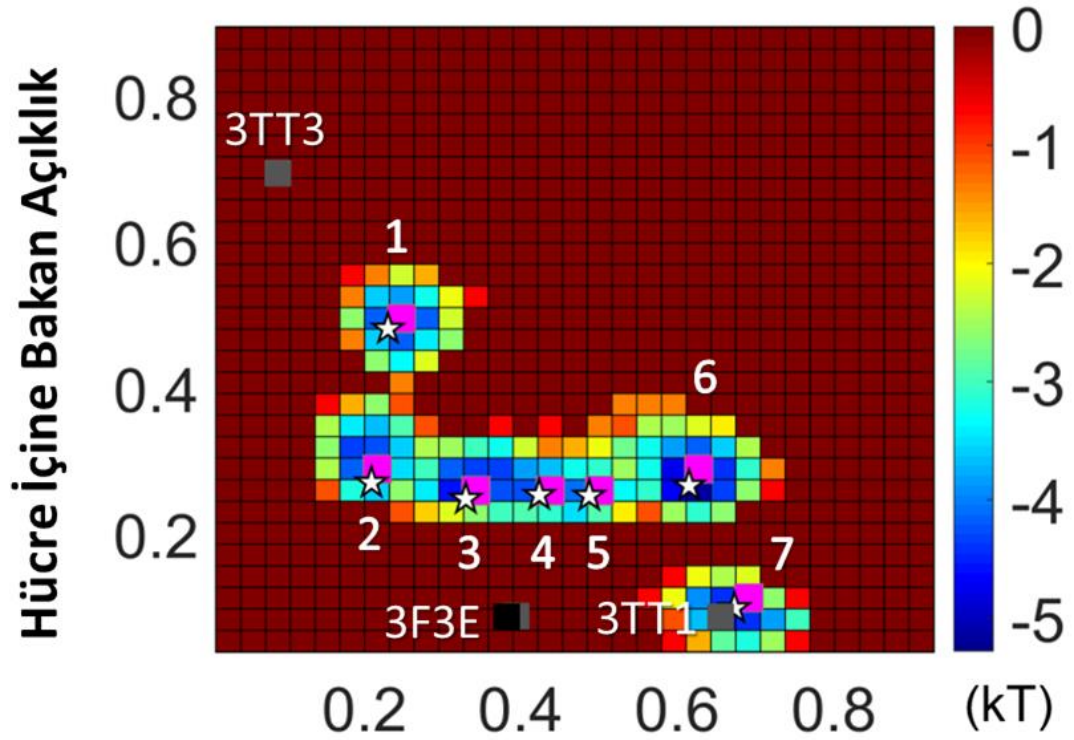
Şekil 3.1 : LeuT'nin IFo→Ofo halleri arasındaki yapısal geçiş boyuncası TM1a-TM6b ve TM1b-TM6a sarmallarının simülasyonlarda değişimi. TM1, TM3, TM6, TM8 ve EL4 sırasıyla kırmızı, turuncu, açık yeşil, koyu yeşil ve mor renkte gösterilmiştir. Siyah oklar LeuT sarmallarının simülasyonlar boyunca meydana gelen hareket yönlerini göstermektedir.

Simülasyonlarda IFc alt halleri (TH2-TH6), IFo→Ofo yapısal geçişi boyunca oluşan yapılardır ve bu yapılar hücre içine bakan kapalı halleri temsil etmektedir. Simülasyonlarda bu yapılarda TM1a-TM6b sarmalları TM3-TM8'e doğru hareket etmekte ve hücre içine bakan açıklığı kapatmaktadır. Böylece IFo hali ile Ofo hali arasında hücre içine kapalı alt haller oluşmaktadır.

Ofo hali (TH7) için ise yapı hücre dışına bakan açıklık halini temsil etmektedir. Simülasyonlarda TM1b-TM6a sarmallarının TM3-TM8'den uzaklaşması ile hücre dışına bakan açıklık oluşmaktadır (Şekil 3.1).

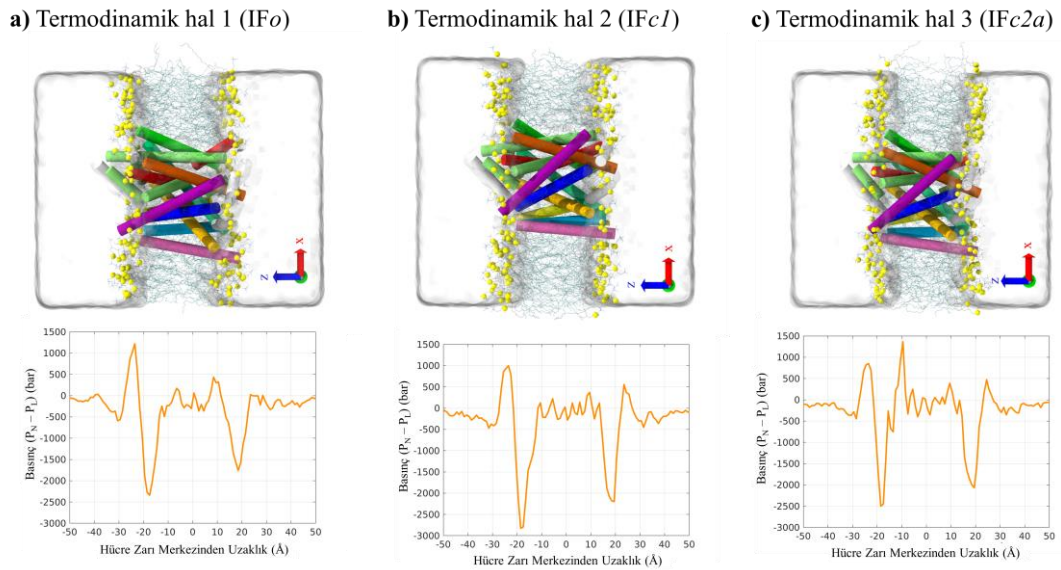
Gur ve diğ. (2015) tarafında elde edilen enerji yüzeyinden LeuT'nin 7 termodinamik halini (TH1-TH7) temsil eden apo monomer LeuT yapıları alınmıştır. Alınan yapılar kullanılarak IFo→Ofo halleri arasındaki yapısal geçiş boyunca LeuT'nin lipit tabaka üzerine yaptığı basıncın ölçülmesi için her bir yapı lipit tabaka içine yerleştirilerek 150 ns MD simülasyonları yapılmıştır. MD simülasyonlarından elde edilen veriler kullanılarak apo haldeki LeuT monomeri için yeniden enerji yüzeyi oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Bu yeni elde edilen enerji yüzeyinde Gur ve diğ. (2015) tarafında elde edilen enerji yüzeyinden alınan 7 yapı (TH1-TH7) eflatun renkli kareler olarak gösterilmiştir. Oluşturulan yeni enerji yüzeyinde IFo→Ofo halleri arasındaki yapısal geçiş boyunca 7 minimum enerji noktası belirlenmiş ve bu noktalar sırasıyla IFo (TH1), IFc1 (TH2), IFc2a (TH3), IFc2b (TH4), IFc2c (TH5), IFc3 (TH6) ve Ofo (TH7) hallerini temsil eden noktalar olarak tanımlanmıştır. Bu termodinamik hallerden TH2 ve TH6 arasındaki yapılar IFo→Ofo halleri arasındaki yapısal geçiş boyunca apo LeuT'nin geçtiği enerji yüzeyindeki minimum bölgelerdeki yapılardır ve bu yapılar hücre içine bakan kapalı (IFc) haldedir.

TH1-TH7 yapıları için 150 ns'lik simülasyon verileri kullanılarak (toplam 1050 ns) elde edilen ve minimum noktaları gösteren enerji yüzeyi Şekil 3.2'de gösterilmektedir. Elde edilen yeni enerji yüzeyindeki örneklerin, önceki çalışmanın enerji yüzeyindeki örneklerden daha düşük enerjiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. LeuT'nin IFo→Ofo yapısal geçişinin modellendiği simülasyonlardan lipit tabaka üzerine yapılan basınç verileri elde edilerek Şekil 3.3'deki basınç profilleri elde edilmiştir.



