

## Alpha-synuclein' in PreNAC(46-56) Fibril Bölütünün Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemi ile Konformasyonel Değerlendirmesi

Hakan ALICI

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, 67100 Merkez-Zonguldak

<https://orcid.org/0000-0001-5105-8331>

✉: [hakanalici@beun.edu.tr](mailto:hakanalici@beun.edu.tr)

### ÖZET

Bu çalışmada, Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilen apha-synuclein (AS)' in PreNAC(46-56) fibril bölütü Moleküler Dinamik Simülasyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmadaki, ilk amaç PreNAC üzerine gelecekte yapılması muhtemel çalışmalar için en uygun kuvvet alanının belirlenmesidir. Literatürde biyomoleküllerin simülasyonlarında sıklıkla kullanılan yedi kuvvet alanı üzerinden yapılan değerlendirmede, başta CHARMM27 ve GROMOS53A6 olmak üzere AMBER99SB ve AMBER99SB-ILDN kuvvet alanlarının ileriki çalışmalarda ele alınmasının uygun olacağı tespit edilmiştir. Çalışmanın diğer amacı ise PreNAC arayüz için konformasyonel özelliklerin moleküler seviyede aydınlatılmasıdır. Bu kapsamda gözlemlenen önemli bulgulardan biri His50 amino asidinin en fazla konformasyonel değişim gösteren amino asit olmasıdır. Ayrıca literatürde birden fazla ailesel mutasyon içerdiği tespit edilen 53. konumdaki Thr amino asidinin yüksek konformasyonel kararlılığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunlara ilaveten, ele alınan PreNAC arayüz için tabakalar arası elektrostatik etkileşimlerin ara yüzün kararlılığı için başlıca etkileşim tipleri olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, elde edilen bulguların AS' nin PreNAC ve benzeri fibril bölütlerinin gelecek çalışmalarına ışık tutması beklenilmektedir.

### Araştırma Makalesi

### Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 14.05.2020

Kabul Tarihi : 03.07.2020

### Anahtar Kelimeler

Kuvvet alanı  
Moleküler dinamik  
Parkinson  
PreNAC  
Simülasyon

## A Conformational Evaluation for PreNAC(46-56) Fibril Segment of Alpha-synuclein using Molecular Dynamic Simulation Method

### ABSTRACT

In this study, the PreNAC (46-56) fibril segment of Alpha-Synuclein (AS) associated with Parkinson's disease was examined using the molecular dynamic simulation method. The first goal of the study was to determine the most suitable force field for future studies on PreNAC. In this regard, we covered seven force fields that were widely used in biomolecule simulations, and it was determined that it is appropriate to treat the AMBER99SB and AMBER99SB-ILDN force fields, mainly CHARMM27 and GROMOS53A6, for future studies. Another goal of the study was to illuminate the conformational properties of the PreNAC interface at the molecular level. One of the most important discoveries observed in this context was that His50 was the most unstable amino acid. In addition, it was observed that amino acid 53, which is known to contain more than one family mutation, sustained high conformational stability. In addition, inter-sheet electrostatic interactions were the dominant interaction type for the stability of PreNAC interface. As a result, the findings in this study are expected to shed light on future studies of PreNAC of AS and its similar fibril segments.

### Research Article

### Article History

Received : 14.05.2020

Accepted : 03.07.2020

### Keywords

Force field  
Molecular dynamic  
Parkinson's disease  
PreNAC  
Simulation

**Atıf İçin:** Alıcı H 2021. Alpha-synuclein' in PreNAC(46-56) Fibril Bölütünün Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemi ile Konformasyonel Değerlendirmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (1): 11-21. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.737200>.

**To Cite** Alıcı H 2021. A Conformational Evaluation for PreNAC(46-56) Fibril Segment of Alpha-synuclein using Molecular Dynamic Simulation Method. KSU J. Agric Nat 24 (1): 11-21. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.737200>.

## GİRİŞ

Amiloid fibril agregalarının hücre içi ve hücre dışındaki varlığı birçok dejeneratif hastalık ile ilişkilendirilmektedir (Glennner ve ark., 1984; Lang ve Lozano, 1998). Alzheimer hastalığından (AD) sonra en sık rastlanılan dejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığının (PD) gelişim aşamasında, insan beyninde anormal şekilde biriken alpha-synuclein (AS) agregaları çok önemli rol oynamaktadır (Çınar ve ark., 2019; De Lau ve Breteler, 2006). Bu bağlamda AS fibril agregaları, PD hastalığının teşhisindeki başlıca patolojik işaretlerden biri olarak kabul edilirler (Goedert ve ark., 2013; Spillantini ve ark., 1997).

AS proteinin tek bir amino asit zinciri 140 amino asit içermektedir (Ulmer ve ark., 2005) ve çok sayıda AS proteinin düzenli bir şekilde istiflenerek oluşturdukları AS fibril agregalarını düşündüğümüzde ise fibril yapının sahip olduğu amino asit sayısının on binlere hatta yüz binlere ulaşabileceği hayal edilmesi zor bir durum değildir. AS fibrillerinin sahip olduğu bu yüksek moleküler ağırlıkları, onların tam bir üç boyutlu (3-B) konformasyonel yapısının deneysel olarak ortaya konulmasını zorlaştıran başlıca faktörlerden biridir. Bundan dolayı literatürdeki AS konformasyonun tespiti için mevcut deneysel çalışmalarda, AS'nin tam amino asit zinciri yerine çoğunlukla küçük AS fibril bölütlerini tespit etmeye odaklanılmıştır. Ayrıca bu küçük amiloid fibril agregalar en muhtemel sitotoksik biyolojik yapılar olarak kabul edilmektedir (Berhanu ve Hansmann, 2012). Son zamanlarda Rodriguez ve arkadaşları tarafından AS'nin PreNAC(47-56) olarak adlandırılan küçük bir fibril bölütünün 3-B kristal yapısı rapor edilmiştir (Rodriguez ve ark., 2015). PreNAC(47-56) toplam on adet amino asitten oluşmaktadır ve üç harfli kodlamayla amino asit dizilimi Gly47-Val48-Val49-His50-Gly51-Val52-Thr53-Thr54-Val55-Ala56 şeklindedir. Ayrıca, PreNAC bölütünün kapsadığı bu amino asit bölgesi, PD hastalığının şu ana kadar bilinen yedi ailesel mutasyondan beşinin (H50Q (Appel-Cresswell ve ark., 2013), G51D (Lesage ve ark., 2013), A53T (Polymeropoulos ve ark., 1997), A53E (Pasanen ve ark., 2014) and A53V (Yoshino ve ark., 2017)) amino asit konumlarını üzerinde barındırmaktadır. Hatta bu bölüt doğrudan A53T mutasyonu için tespit edilmiştir. Sahip olduğu bu kritik özellikler bu bölütün önemini daha da artırmaktadır.

Diğer taraftan, yapılan birçok çalışmaya rağmen karşılaşılan deneysel zorluklar AS fibril agregasyon sürecinin ve AS fibril agregaları arası etkileşme mekanizmasının yeterince anlaşılmasına neden olmuştur. Bu yüzden, PD için geliştirilmiş tam anlamıyla engelleyici ya da tedavi edici bir terapötik uygulama yoktur. Bu noktada, AS fibril agregalarının konformasyonel dinamiklerinin özellikle teorik

yöntemlerle moleküler düzeyde incelenmesi büyük önem arz etmektedir. Ayrıca iyi bilindiği üzere, MD simülasyon (MD) yönteminin proteinlerin termodinamik ve katlanma özelliklerini incelemek için kullanılan başlıca teorik araçlardan biridir.

Bu çalışmada PreNAC fibril arayüz yapısı (iki protofibril arası karşılıklı etkileşim içeren fibril yapısı) ele alınmış ve farklı kuvvet alanları (force field; enerji fonksiyonları) için karşılaştırmalı MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Sunulan çalışmanın başlıca amaçlarından biri, gelecekte yapılması muhtemel ilaç ve fibril bölütünden (ilgilenilen PreNAC ve ya benzeri AS fibril bölütleri olabilir) oluşan protein kompleks sistemleri ile ilgili MD simülasyon çalışmaları için en uygun kuvvet alanlarının belirlenmesidir. Böylece PD ve ailesel mutasyonları üzerine yeni ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir araştırma ilerlemesi sağlanabilir. Ayrıca diğer temel amaçlarından birisi de ilgilenilen PreNAC ara yüz yapısının konformasyonel özellikleri ve arayüz etkileşmelerini araştırarak, PD ve diğer dejeneratif hastalıkların fibril etkileşme mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olmaktır. Sonuç olarak, çalışmada elde edilen önemli bulguların, PD hastalığının tedavisinde kullanılması muhtemel rasyonel terapötik uygulamalar için yeni fırsatlar sağlaması umut edilmektedir.

## MATERYAL ve METOD

### Simülasyon Detayları

Ele alınan AS' nin PreNAC(47-56) fibril ara yüzü için, Rodriguez ve arkadaşları tarafından belirlenip Protein Data Bank (PDB)' a 4ZNN kodu ile depo edilen fibril bölütünün kristal yapısı kullanıldı (Rodriguez vd. 2015). Daha sonra PyMOL programı (DeLano 2002) ile birbirine anti paralel olarak oluşturulan bu ara yüzün üç boyutlu (3-D) yapısı şekil 1 de sergilendi. İlgilendiğimiz bu ara yüz şekilden de görüleceği üzere çift yapraklı (sheet) bir formda olup, her bir yaprak başına beş iplik (strand) olmak üzere toplamda on tane (10-mer) birbirinin aynısı olan iplikten oluşan yapısal bir motife sahiptir.

Bu çalışmada, PreNAC fibril arayüz yapısı üzerine gelecekte yapılması muhtemel simülasyon çalışmaları için uygunluğunu test etmek üzere MD simülasyonlarında sıklıkla tercih edilen yedi popüler kuvvet alanı ele alındı. Seçilen kuvvet alanları ve onlar için önerilen su modeli kombinasyonları; AMBER03 (Duan ve ark., 2003)/TIP3P, AMBER99SB (Hornak ve ark., 2006)/TIP3P, AMBER99SB-ILDN (Lindorff-Larsen ve ark., 2010)/TIP3P, CHARMM27 (Best ve ark., 2012; MacKerell Jr ve ark., 1998)/TIP3P, GROMOS53A6 (Oostenbrink ve ark., 2004)/SPC, GROMOS54A7 (Schmid ve ark., 2011)/SPC (Berendsen ve ark., 1981) ve OPLS-AAL(Kaminski ve ark., 2001)/TIP3P (Jorgensen ve ark., 1983)' dir. Ayrıca, sunulan çalışmadaki MD simülasyonların





3x100 ns lik simülasyonlar yapıldı. Böylece her bir sistemin analizi için birbirinden bağımsız üç adet yörünge dosyası elde edildi.

Bunlara ilaveten, dengeleme ve ürün simülasyon aşamalarında uzun erimli (long-range ) etkileşimleri betimlemek için Particle Mesh Ewald (PME) (Darden ve ark., 1993) metodu kullanıldı ve kesim mesafeleri (cut-off), coulomb etkileşmelerinde 0.9 nm ve van der Walls etkileşmelerinde ise 1.0 nm olarak seçildi. Ayrıca, sistemlerdeki hidrojenler P-LINCS (Hess ve ark., 1997) algoritması ile su molekülleri SETTLE (Miyamoto ve Kollman 1992) algoritması kullanılarak sınırlandırıldı. Simülasyonlardaki MD yörüngeleri, daha detaylı analizler yapabilmek için 4 ps aralıklarla kaydedildi.

### Veri Analizleri

Kaydedilen veriler GROMACS program paketi içeriğindeki analiz araçları kullanılarak analiz edildi. Yapılan analizlerden simülasyon zamanına bağlı olarak kare ortalama karekök yer değiştirme (RMSD, root mean square deviation) hesabı Eşitlik 1. kullanılarak yapılır.

$$RMSD(t) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |r_i(t) - r_i^{ref}|^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

Burada  $r_i(t)$  i. atomun ilgili simülasyon zamanındaki,  $r_i^{ref}$  ise i. atomun referans yapısındaki konumunu gösterir. Ayrıca  $M$  yapının toplam kütlelerini,  $m_i$  i. atomun kütleleridir. Tüm analizler için referans yapısı olarak enerjisi minimize olmuş yapı kullanıldı. Diğer bir analiz kare ortalama karekök dalgalanma (RMSF, root mean square fluctuations) hesaplamaları ise Eşitlik 2. kullanılarak hesaplanır.

$$RMSF_i = \left[ \frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

Burada  $T$  toplam simülasyon süresi,  $r_i(t_j)$  i. atomun j. simülasyon zamanındaki konumu ve  $r_i^{ref}$  i. atomun referans yapısındaki konumudur. Yapılan analizlerden bir diğeri ise sistemlerin jirasyon yarıçap (Rg, Radius of gyration) değerleridir. Bu değerler aşağıda verilen Eşitlik 3. ile elde edilir ve eşitlikteki  $m_i$  i. atomun kütlelerine ve  $r_i$  i. atomun konumuna karşılık gelir.