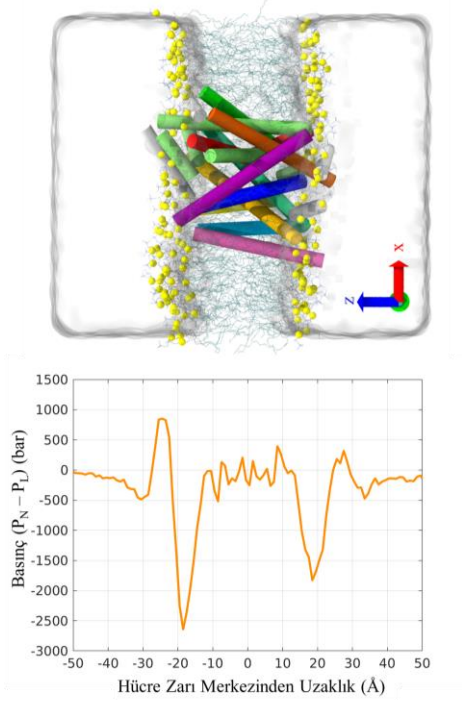
Hücre Dışına Bakan Açıklık

Şekil 3.2 : Apo LeuT'nin TH1-TH7 yapıları için gerçekleştirilen 150 ns'lik MD simülasyonlarından elde edilen enerji yüzeyi. Eflatun renkli kareler Gur ve diğ. (2015) tarafından elde edilen enerji yüzeyinden alınan 7 termodinamik hali temsil eden anlık yapılarıdır. Yıldız ile belirtilen noktalar yeni oluşturulan sistemlerin başlangıç konformasyonlarının alındığı anlık yapılarıdır. Gri ve siyah noktalar literatürde bulunan kristal yapılarının (PDB kodu: 3TT3, 3F3E ve 3TT1) pozisyonlarını göstermektedir.

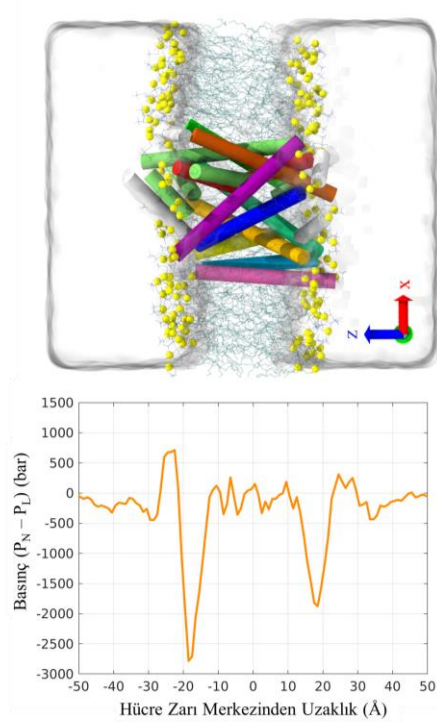


Şekil 3.3 : Apo LeuT'nin TH1-TH7 için MD simülasyonları ile elde edilen basınç profilleri.

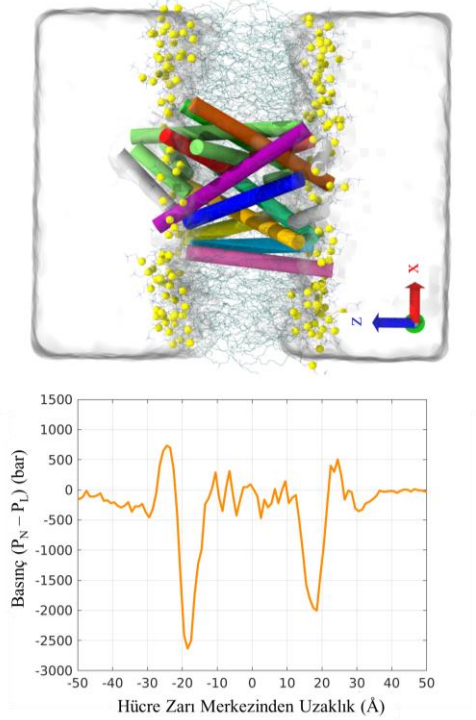
d) Termodinamik hal 4 (IFc2b)



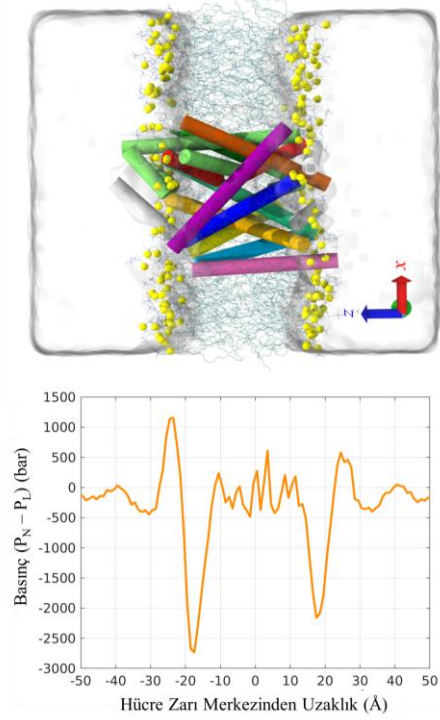
e) Termodinamik hal 5 (IFc2c)



f) Termodinamik hal 6 (IFc3)



g) Termodinamik hal 7 (OFo)

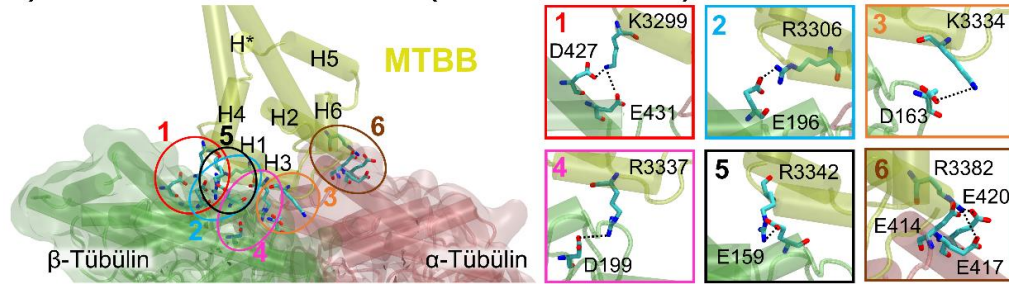


Şekil 3.3 (Devam) : Apo LeuT'nin TH1-TH7 için MD simülasyonları ile elde edilen basınç profilleri.

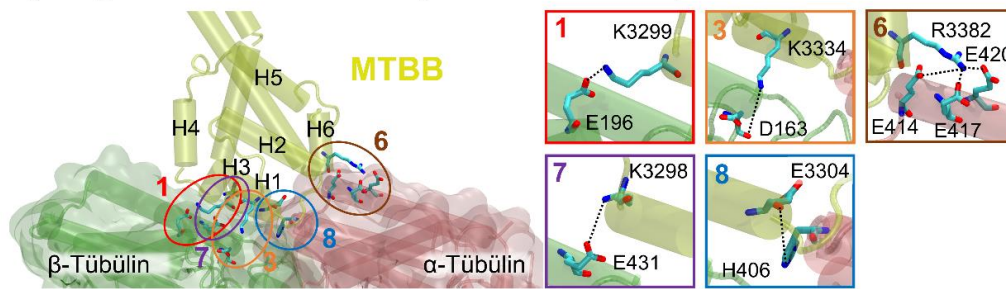
3.2 Literatürdeki Dinein MTBB-MT Yapılarının Etkileşimleri

MTBB'nin MT ile olan etkileşimlerinin düşük afiniteli ve yüksek afiniteli yapılarda nasıl değiştiğini analiz etmek için kriyo elektron mikroskobu ile elde edilen 3 adet MT'ye bağlı *M. musculus* organizmasına ait sitoplazmik dynein-1 yapısı analiz edilmiştir (Şekil 3.4). Yapılar VMD'de (Humphrey ve diğ, 1996) görsel olarak incelenmiş ve daha sonra MTBB ile MT arasındaki etkileşimler VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) "Salt Bridges" eklentisi kullanılarak elde edilmiştir.

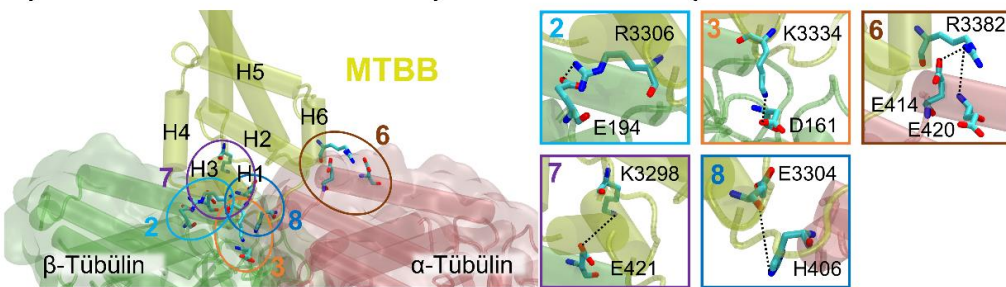
a) Yüksek afiniteli dinein 1 (Pdb kodu: 3J1T)



b) Düşük afiniteli dinein 1 (Pdb kodu: 3J1U)



c) Yüksek afiniteli dinein 1 (Pdb kodu: 6RZB)



Şekil 3.4 : Literatürde bulunan kristal yapıların MTBB-MT etkileşimleri. Şekilde MTBB sarı, MT'nin α -tübülin ve β -tübülin kısımları sırasıyla pembe ve sarı renklerle gösterilmiştir. Kutucuk numaralandırmaları ile MTBB amino asitleri özdeşleştirilmiştir ve aynı amino asit için aynı renk ve numara kullanılmıştır.