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i}} \quad (3)$$

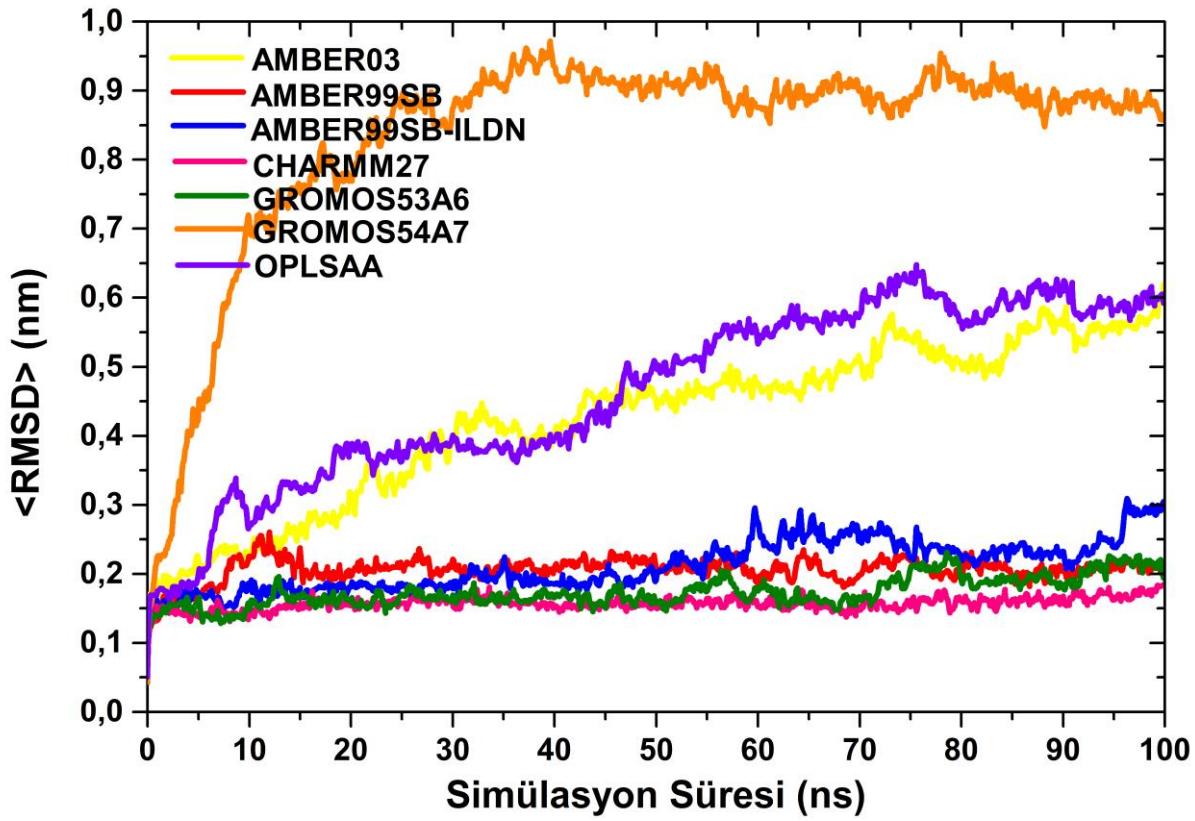
Ayrıca her bir residünün çözeltiliye maruz kalan yüzey alanı (SASA, solvent accessible surface area) hesabı Gromacs programının  $g\_sas$  modülü kullanılarak yapıldı. Bunlara ilaveten, PreNAC' ın fibril tabakaları arasındaki bağlanma serbest enerjisi, Rashmi Kumari ve arkadaşları (Kumari ve ark., 2014) tarafından geliştirilen MM-PBSA (Molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area) yaklaşım yöntemi kullanılarak hesaplandı.

Grafiklerde sergilenen metrik analizlerin sonuçları,

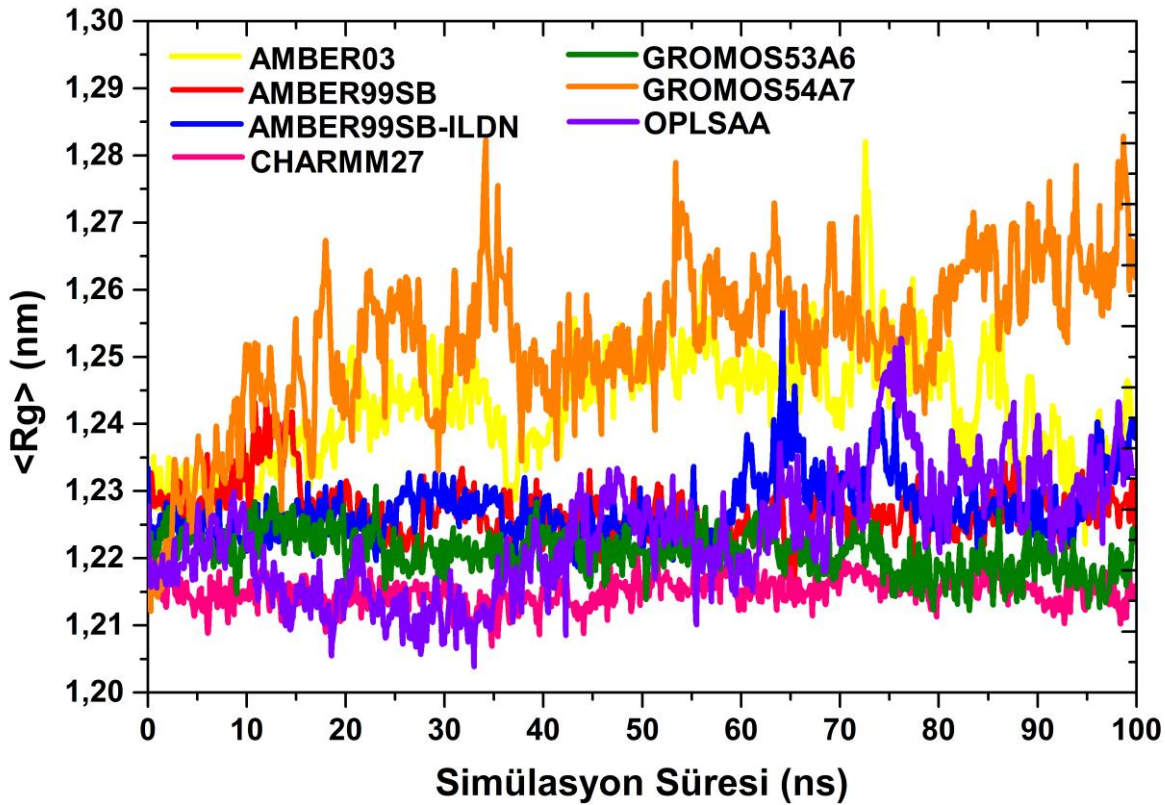
her bir kuvvet alanı sistemi için üretilen üç farklı yörünge ortalaması alınarak sunuldu. Ayrıca, üç boyutlu (3B) yapıların görüntüleme ve görselleştirilmesi PyMOL programı yardımı ile yapıldı (DeLano 2002).

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, hem ilgilenilen popüler kuvvet alanlarının ele alınan PreNAC arayüz yapısının kararlılığı üzerine etkisini incelemek hem de bu arayüzün konformasyonel özellikleri hakkında bilgi sahibi olabilmek için ilk olarak RMSD analizi yapılmış ve sonuçlar Şekil 2' de sergilenmiştir. Protein atomlarının simülasyon boyunca doğal konformasyonel yapılarındaki konumlarından ne kadar uzaklaştığı hakkında bilgi veren RMSD sonuçları, biyolojik yapıların konformasyonel kararlılık çalışmaları için kullanılan başlıca analiz araçlarından biridir (Berhanu ve Hansmann, 2012; Xi ve ark., 2018). Şekil incelendiğinde, simülasyon boyunca en istikrarlı (en az dalgalanan) ve en düşük ortalama RMSD değerleri CHARMM27 kuvvet alanı için elde edilirken, bu kuvvet alanına en yakın sonuçlar sırasıyla GROMOS53A6, AMBER99SB ve AMBER99SB-ILDN için elde edilmiştir. Diğer taraftan, bu kuvvet alanlarından yaklaşık 6 kat ile en yüksek ortalama RMSD değerleri GROMOS54A7 kuvvet alanı için elde edilirken, GROMOS54A7 den sonra en yüksek değerler sırası ile AMBER03 ve OPLSAA kuvvet alanı için elde edilmiştir. Bu haliyle RMSD sonuçları başta GROMOS54A7 olmak üzere AMBER03 ve OPLSAA kuvvet alanlarının ilgilenilen fibril arayüz yapısı için kararlı konformasyonel özelliklere sahip sistemler üretmediğini gösterirken, kararlı sistemler ürettiğini varsayabileceğimiz diğer kuvvet alanlarından CHARMM27' nin bir miktar daha öne çıktığı söylenebilir. Literatürdeki AS' nin (68-78) ve (69-77) fibril bölütü bölgeleri için gerçekleştirilen bir çalışmada, bizim çalışmamızdakine benzer şekilde en düşük ortalama RMSD değeri CHARMM27 için elde edilmiştir. Ek olarak, bizim çalışmamızda en yüksek RMSD değerlerine sahip olduğunu tespit edilen GROMOS54A7 kuvvet alanının bahsi geçen çalışmada en yüksek değere sahip iki kuvvet alanından bir tanesi olması da dikkat çekicidir (Alıcı 2020). Ayrıca, Alzheimer ile ilişkilendirilen Amiloid-Beta (AB) 16-22 fibril bölütü için yapılan diğer bir çalışmada ise iki yapraklı arayüzler için en düşük değerler genellikle AMBER kuvvet alanları için elde edilirken, CHARMM27' nin ise GROMOS ve OPLSAA kuvvet alanlarına kıyasla daha makul değerler sağladığı rapor edilmiştir (Berhanu ve Hansmann, 2012). Özetle, dejeneratif hastalıkların fibril bölütleri için ortalama RMSD değerleri üzerinden yapılan tüm bu çıkarımlar dikkate alındığında, yapılarının konformasyonel kararlılığı bakımından CHARMM27' nin genel anlamda ön plana çıktığı gözlemlenmiştir.



Şekil 2. PreNAC arayüz için ortalama RMSD değerlerinin simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi  
Figure 2. Time evolution of the average RMSD for PreNAC interface



Şekil 3. PreNAC arayüz için ortalama Rg değerlerinin simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi.  
Figure 3. Time evolution of the average Rg for PreNAC interface

Tüm bunlara ilaveten AB' nin katlanma özelliklerinden yola çıkılarak yapılan bir diğer çalışmada ise, CHARMM27 (CHARMM22\*)' nin deneysel NMR parametrelerini üretme konusunda diğer kuvvet alanlarına göre daha başarılı olduğu rapor edilmiştir (Carballo-Pacheco ve Strodel, 2017).

Sunulan çalışmada daha sonra ise ilgilenilen fibril yapısının kompaklığının simülasyon boyunca değişiminin bir ölçüsü olarak sistemlerin Rg değerleri incelenmiştir. Jirasyon yarıçapı değerleri protein sistemindeki her bir atomun, protein sistemin geometrik merkezine olan uzaklıklarının kare ortalama karekök değerlerini veren ve böylelikle protein konformasyonunun boyutları hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayan bir analiz yöntemidir (Lobanov ve ark., 2008). Ele alınan fibril ara yüzünün doğal Rg değeri 1.22 nm dir. Buna göre doğal değerle kıyaslandığında, sistemlerdeki Rg değerlerindeki artış, ya 10 iplikli yapıdaki ipliklerin bir veya daha fazlasının sistemin kütle merkezinden uzaklaşarak 10-mer yapının dağılmasına ya da her bir ipliğin düzenli istif dizilimlerindeki sıralanışlarının bozulduğu ve yapıdaki ipliklerin iç içe girerek düzenli istif yapının yok olmasına atfedilebilir. Kısacası, her iki durumda da yapının düzenli istiflenmiş 10-mer bütünlüğünün bozulması söz konusu olmalıdır. Çünkü AS' nin farklı fibril bölütleri için rapor edilen çalışmada, AMBER99SB-ILDN kuvvet alanının diğer kuvvet alanlarına göre önemli ölçüde yüksek değerlere sahip olduğu ve bu duruma konformasyonel bütünlüğün bozulmasının eşlik ettiği gözlemlenmiştir (Alıcı 2020). Şekil incelendiğinde, özellikle CHARMM27 ve GROMOS53A6 doğal değere en yakın sonuçlar üreten ve simülasyonlar boyunca en az dalgalanan yani PreNAC arayüz için en kararlı konformasyonel davranışlar üreten kuvvet alanlarıdır. Burada GROMOS54A7 ve AMBER03 için, doğal değere kıyasla yüksek ve oldukça fazla dalgalanan değerler, ele alınan fibril ara yüzünün 10-mer bütünlüğünün bu kuvvet alanları için bozulduğunun açık göstergesidir. Hem bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi hem de PreNAC ara yüzün 10-mer yapısının bütünlüğü hakkında daha detaylı bilgi görsel izlenim edinebilmek için her bir kuvvet alanı sistemi için yapılan üçer adet simülasyon setine ait PreNAC arayüz için simülasyon sonundaki anlık görüntüler (snapshots) Şekil 4 de sergilenmiştir. Bu anlık görüntüler incelendiğinde, PreNAC' ın düzenli istiflenmiş 10-mer konformasyonun GROMOS54A7, AMBER03 ve OPLSAA kuvvet alanlarının her bir simülasyonunda önemli derecede bozulduğu gözlemlenmektedir. Bundan dolayı bu kuvvet alanlarının muhtemel ilaç-arayüz simülasyonların da, ilaç hedef bölgeleri üzerinde ele alınan ilaç moleküllerinden kaynaklanmayan olumsuz konformasyonel etkilere sebebiyet verebilme

ihtimalinden dolayı gelecekteki yapılması düşünülebilecek simülasyon çalışmaları için uygun olmayabilecekleri düşünülebilir. Diğer taraftan, CHARMM27 simülasyonlar sonunda en kararlı konformasyonlara sahip olsa da, tıpkı RMSD bulgularında olduğu gibi GROMOS53A6, AMBER99SB ve AMBER99SB-ILDN kuvvet alanlarının da makul kararlı konformasyonel sonuçlar ürettiği gözlemlenmektedir.