İlk olarak kriyo elektron mikroskobu yöntemi ile 9.7 Å çözünürlükte elde edilen *M. musculus* organizmasına ait sitoplazmik dynein-1 MTBB'sinin MT'ye yüksek afiniteye sahip olduğu yapı (PDB kodu: 3J1T) (Redwine ve diğ, 2012) incelenmiştir.

Başlangıçta VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) kullanılarak yapı görsel olarak incelenmiş ve yapıda MTBB'nin 7 alfa sarmaldan (H1-H6 ve H*) oluştuğu gözlemlenmiştir. H* sarmalı normalde diğer yapılarda bulunmazken bu yapıda bulunmaktadır. Bu fazladan oluşan sarmalın yapının elde edilme çözünürlüğünün (9.7 Å) çok düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapıda MTBB, MT'ye yüksek afinite ile bağlı haldedir ve MT α -tübülün ve β -tübülün olmak üzere iki kısım içermektedir. MTBB ile MT arasındaki 6 Å uzaklıktaki etkileşimler VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) "Salt Bridges" eklentisi kullanılarak elde edilmiştir. Sonuç olarak MTBB bölgesinin H1 (K3299 ve R3306), H3 (K3334, R3337), H6 (R3382) sarmalları ve bu sarmallara yakın bulunan amino asitlerin (R3342) MT amino asitleri ile oluşturduğu tuz köprüsü ve elektrostatik etkileşimler tespit edilmiş ve Şekil 3.4a'da gösterilmiştir.

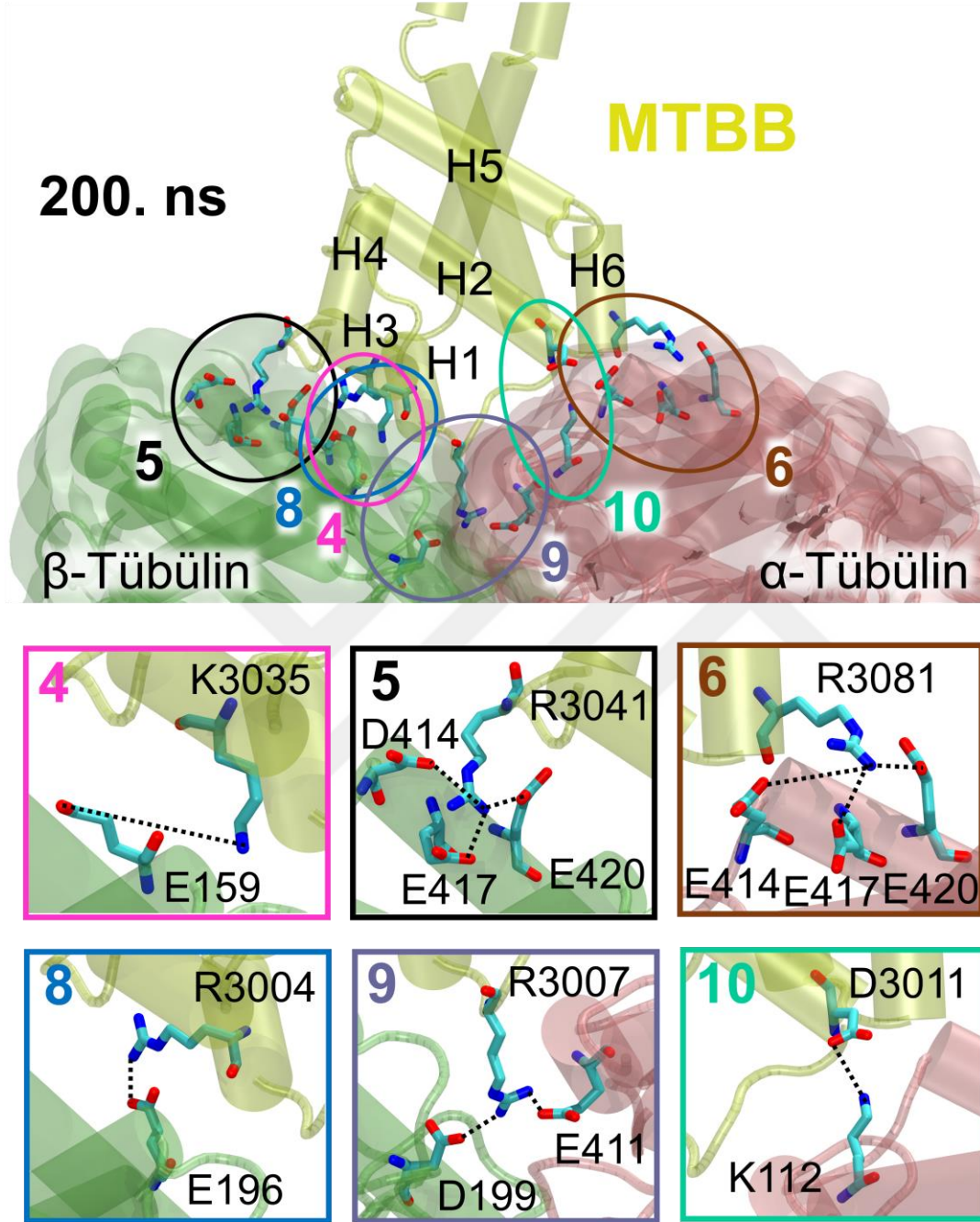
İkinci olarak *M. musculus* organizmasına ait 9.7 Å çözünürlükteki sitoplazmik dinein-1 MTBB'sinin MT'ye düşük afiniteye sahip olduğu yapı (PDB kodu: 3J1U) (Redwine ve diğ, 2012) incelenmiştir. Düşük afiniteli bu yapı VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) kullanılarak görsel olarak incelendiğinde MTBB'nin 6 adet alfa sarmaldan (H1-H6) oluştuğu ve MT'nin α -tübülün ve β -tübülün olmak üzere iki kısım içerdiği gözlemlenmiştir. Bu yapıda H3 sarmalı açılmış ve iki sarmal şekilde görülmektedir. Yapı aynı şekilde VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) "Salt Bridges" eklentisi kullanılarak 6 Å mesafedeki etkileşimlere bakılarak analiz edilmiştir. Yapıda MTBB'nin H1 (K3299 ve E3304), H3 (K3334) ve H6 (R3382) sarmalları ve bu sarmallara yakın bulunan amino asitler (K3298) ile MT amino asitleri arasında oluşan tuz köprüsü ve elektrostatik etkileşimler tespit edilmiş ve Şekil 3.4b'de gösterilmiştir. Bu yapıda MT'ye yüksek afiniteyle bağlanan yapının aksine daha az etkileşim bulunmaktadır.

Son olarak kriyo elektron mikroskobu yöntemi ile 4.1 Å çözünürlükte elde edilen *M. musculus* organizmasına ait sitoplazmik dynein-1 MTBB'sinin MT'ye yüksek afiniteye sahip olduğu yapı (PDB kodu: 6RZB) (Lacey ve diğ, 2019) incelenmiştir. Yapıda MTBB 6 adet alfa sarmaldan (H1-H6) oluşmaktadır ve MT'ye yüksek afinite ile bağlı haldedir. VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) "Salt Bridges" eklentisi kullanılarak MTBB ile MT'nin 6 Å uzaklıktaki etkileşimler elde edilmiştir. MTBB'nin H1 (E3304 ve R3306), H3 (K3334), H6 (R3382) sarmalları ve bu sarmallara yakın bulunan amino asitler (K3298) ile MT amino asitleri arasında tuz köprüsü ve

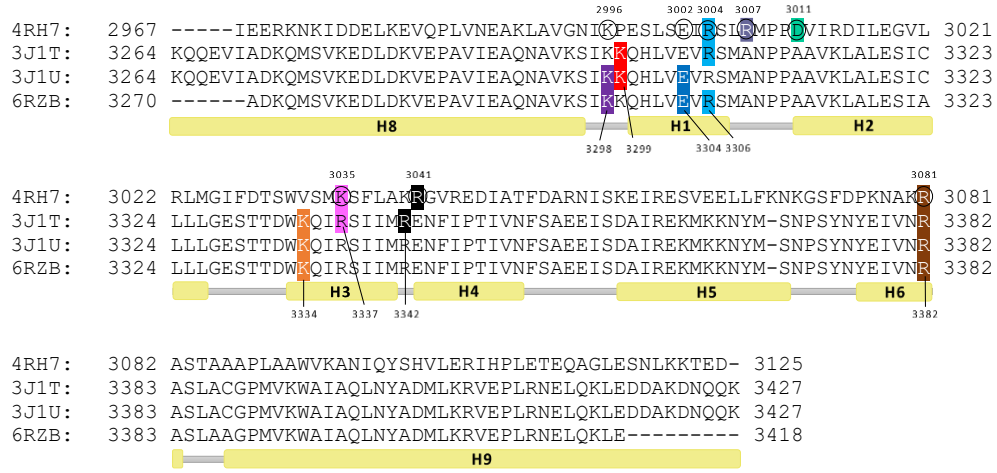
elektrostatik etkileşimler tespit edilmiştir ve bu etkileşimler Şekil 3.4c’de gösterilmiştir. Bu 3 yapı için MTBB ile MT arasındaki etkileşimler incelendiğinde MTBB’nin H1, H3 ve H6 sarmallarının MT ile etkileşimi sağladığı görülmüştür.