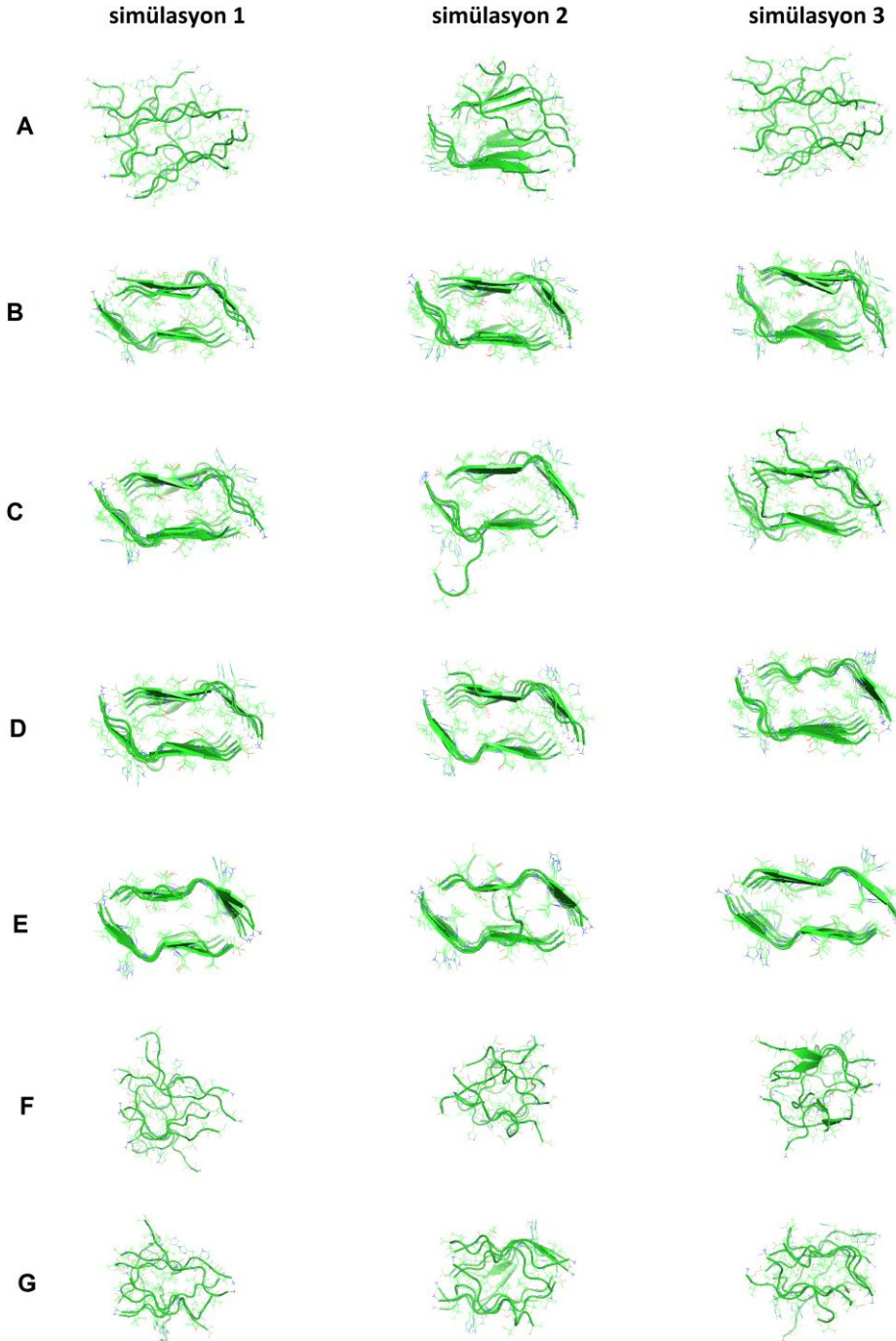
Araştırma üzerine daha da detaylı ve derinlemesine bilgiler edinebilmek için RMSF analizi yapılmış ve Şekil 5' de sergilenmiştir. Bu analiz simülasyonlar boyunca protein yapılarının her bir amino asidinin ayrı ayrı doğal konformasyona göre konumlarındaki değişimlerinin bir ölçüsüdür, başka bir deyişle bu analizle proteinlerin amino asit zincirlerindeki konformasyonel değişimleri bölgesel olarak değerlendirilebilmek mümkündür (Yu ve ark., 2017; Demir ve ark., 2018). Şekil incelendiğinde GROMOS54A7, AMBER03 ve OPLSAA kuvvet alanları için diğer kuvvet alanlarına göre elde edilen yüksek değerler önceki analizlerde olduğu gibi bu kuvvet alanlarının ele alınan PreNAC ara yüz yapısının konformasyonlarını istikrarsızlaştırdığını göstermektedir. Öte yandan diğer kuvvet alanları için PreNAC ara yüzün her bir amino asidi için elde edilen değerler benzerlik göstermektedir. Ayrıca, bu türden fibril yapıları için uç bölgelerdeki amino asitlerin merkezi bölgelerdeki amino asitlere göre daha yüksek değerlere sahip olması beklenen bir durum olup, bu davranış genellikle uç bölgelerdeki amino asitlerin merkezi bölgelerdeki amino asitlere kıyasla daha fazla çözeltiye maruz kalmasına atfedilmektedir (Zheng ve ark., 2006). Burada, simülasyonlarda kullanılan tüm kuvvet alanları için ele alınan PreNAC ara yüzünün uç bölgelerinde konumlanan Gly47, Val48, Val55 ve Ala56 amino asitleri için elde edilen değerler bu genel davranış eğilimini destekleyen tutum sergilemektedir. Bu analizde dikkat çeken diğer bir nokta ise His50' nin tüm kuvvet alanları için, merkezi amino asit bölgesindeki en yüksek değerlere sahip amino asit olmasıdır. Bu uzun radikal gruba sahip ve hidrofilik amino asitin ele alınan PreNAC fibril ara yüz üzerinde su molekülleriyle kolay etkileşebilecek bir konumda bulunması gerçeği, ki bu durum Şekil 1' den de açıkça görülmektedir, bu amino asitin hidrofobik etkileşim kaynaklı konformasyonel değişime uğradığının bir işareti olabilir. Ayrıca His50 için elde edilen bu bulgu, ele alınan PreNAC fibril ara yüzünün omurga yapısı üzerindeki ilk bölgesel bozulmaların bu amino asit kaynaklı olabileceğinin bir göstergesi olabilir.