Bu tez çalışmasında MD simülasyonları ile 200 ns boyunca örneklenmesiyle elde edilen MT’ye bağlı dinein-2 MTBB yapısı, literatürde bulunan dinein-1 yapılarında olduğu gibi VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) kullanılarak analiz edilmiştir. MD simülasyonu yapılan sistemin MTBB’si Can ve diğ. (2019) tarafından ATP bağlı olarak elde edilen eksiksiz insan dinein-2 yapısından alınmıştır ve bu yapı literatürde incelenen yapılardan farklıdır. Literatürdeki yapıların MTBB’leri *M. musculus* dinein-1 yapısına ait iken, MD simülasyonu yapılan sistemin MTBB’si insan dinein-2 yapısına aittir. Simülasyonlarda elde edilen yapının MT kısmı, literatürde bulunan ve PDB kodu: 3J1T (Redwine ve diğ, 2012) olan yapıdan alınmıştır. 200 ns boyunca gerçekleştirilen MD simülasyonlarında MTBB’nin MT ye 10. ns’de bağlandığı gözlemlenmiştir. Simülasyonlardan elde edilen yapı VMD programı (Humphrey ve diğ, 1996) kullanarak görsel olarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda yapının MTBB’sinin 6 alfa sarmaldan (H1-H6) oluştuğu gözlemlenmiştir ve MT α -tübülün ve β -tübülün olmak üzere iki kısım içermektedir (Şekil 3.5). 200 ns lik simülasyon boyunca değişen etkileşimlerin tespit edilmesi için, literatürdeki yapılarda olduğu gibi VMD programının (Humphrey ve diğ, 1996) “Salt Bridges” eklentisi kullanılarak 6 Å mesafedeki etkileşimler ve bu etkileşimlerin değişimleri tüm simülasyon için elde edilmiştir. Simülasyon boyunca dinein-2 MTBB’sinin H1 (R3004), H2 (D3011), H3 (K3035), H4 (R3041), H6 (R3081) sarmalları ve bu sarmallara yakın bulunan amino asitler (R3007) ile MT amino asitleri arasında oluşan tuz köprüsü ve elektrostatik etkileşimler tespit edilmiş ve Şekil 3.5’de 200. ns için olan anlık yapıda gösterilmiştir. Simülasyonun 10. ns’si için elde edilen anlık yapıda MTBB’nin MT ile yaptığı etkileşimler EKB’de gösterilmiştir.

Literatürdeki dinein-1 yapılarındaki etkileşimler (PDB kodu: 3J1T, 3J1U ve 6RZB) ile MD simülasyonlarındaki dinein-2 yapısının etkileşimleri karşılaştırıldığında, bu iki dinein yapısının sekans hizalamasında birbirine karşılık gelen birçok amino asidin aynı etkileşimlere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Söz konusu etkileşimler Şekil 3.4 ve 3.5’deki renkler kullanılarak Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

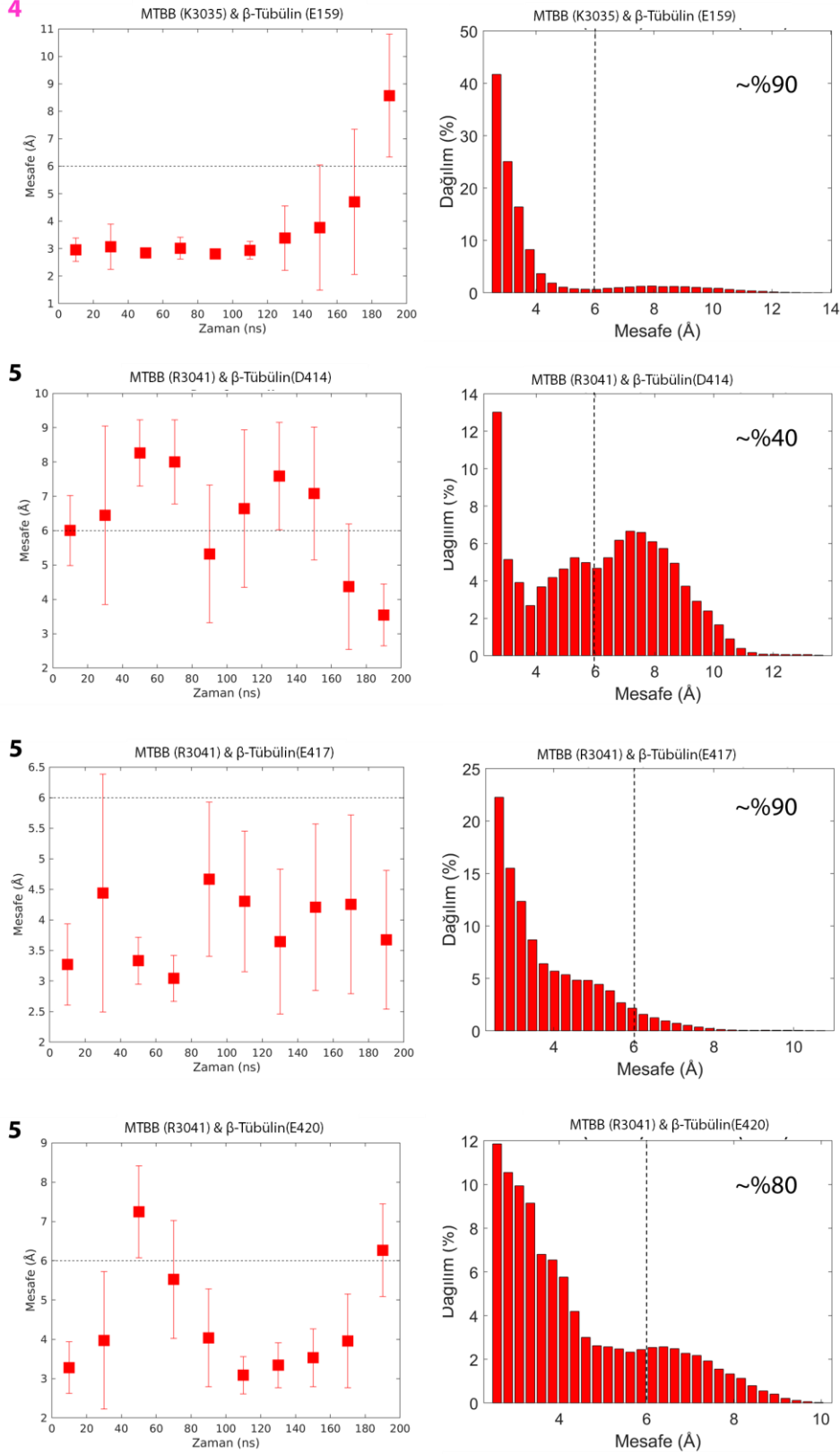


Şekil 3.5 : Simülasyon sonucu elde edilen yapıdaki MTBB-MT etkileşimleri. Şekilde MTBB sarı, MT'nin α -tübülün ve β -tübülün kısımları sırasıyla pembe ve sarı renklerle gösterilmiştir. Kutucuk numaralandırmaları Şekil 3.4, MTBB amino asitleri ile özdeşleştirilmiş ve aynı amino asit için aynı renk ve numara kullanılmıştır.