Ayrıca yukarıda bahsedilen çözeltiye maruz kalınmasından kaynaklı konformasyonel değişimlere açıklık getirebilmek için çözeltiye maruz kalan yüzey alanı (SASA, solvent accessible surface area) analizi gerçekleştirilmiş ve Şekil 6 da sergilenmiştir. Şekil



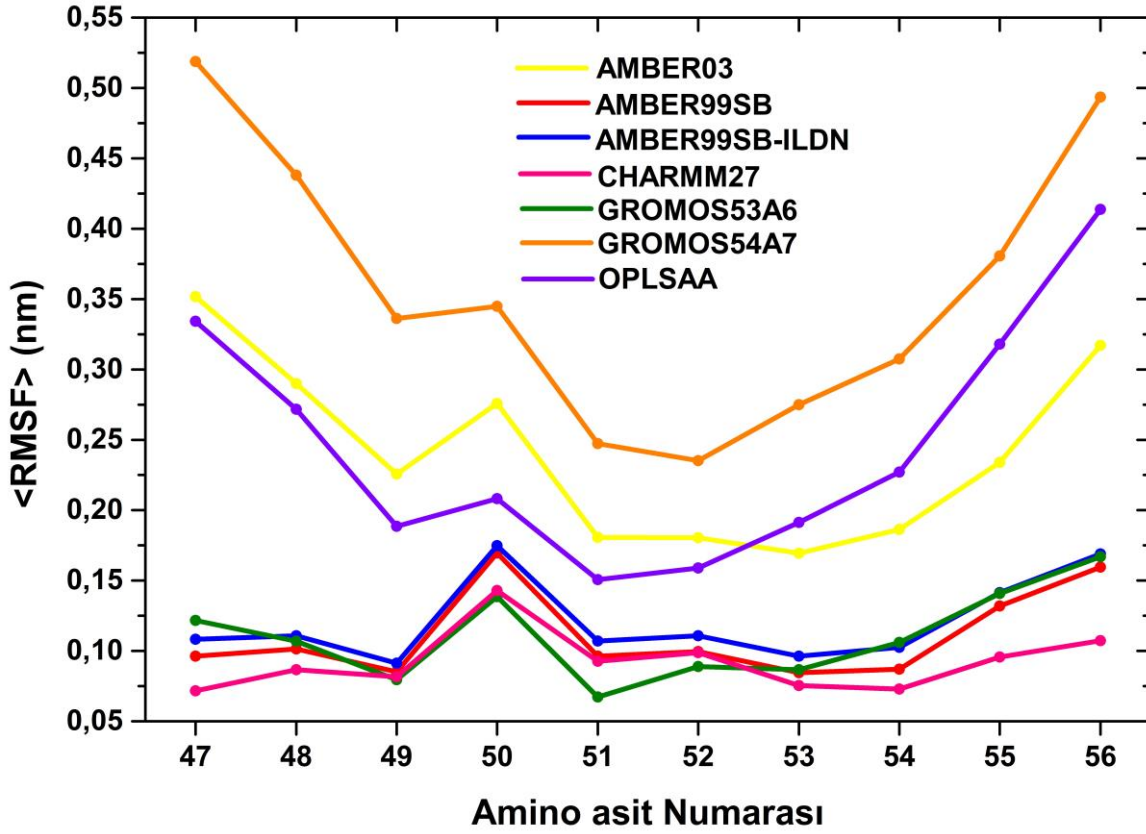
incelendiğinde, yukarıda bahsedilen uç bölge amino asitlerinin yüksek SASA değerlerine sahip olması hemen göze çarpmaktadır. Ayrıca His50 amino asidi tüm kuvvet alanları için PreNAC' ın en yüksek SASA değerine sahip amino asidi olup, buradaki sonuçlar bir önceki RMSF analizinde ki sezgisel beklentimizi çok güçlü bir şekilde desteklemektedir. Burada 53 nolu ailesel mutasyon amino asidi için elde edilen yüksek

SASA değerleri ise dikkat çekici diğer bir nokta olmakla birlikte, bu bulgu bu amino asidin RMSF değerleri ile birlikte değerlendirildiğinde çözelti etkisinin bu amino asit üzerinde önemli bir konformasyonel değişim yaratmadığını göstermektedir. Bu sonuç, belki de bu amino asit üzerinde birden fazla ailesel mutasyonun oluşmasının nedenin bir işareti olabilir.

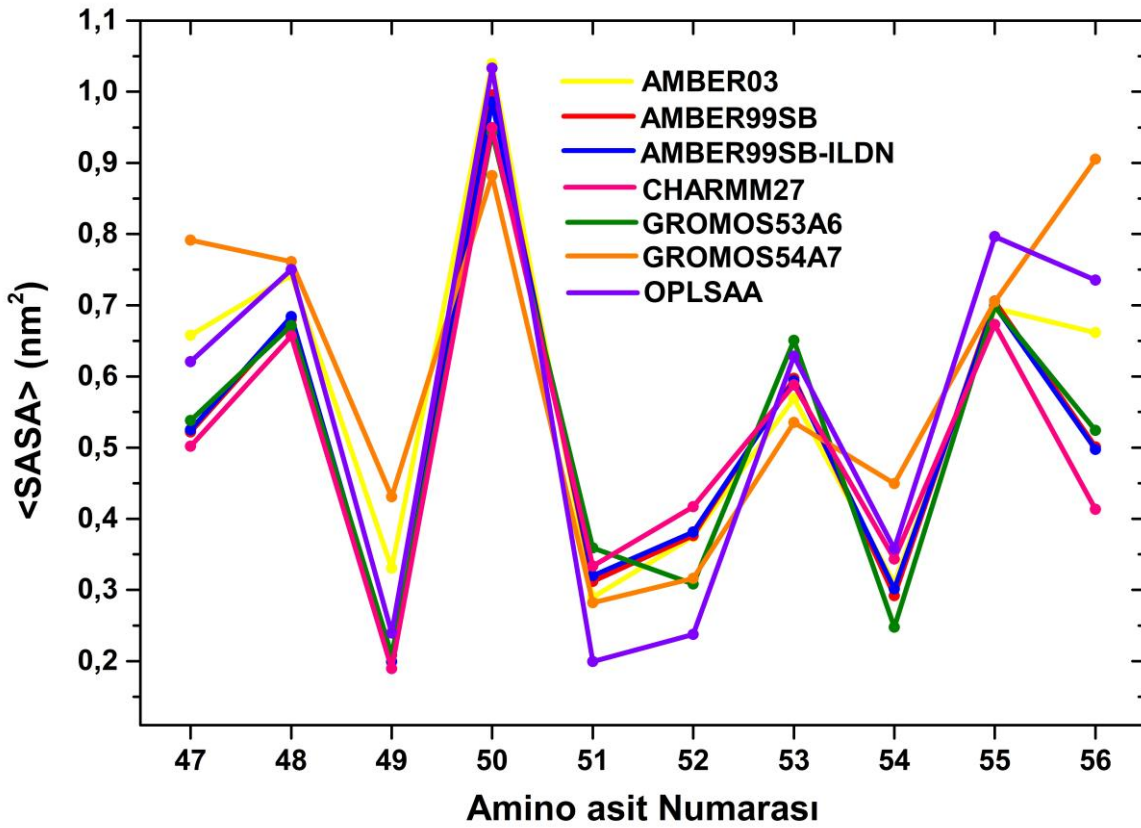


Şekil 4. İlgilenilen kuvvet alanlarının her bir simülasyonu için simülasyon sonundaki (100 ns) PreNAC ara yüzlerinin anlık görüntüleri. Burada; (A) AMBER03, (B) AMBER99SB, (C) AMBER99SB-ILN, (D) CHARMM27, (E) GROMOS53A6 (F) GROMOS54A7 ve (G) OPLSAA kuvvet alanlarıdır