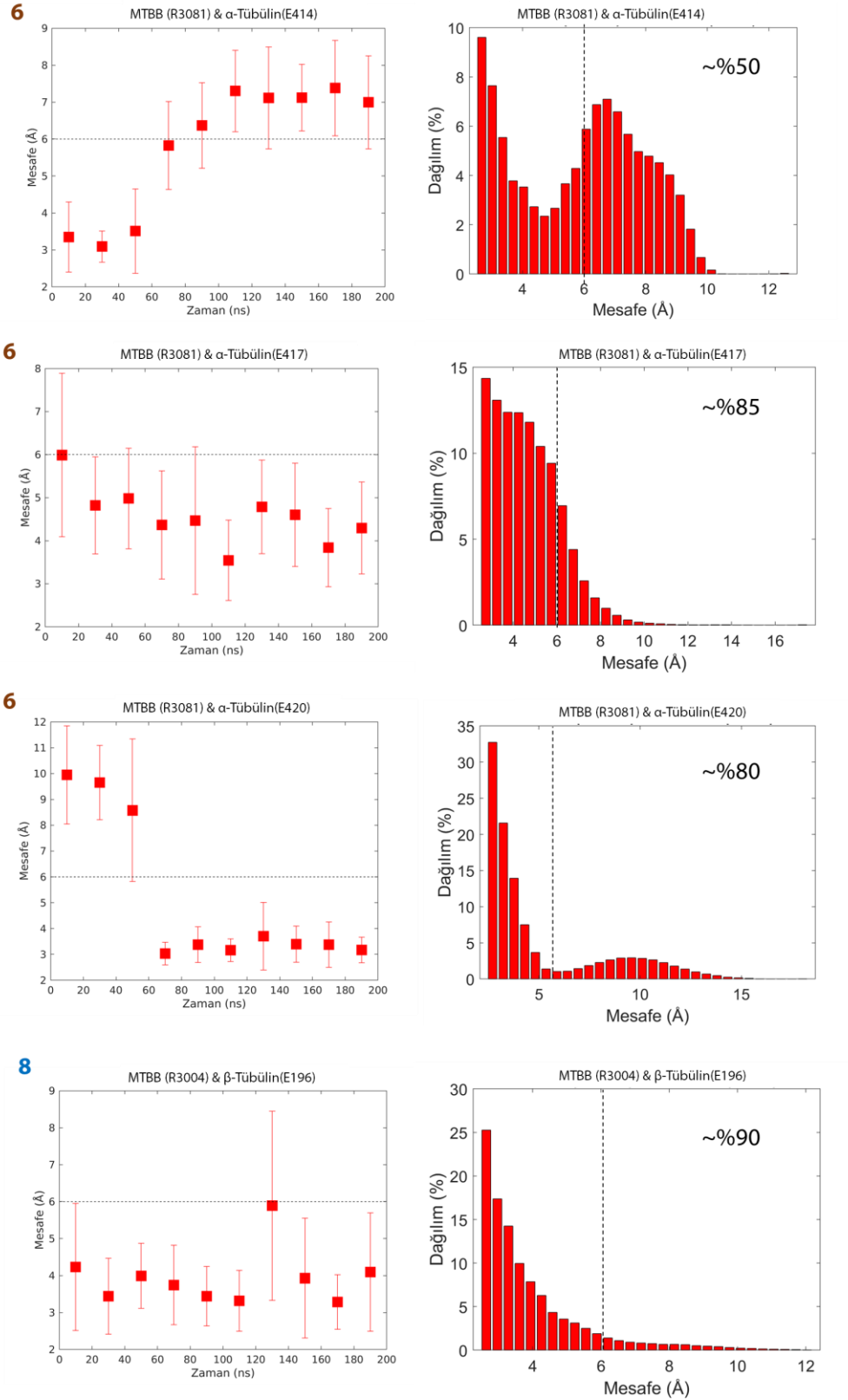


Şekil 3.6 : İnsan dinein-2 (PDB kodu: 4RHY) ve *M. musculus* dinein-1'e (PDB kodu: 3J1T, 3J1U, 6RZB) ait MTBB'lerinin sekans hizalaması. Sekans hizalaması yapılırken, yapıların PDB veri tabanından (www.rcsb.org) (Berman ve diğ, 2003) elde edilen FASTA sekanslarından MTBB'leri alınarak, UniProt veri tabanındaki (Consortium, 2018) hizalama aracı kullanılmıştır. Hizalamada renkli olarak gösterilen amino asitler yapılarıdaki etkileşimleri temsil etmektedir ve renkler önceki şekiller ile özdeşleştirilmiştir.

M. musculus dinein-1 ile insan dinein-2 MTBB'lerinin MT ile etkileşimlerine bakıldığında iki yapıdaki asidik ve bazik amino asitlerin MT amino asitleri ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. İnsan dinein-2 yapısında Şekil 3.5'de 4-6 (K3035, R3041, R3081) ve 8 (R3004) olarak numaralandırılan etkileşimlerin *M. musculus* dinein-1 yapısında da (R3337, R3342, R3382 ve R3306) bulunduğu gözlemlenmiştir. Dinein-2 yapısında, dinein-1'den farklı olarak R3007 (9) ve D3011 (10) etkileşimleri bulunmaktadır. Dinein-2'deki bu amino asitlere dinein-1'de karşılık gelen asitlerin (A3309 ve A3313) polar olmayan özellikte olmasından dolayı bu etkileşimlerin dinein-1 yapılarında bulunmadığı düşünülmektedir. Dinein 1'deki K3299 (1), E3304 (2) etkileşimleri dinein-2 yapısı için yapılan simülasyonlarda (K2996 ve E3002) nadiren görülmüştür ve bu etkileşimler kalıcı hale gelememiştir. Bu yüzden bu etkileşimler Şekil 3.5'de gösterilmemiştir. Dinein-1 yapısındaki K3334 (3) ve K3298(7) etkileşimleri ise dinein-2 yapısında bulunmamaktadır. Bu etkileşimlere dinein-2 de polar olmayan amino asitler (V3032 ve P2997) karşılık gelmektedir ve bu yüzden dinein-2' de bu etkileşimler oluşmamıştır. MTBB'nin MT ye bağlanmasını sağlayan 200ns'lik MD simülasyonu boyunca oluşan etkileşimler için etkileşim mesafelerinin zamana göre değişimlerini ve etkileşim mesafelerinin simülasyon boyunca yüzde dağılımlarının bulunduğu grafikler Şekil 3.7 ile gösterilmiştir.

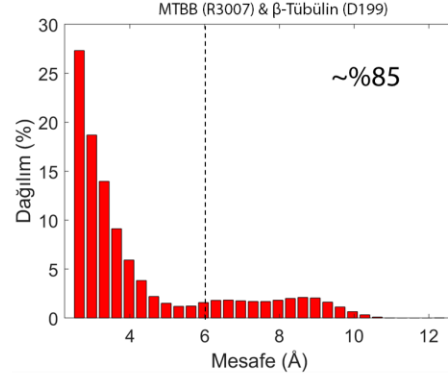
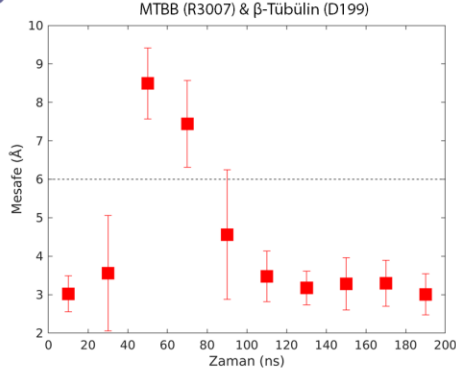


Şekil 3.7 : MTBB-MT etkileşimlerinin simülasyon süresi boyunca değişen Mesafe-Zaman ve Mesafe-Yüzde Dağılım grafikleri. 6 Å mesafedeki etkileşimlerin sınırı kesikli çizgi ile gösterilmiştir Şekilde numaralandırmalar Şekil 3.5 ve MTBB amino asitleri ile özdeşleştirilmiştir.

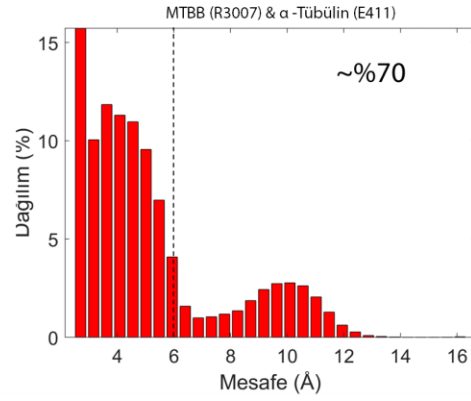
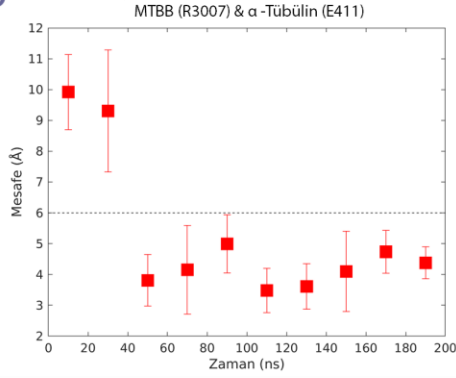


Şekil 3.7 (Devam) : MTBB-MT etkileşimlerinin simülasyon süresi boyunca değişen Mesafe-Zaman ve Mesafe-Yüzde Dağılım grafikleri. 6 Å mesafedeki etkileşimlerin sınırı kesikli çizgi ile gösterilmiştir Şekilde numaralandırmalar Şekil 3.5 ve MTBB amino asitleri ile özdeşleştirilmiştir.

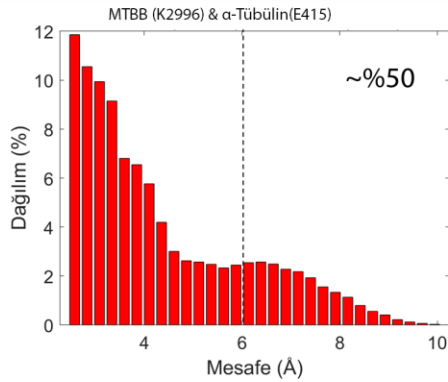
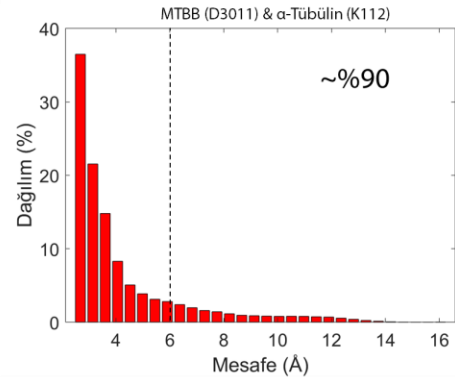
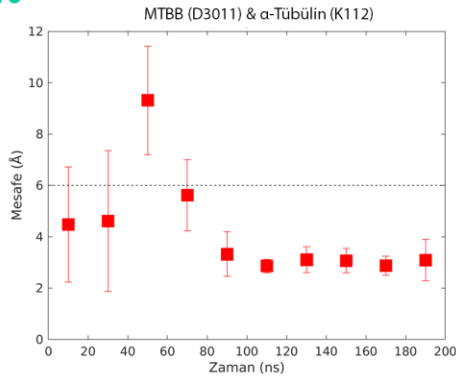
9



9

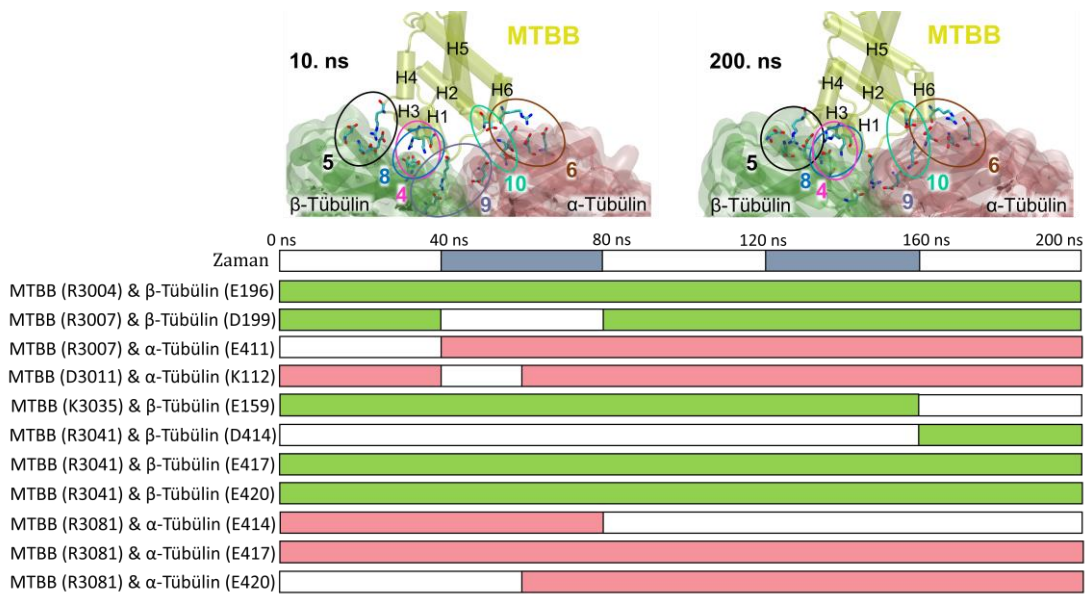


10



Şekil 3.7 (Devam) : MTBB-MT etkileşimlerinin simülasyon süresi boyunca değişen Mesafe-Zaman ve Mesafe-Yüzde Dağılım grafikleri. 6 Å mesafedeki etkileşimlerin sınırı kesikli çizgi ile gösterilmiştir Şekilde numaralandırmalar Şekil 3.5 ve MTBB amino asitleri ile özdeşleştirilmiştir.

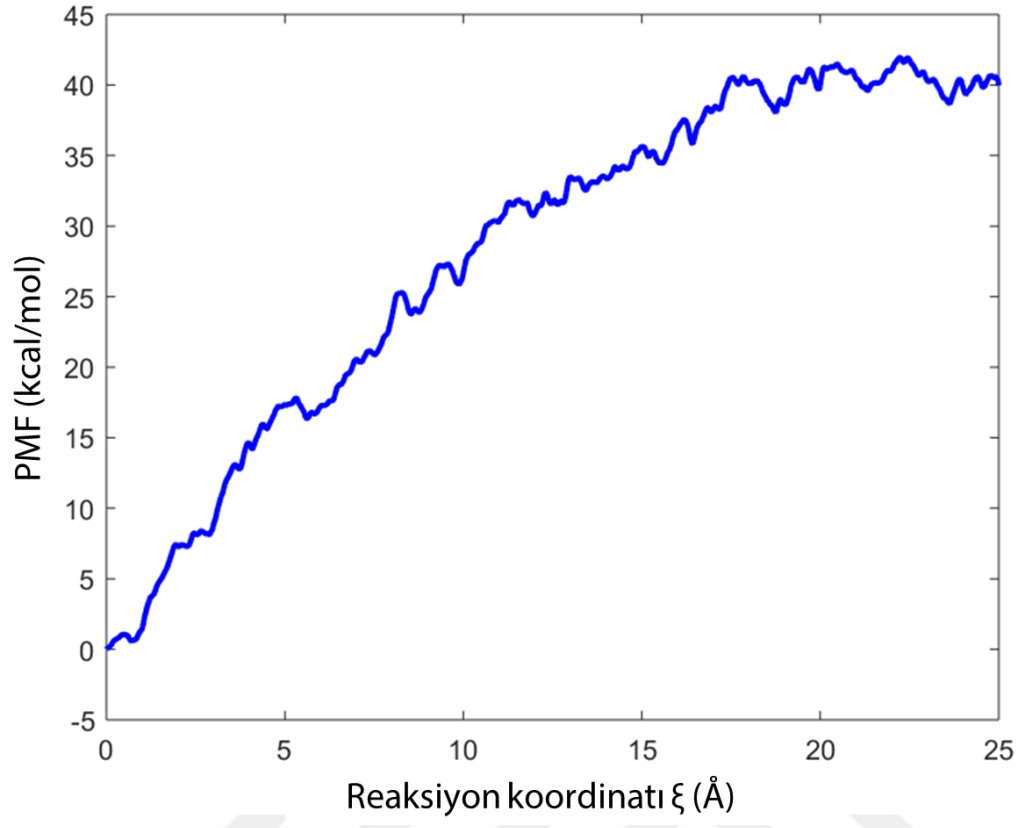
Şekilde etkileşimlerin bakıldığı 6 Å mesafesi kesikli çizgilerle gösterilmiş ve bu mesafenin dışında kalan bölgeler etkileşimin artık olmadığını göstermektedir. Grafiklerde MTBB amino asitlerinin her bir MT amino asidi ile yaptığı etkileşim için ayrı ayrı inceleme yapılmıştır. Dinein-1'deki dinein-2 yapısı için yapılan simülasyonlarda nadiren görülen ve dinein-1 yapısında K3299 (1) etkileşimine karşılık gelen K2996 etkileşimi için sadece mesafelerinin simülasyon boyunca yüzde dağılımlarını gösteren grafikler gösterilmiştir. Bu etkileşimler simülasyonlarda nadiren görüldüğü için mesafe zaman grafikleri anlamsız olmuştur. Tüm etkileşimlerin simülasyon süresi boyunca değişimleri Şekil 3.8 ile şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.8 : MTBB'nin MT ile etkileşimlerinin simülasyon boyunca değişimleri. Şekilde MTBB'nin MT'nin β-tübülini ile olan etkileşimleri yeşil ile gösterilirken, α-tübülini ile olan etkileşimleri pembe ile gösterilmiştir.

3.3 Dineinin MT'ye Bağlanmasının Serbest Enerji Değişimi

MD simülasyonlarının 50. ve 100. ns'lerinden alınan anlık yapıları için yapılan 10 SMD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Simülasyon verilerinden gelen serbest enerji değişimleri kullanılarak Şekil 3.9'daki serbest enerjinin MTBB-MT arasındaki mesafeye göre değişimini gösteren grafik elde edilmiştir. Serbest enerji grafiğinde reaksiyon koordinatı boyunca MT'ye bağlanma-kopma serbest enerjisinin 40 kcal/mol olduğu görülmüştür.