Figure 4. Final configurations for the PreNAC interface at the end of the (100 ns) MD simulations. In here; (A) AMBER03, (B) AMBER99SB, (C) AMBER99SB-ILN, (D) CHARMM27, (E) GROMOS53A6 (F) GROMOS54A7 and (G) OPLSAA force fields



Şekil 5. PreNAC' in her bir amino asidi için simülasyonlar boyunca RMSF değerlerinin ortalama değişimleri  
Figure 5. Average RMSF values per amino acid for PreNAC



Şekil 6. PreNAC' in her bir amino asidinin simülasyonlar boyunca SASA değerlerinin ortalama değişimleri  
Figure 5. Average SASA values per amino acid for PreNAC



Son olarak, ele alınan PreNAC ara yüzün iki yaprak tabakasının birbirine bağlanma serbest enerji değerleri hesaplanmıştır ve bu sayede hem ara yüzün konformasyonel kararlılığı hem de bu kararlılıktaki baskın etkileşim tipleri hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Hesaplamalar MM-PBSA yaklaşımı kullanılarak yapılmıştır. Bu yaklaşım, genellikle deneysel verilerle iyi bir korelasyon sergiler ve hızlı bir şekilde bağlanma serbest enerjisini hesaplamaya izin verir. Bundan dolayı, bu yaklaşım fibril yapılarının moleküller arası etkileşimleri araştırmak için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Berhanu ve Masunov, 2012). Hesaplamalar sonucunda elde edilen PreNAC ara yüzün yaprakları arasındaki bağlanma enerjisi değerleri ve bu değerlere enerji tiplerinin katkıları Çizelge 1 de listelenmiştir. Buradaki negatif değerler bağlanma enerjisine olumlu katkılara karşılık gelirken pozitif değerler olumsuz enerji katkılarına karşılık gelmektedir. Buna göre tüm hesaplamalar için

$\Delta E^{ps}$  ile gösterilen polar solvasyon enerji katkıları dışında, diğer tüm enerji tipi katkıları tabakaların birbirine bağlanmasına olumlu enerji katkısında bulunduğu gözlemlenmektedir. Burada  $\Delta E^{vdw}$  (van der Waals) ve  $\Delta E^{ele}$  (elektrostatik) etkileşimlerin enerji katkıları toplam moleküler mekanik enerjiyi oluşturmaktadır. Moleküler mekanik enerji terimlerinden tüm hesaplamalar için elektrostatik etkileşimlerin oldukça baskın olduğu tablodan açıkça gözlemlenmektedir. Ayrıca hesaplamalardaki  $\Delta E^{sasa}$  polar olmayan solvasyon enerji katkıları olup, moleküler mekanik enerji tipleri kadar olmasa da arayüz kararlılığı için olumlu katkılar sağladığı gözlemlenmektedir. Ayrıca, literatürdeki farklı fibril bölütleri için gerçekleştirilen çalışmalar için de benzer bağlanma enerjisi katkı dağılımları gözlemlenmiştir (Alıcı 2020; Berhanu ve Hansmann, 2012; Berhanu ve Masunov, 2012).

Çizelge 1. PreNAC ara yüzün yaprakları arasındaki serbest bağlanma enerjisi değerleri ve bu değerlere enerji tiplerinin katkıları

Table 1. The binding free energy values and its components (kJ/mol) between sheets for PreNAC interface

Sistem <i>System</i>	Simülasyon <i>Simulation</i>	Enerji (kJ mol <sup>-1</sup> ) ( <i>Energy (kJ mol<sup>-1</sup>)</i> )					E <sub>bağlanma</sub> <i>E<sub>binding</sub></i>
		$\Delta E^{vdw}$	$\Delta E^{ele}$	$\Delta E^{ps}$	$\Delta E^{sasa}$		
AMBER03	1	-375.0±1.4	-3000.3±9.7	2356.7±9.6	-51.4±0.1	-1068.9±2.9	
	2	-368.6±1.2	-3505.4±9.6	2730.8±9.5	-51.4±0.1	-1194.3±2.9	
	3	-380.9±1.1	-3391.1±8.7	2713.3±8.0	-56.0±0.1	-1114.7±3.9	
	ortalama	-374.8	-3298.9	2600.3	-52.9	-1126.0	
AMBER99SB	1	-422.8±1.1	-3654.6±5.8	2941.0±6.2	-54.0±0.1	-1190.2±2.4	
	2	-431.1±1.1	-3701.2±5.2	2975.8±5.6	-55.1±0.1	-1211.7±2.2	
	3	-423.7±1.1	-3702.0±5.2	2995.5±5.0	-54.6±0.1	-1184.6±2.6	
	ortalama	-425.9	-3685.9	2970.8	-54.67	-1195.5	
AMBER99SB-ILDN	1	-420.9±1.0	-3743.8±4.9	3001.7±5.4	-55.1±0.1	-1217.9±2.2	
	2	-432.7±1.1	-3661.5±6.0	2970.7±5.6	-55.6±0.1	-1178.7±2.9	
	3	-421.1±1.1	-3620.9±7.9	2895.1±7.3	-53.9±0.1	-1201.3±3.0	
	ortalama	-424.9	-3675.4	2955.9	-54.9	-1199.3	
CHARMM27	1	-220.1±1.2	-4369.1±4.9	3525.5±5.1	-52.1±0.1	-1115.7±2.2	
	2	-220.2±1.2	-4397.7±4.9	3540.2±5.0	-52.1±0.1	-1130.0±2.2	
	3	-219.2±1.2	-4396.1±4.8	3533.1±4.9	-51.2±0.1	-1133.1±2.2	
	ortalama	-219.8	-4387.6	3533.0	-51.8	-1126.3	
GROMOS53A6	1	-342.4±1.1	-3915.6±6.2	3000.2±6.6	-53.2±0.1	-1311.3±2.9	
	2	-353.1±1.2	-3889.4±7.9	2996.7±6.9	-53.4±0.1	-1289.9±3.5	
	3	-367.7±1.2	-3963.6±4.8	3019.8±4.9	-53.9±0.1	-1365.4±2.2	
	ortalama	-354.4	-3922.9	3005.6	-53.5	-1325.2	
GROMOS54A7	1	-388.2±1.2	-1656.6±9.3	1375.0±8.6	-53.6±0.1	-723.7±5.8	
	2	-441.3±1.7	-2025.6±9.6	1597.4±8.9	-60.6±0.2	-930.3±5.0	
	3	-419.1±2.0	-1697.6±9.9	1430.8±9.0	-56.7±0.2	-741.6±8.8	
	ortalama	-416.2	-1793.3	1467.7	-57.0	-798.5	
OPLSA	1	-406.5±1.6	-2560.4±9.6	2021.7±8.6	-62.1±0.1	-1006.9±7.0	
	2	-434.2±1.4	-2940.3±9.4	2158.4±8.2	-61.7±0.1	-1277.7±3.4	
	3	-407.7±1.7	-2995.4±9.9	2259.5±8.9	-62.7±0.2	-1260.2±6.1	
	ortalama	-416.1	-2832.0	2146.6	-62.1	-1163.6	

$E^{vdw}$ ; van der Waals enerji,  $E^{ele}$ ; elektrostatik enerji,  $E^{ps}$ ; polar solvasyon enerji,  $E^{sasa}$ ; polar olmayan solvasyon enerji katkıları ve  $E^{bağlanma}$ ; serbest bağlanma serbest enerjisi.