Şekil 3.9 : Serbest enerjinin MTBB-MT arasındaki mesafeye göre değişimi

KAYNAKLAR

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P.** (2015). *Molecular Biology of The Cell*. United States of America, Garland Science.
- Amara, S. G. ve Kuhar, M. J.** (1993). "Neurotransmitter transporters: recent progress." *Annual review of neuroscience* **16**(1): 73-93.
- Berman, H. M., Bourne, P. E., Westbrook, J. ve Zardecki, C.** (2003). The protein data bank. *Protein Structure*, CRC Press: 394-410.
- Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E., Mittal, J., Feig, M. ve MacKerell Jr, A. D.** (2012). "Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 dihedral angles." *Journal of chemical theory and computation* **8**(9): 3257-3273.
- Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J. ve Oiwa, K.** (2003). "Dynein structure and power stroke." *Nature* **421**(6924): 715.
- Can, S., Lacey, S., Gur, M., Carter, A. P. ve Yildiz, A.** (2019). "Directionality of dynein is controlled by the angle and length of its stalk." *Nature* **566**(7744): 407-410.
- Carter, A. P., Cho, C., Jin, L. ve Vale, R. D.** (2011). "Crystal structure of the dynein motor domain." *Science* **331**(6021): 1159-1165.
- Carter, A. P., Garbarino, J. E., Wilson-Kubalek, E. M., Shipley, W. E., Cho, C., Milligan, R. A., Vale, R. D. ve Gibbons, I.** (2008). "Structure and functional role of dynein's microtubule-binding domain." *Science* **322**(5908): 1691-1695.
- Consortium, T. U.** (2018). "UniProt: a worldwide hub of protein knowledge." *Nucleic Acids Research* **47**(D1): D506-D515.
- Forrest, L. R., Zhang, Y. W., Jacobs, M. T., Gesmonde, J., Xie, L., Honig, B. H. ve Rudnick, G.** (2008). "Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(30): 10338-10343.
- Furuta, A., Amino, M., Yoshio, M., Oiwa, K., Kojima, H. ve Furuta, K. y.** (2017). "Creating biomolecular motors based on dynein and actin-binding proteins." *Nature nanotechnology* **12**(3): 233.
- Gee, M. A., Heuser, J. E. ve Vallee, R. B.** (1997). "An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain." *Nature* **390**(6660): 636.

- Gibbons, I., Garbarino, J. E., Tan, C. E., Reck-Peterson, S. L., Vale, R. D. ve Carter, A. P.** (2005). "The affinity of the dynein microtubule-binding domain is modulated by the conformation of its coiled-coil stalk." *Journal of Biological Chemistry* **280**(25): 23960-23965.
- Gullingsrud, J. ve Schulten, K.** (2004). "Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating." *Biophysical journal* **86**(6): 3496-3509.
- Gur, M., Cheng, M. H., Zomot, E. ve Bahar, I.** (2017). "Effect of dimerization on the dynamics of neurotransmitter: sodium symporters." *The Journal of Physical Chemistry B* **121**(15): 3657-3666.
- Gur, M., Zomot, E., Cheng, M. H. ve Bahar, I.** (2015). "Energy landscape of LeuT from molecular simulations." *The Journal of chemical physics* **143**(24): 12B611_611.
- Humphrey, W., Dalke, A. ve Schulten, K.** (1996). "VMD: visual molecular dynamics." *Journal of molecular graphics* **14**(1): 33-38.
- Isralewitz, B., Gao, M. ve Schulten, K.** (2001). "Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins." *Current Opinion in Structural Biology* **11**(2): 224-230.
- Iversen, L. ve Kelly, J.** (1975). "Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurones and glial cells." *Biochemical pharmacology* **24**(9): 933-938.
- Jarzynski, C.** (1997a). "Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach." *Physical Review E* **56**(5): 5018.
- Jarzynski, C.** (1997b). "Nonequilibrium equality for free energy differences." *Physical Review Letters* **78**(14): 2690.
- Jessell, T. ve Kandel, E. R.** (1993). "Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication." *Cell* **72**: 1-30.
- Kon, T., Imamula, K., Roberts, A. J., Ohkura, R., Knight, P. J., Gibbons, I., Burgess, S. A. ve Sutoh, K.** (2009). "Helix sliding in the stalk coiled coil of dynein couples ATPase and microtubule binding." *Nature structural & molecular biology* **16**(3): 325.
- Kon, T., Mogami, T., Ohkura, R., Nishiura, M. ve Sutoh, K.** (2005). "ATP hydrolysis cycle-dependent tail motions in cytoplasmic dynein." *Nature structural & molecular biology* **12**(6): 513.
- Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y. ve Sutoh, K.** (2004). "Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein." *Biochemistry* **43**(35): 11266-11274.
- Kon, T., Oyama, T., Shimo-Kon, R., Imamula, K., Shima, T., Sutoh, K. ve Kurisu, G.** (2012). "The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain." *Nature* **484**(7394): 345.
- Kon, T., Sutoh, K. ve Kurisu, G.** (2011). "X-ray structure of a functional full-length dynein motor domain." *Nature structural & molecular biology* **18**(6): 638.

- Krishnamurthy, H. ve Gouaux, E.** (2012). "X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states." *Nature* **481**(7382): 469.
- Kristensen, A. S., Andersen, J., Jørgensen, T. N., Sørensen, L., Eriksen, J., Loland, C. J., Strømgaard, K. ve Gether, U.** (2011). "SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation." *Pharmacological reviews* **63**(3): 585-640.
- Lacey, S. E., He, S., Scheres, S. H. ve Carter, A. P.** (2019). "Cryo-EM of dynein microtubule-binding domains shows how an axonemal dynein distorts the microtubule." *bioRxiv*: 590786.
- Lindahl, E. ve Edholm, O.** (2000). "Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations." *Biophysical journal* **79**(1): 426-433.
- Malinauskaite, L., Said, S., Sahin, C., Grouleff, J., Shahsavar, A., Bjerregaard, H., Noer, P., Severinsen, K., Boesen, T. ve Schiøtt, B.** (2016). "A conserved leucine occupies the empty substrate site of LeuT in the Na⁺-free return state." *Nature communications* **7**: 11673.
- Mocz, G. ve Gibbons, I.** (2001). "Model for the motor component of dynein heavy chain based on homology to the AAA family of oligomeric ATPases." *Structure* **9**(2): 93-103.
- Park, S., Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E. ve Schulten, K.** (2003). "Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality." *The Journal of chemical physics* **119**(6): 3559-3566.
- Park, S. ve Schulten, K.** (2004). "Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations." *The Journal of chemical physics* **120**(13): 5946-5961.
- Perrone, C. A., Tritschler, D., Taulman, P., Bower, R., Yoder, B. K. ve Porter, M. E.** (2003). "A novel dynein light intermediate chain colocalizes with the retrograde motor for intraflagellar transport at sites of axoneme assembly in *Chlamydomonas* and mammalian cells." *Molecular biology of the cell* **14**(5): 2041-2056.
- Phillips, J., Isgro, T., Sotomayor, M. ve Villa, E.** (2003). "NAMD TUTORIAL."
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L. ve Schulten, K.** (2005). "Scalable molecular dynamics with NAMD." *Journal of computational chemistry* **26**(16): 1781-1802.
- Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D. ve Carter, A. P.** (2018). "The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**(6): 382.
- Redwine, W. B., Hernández-López, R., Zou, S., Huang, J., Reck-Peterson, S. L. ve Leschziner, A. E.** (2012). "Structural basis for microtubule binding and release by dynein." *Science* **337**(6101): 1532-1536.

- Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K. ve Burgess, S. A.** (2013). "Functions and mechanics of dynein motor proteins." *Nature reviews Molecular cell biology* **14**(11): 713.
- Roberts, A. J., Numata, N., Walker, M. L., Kato, Y. S., Malkova, B., Kon, T., Ohkura, R., Arisaka, F., Knight, P. J. ve Sutoh, K.** (2009). "AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor." *Cell* **136**(3): 485-495.
- Rudnick, G.** (1998). [16] Ion-coupled neurotransmitter transport: Thermodynamic vs. kinetic determinations of stoichiometry. *Methods in enzymology*, Elsevier. **296**: 233-247.
- Schmidt, H. ve Carter, A. P.** (2016). "Structure and mechanism of the dynein motor ATPase." *Biopolymers* **105**(8): 557-567.
- Schmidt, H., Gleave, E. S. ve Carter, A. P.** (2012). "Insights into dynein motor domain function from a 3.3-Å crystal structure." *Nature structural & molecular biology* **19**(5): 492.
- Schmidt, H., Zalyte, R., Urnavicius, L. ve Carter, A. P.** (2015). "Structure of human cytoplasmic dynein-2 primed for its power stroke." *Nature* **518**(7539): 435.
- Torres, G. E., Carneiro, A., Seamans, K., Fiorentini, C., Sweeney, A., Yao, W.-D. ve Caron, M. G.** (2003). "Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter." *Journal of biological chemistry* **278**(4): 2731-2739.
- Vale, R. D.** (2003). "The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport." *Cell* **112**(4): 467-480.
- Vallee, R. B., Williams, J. C., Varma, D. ve Barnhart, L. E.** (2004). "Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport." *Journal of neurobiology* **58**(2): 189-200.
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y. ve Gouaux, E.** (2005). "Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters." *Nature* **437**(7056): 215-223.

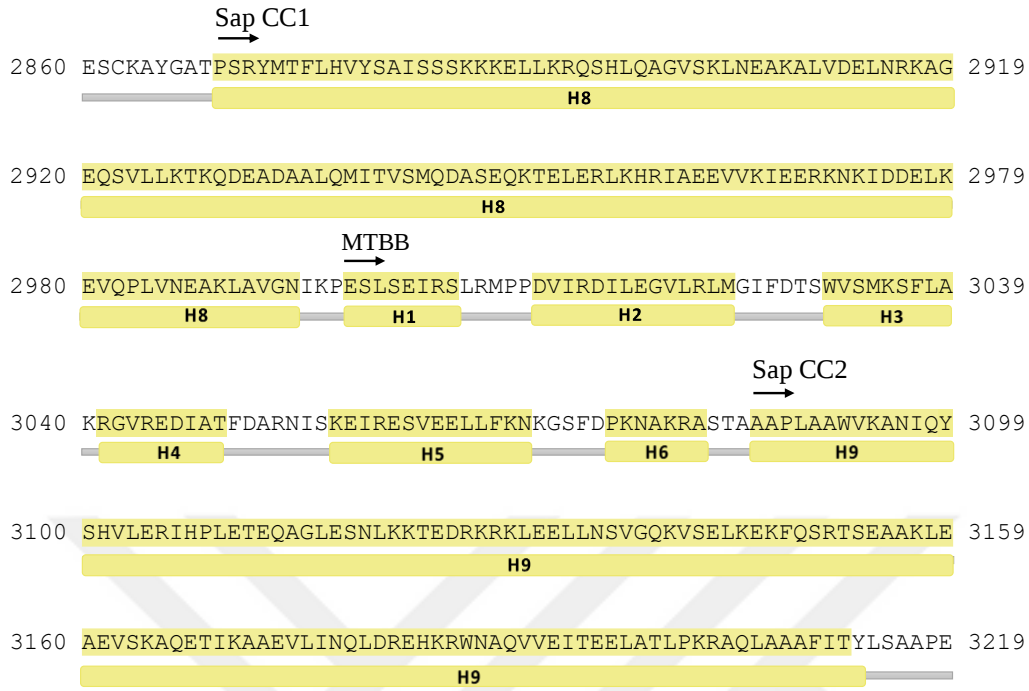
EKLER

EK A: İnsan dinein-2 ve *M. musculus* dinein-1 yapılarının MTBB-sap kısımlarının sekansları.

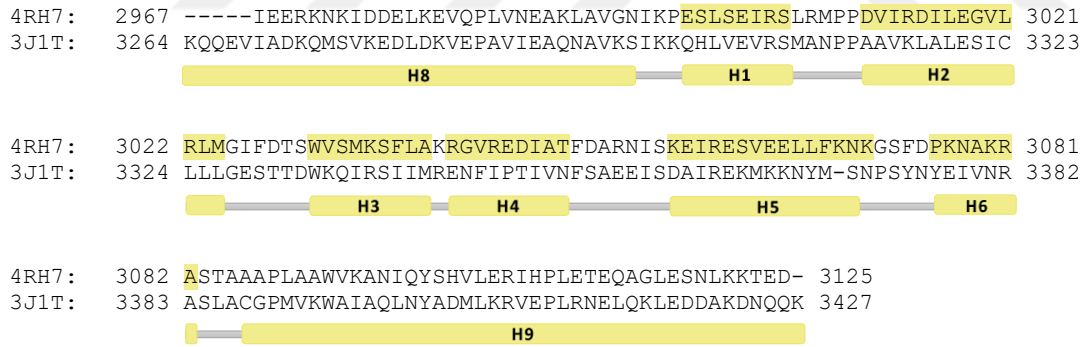
EKB: MTBB'nin MT'ye bağlanmasını sağlayan 200 ns'lik MD simülasyonunun 10. ns'si için MTBB-MT etkileşimleri.



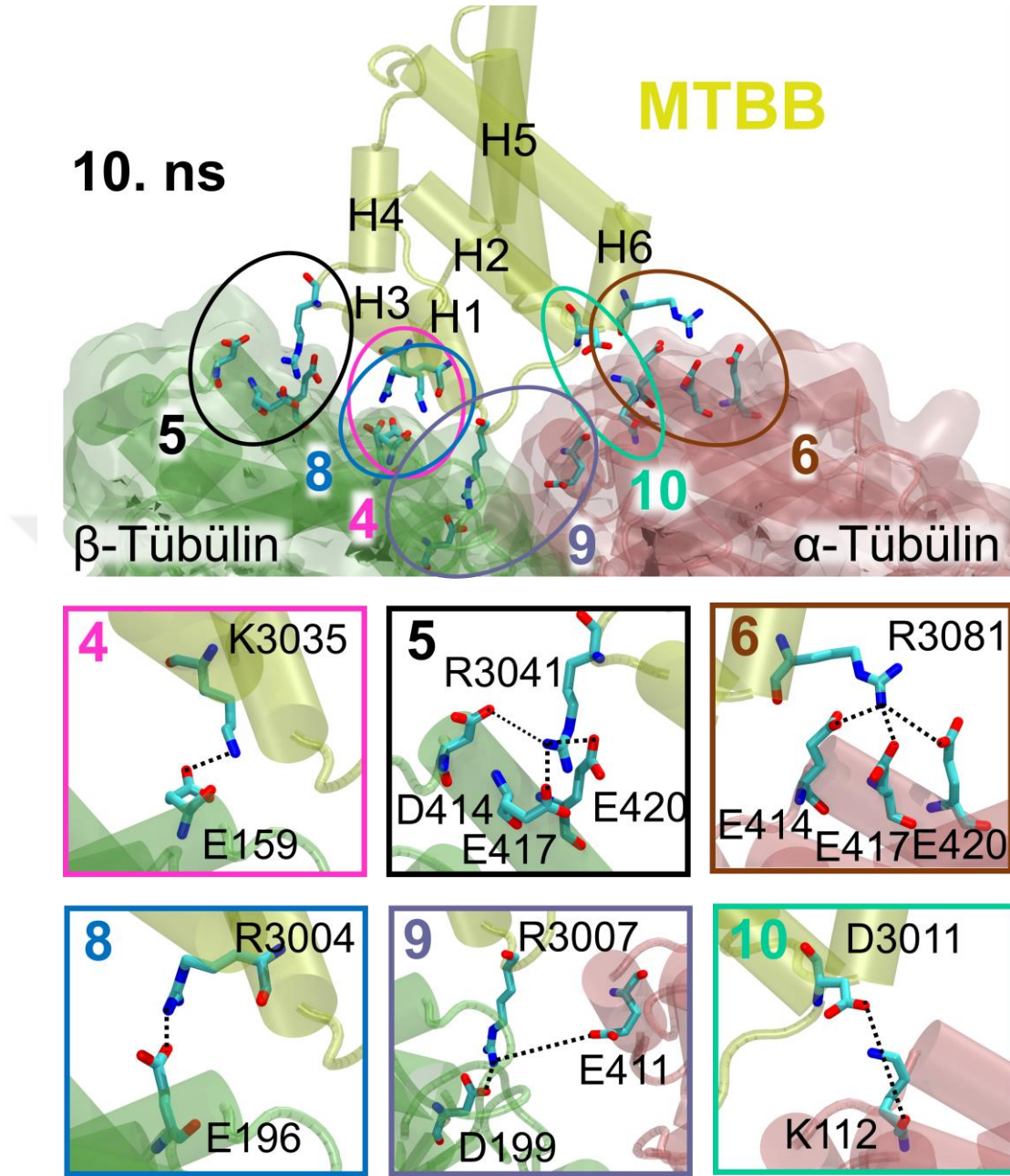
EK A



Şekil A.1 : İnsana ait dinein-2 yapısının (PDB kodu:4RH7) sap ve MTBB kısımlarının sekansı ve sekans üzerinde alfa sarmalların gösterimi.



Şekil A.2 : İnsana ait dinein-2 yapısı (PDB kodu:4RH7) ile *M. Musculus* dinein-1 yapısının (PDB kodu:3J1T) MTBB-sap kısımlarının sekans hizalaması. Sekans hizalaması yapılırken, yapıların PDB veri tabanından (www.rcsb.org) (Berman ve diğ, 2003) elde edilen FASTA sekanslarından MTBB'leri alınarak, UniProt veri tabanındaki (Consortium, 2018) hizalama aracı kullanılmıştır.



Şekil B.1 MTBB'nin MT'ye bağlanmasını sağlayan 200 ns'lik MD simülasyonunun 10. ns'si için MTBB-MT etkileşimleri



ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Sema Zeynep Yılmaz
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.09.1994 – Yeşilyurt
E-posta : yilmaz.gurlab@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Yüksek Lisans** : Devam ediyor, İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Programı

YAYINLAR:

- **Gur, M., Golcuk, M., Yılmaz, S. Z., Taka, E.** 2019. Thermodynamic first law efficiency of membrane proteins, *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 1-11.

BİLDİRİLER:

- **Gur, M., Golcuk, M., Yılmaz, S. Z., Taka, E.** 2018. Thermodynamic First Law Analysis of Proteins. *6th International BAU Drug Design Congress*, December 13-15, 2018 Istanbul, Turkey. (Poster Sunumu)

PROJELER:

- Bursiyer 2015-2019. Sitoplazmik dinein motor proteininin mekanokimyasal döngüsünün mekanik ve enerjetik açıdan modellenmesi, TÜBİTAK Projesi, Yürütücü: Mert Gür