## SONUÇ

Araştırma sonuçlarına göre; ele alınan PreNAC arayüz üzerine yapılması muhtemel gelecek MD simülasyon çalışmaları için başta CHARMM27 ve GROMOS53A6 olmak üzere AMBER99SB ve AMBER99SB-ILDN kuvvet alanlarının ele alınmasının uygun olacağı tespit edilmiştir. Ayrıca ele alınan PreNAC arayüz için elde edilen konformasyonel özellikler hakkındaki önemli bulgular şunlardır. i) His50 amino asidi bulunduğu konum nedeniyle çözeltiye daha fazla maruz kalmasından kaynaklı olarak en fazla konformasyonel değişim gösteren amino asittir. ii) 53 nolu konumdaki amino asidin çözeltiye fazlaca maruz kalmasına rağmen yüksek konformasyonel kararlılık sergilemesi, bu amino asit pozisyonunda birden fazla ailesel mutasyonun meydana gelmesinin nedeni olabilir. iii) Hesaplanan tabakalar arası serbest bağlanma enerjisi analizine göre, tabakalar arası arayüz kararlılığı için baskın etkileşim tipinin elektrostatik etkileşimler olduğu gözlemlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015-22794455-03 nolu Altyapı Projesi ile desteklenmiştir.

## Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## KAYNAKLAR

Alicı H 2020. Structural Analyses and Force Fields Comparison for NACore (68–78) and SubNACore (69–77) Fibril Segments of Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Modeling*, 26: 132.

Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J 2013. Alpha-Synuclein P. H50q, a Novel Pathogenic Mutation for Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 28 (6): 811-813.

Berendsen HJ, Postma JP, van Gunsteren WF, Hermans J 1981. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: *Intermolecular Forces*, Springer, Dordrecht, pp. 331-342.

Berhanu WM, Hansmann UH 2012. Side-Chain Hydrophobicity and the Stability of Aβ16–22 Aggregates. *Protein Science*, 21 (12): 1837-1848.

Berhanu WM, Masunov AE 2012. Unique Example of Amyloid Aggregates Stabilized by Main Chain H-Bond Instead of the Steric Zipper: *Molecular*

*Dynamics Study of the Amyloidogenic Segment of Amylin Wild-Type and Mutants. Journal of Molecular Modeling*, 18 (3): 891-903.

Best RB, Zhu X, Shim J, Lopes PE, Mittal J, Feig M, MacKerell AD Jr. 2012. Optimization of the Additive Charmm All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone  $\phi$ ,  $\Psi$  and Side-Chain X1 and X2 Dihedral Angles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8 (9): 3257-3273.

Bussi G, Donadio D, Parrinello M 2007. Canonical Sampling through Velocity Rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 126 (1): 014101.

Carballo-Pacheco M, Strodel B 2017. Comparison of Force Fields for Alzheimer's A: A Case Study for Intrinsically Disordered Proteins. *Protein Science*, 26 (2): 174-185.

Çınar E, Çakmaklı GY, Tel BC, 2019. Parkinson Hastalığında Nöroprotektif Tedaviler. *Turkish Journal of Neurology*, 25: 189-197.

Darden T, York D, Pedersen L 1993. Particle Mesh Ewald: An N·Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98 (12): 10089-10092.

De Lau LM, Breteler MMB, 2006. Epidemiology of Parkinson's Disease. *The Lancet Neurology*, 5 (6): 525-535.

DeLano WL 2002. The PyMOL Molecular Graphics System, <http://www.pymol.org>.

Demir K, Alicı H, Yaşar F 2018. Conformational Stability of the Tetrameric De Novo Designed Hexcoil-Ala Helical Bundle. *Chinese Journal of Physics*, 56(1): 46-57.

Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R, Lee T 2003. A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 24 (16): 1999-2012.

Glenner GG, Wong CW 1984. Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120 (3): 885-890.

Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H 2013. 100 Years of Lewy Pathology. *Nature Reviews Neurology*, 9 (1): 13.

Hess B, Bekker H, Berendsen HJ, Fraaije JG 1997. Lincs: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18 (12): 1463-1472.

Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C 2006. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65 (3): 712-725.

Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey

- RW, Klein ML 1983. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*, 79 (2): 926-935.
- Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL 2001. Evaluation and Reparametrization of the Opls-Aa Force Field for Proteins Via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105 (28): 6474-6487.
- Kumari R, Kumar R, Consortium OSDD, Lynn A 2014. G\_Mmpbsa a Gromacs Tool for High-Throughput Mm-Pbsa Calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54 (7): 1951-1962.
- Lang AE, Lozano AM 1998. Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine-Unbound Volume*, 339 (16): 1130-1143.
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Pieri L, Madiona K, Dürr A, Melki R 2013. G51d A-Synuclein Mutation Causes a Novel Parkinsonian-Pyramidal Syndrome. *Annals of Neurology*, 73 (4): 459-471.
- Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE 2010. Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber Ff99sb Protein Force Field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78 (8): 1950-1958.
- Lobanov MY, Bogatyreva NS, Galzitskaya OV 2008. Radius of Gyration as an Indicator of Protein Structure Compactness. *Molecular Biology*, 42 (4): 623-628.
- MacKerell Jr AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack Jr RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S 1998. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102 (18): 3586-3616.
- Miyamoto S, Kollman PA 1992. Settle: An Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. *Journal of Computational Chemistry*, 13 (8): 952-962.
- Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, Van Gunsteren WF 2004. A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The Gromos Force-Field Parameter Sets 53a5 and 53a6. *Journal of Computational Chemistry*, 25 (13): 1656-1676.
- Parrinello M, Rahman A 1981. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics*, 52 (12): 7182-7190.
- Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, Tienari PJ, Pöyhönen M, Paetau A 2014. A Novel A-Synuclein Mutation A53e Associated with Atypical Multiple System Atrophy and Parkinson's Disease-Type Pathology. *Neurobiology of Aging*, 35 (9): 2180-e1.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein, J Boyer R 1997. Mutation in the A-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276 (5321): 2045-2047.
- Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D 2013. Gromacs 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics*, 29 (7): 845-854.
- Rodriguez JA, Ivanova MI, Sawaya MR, Cascio D, Reyes FE, Shi D, Sangwan S, Guenther EL, Johnson LM, Zhang M 2015. Structure of the Toxic Core of A-Synuclein from Invisible Crystals. *Nature*, 525 (7570): 486-490.
- Schmid N, Eichenberger AP, Choutko A, Riniker S, Winger M, Mark AE, van Gunsteren WF 2011. Definition and Testing of the Gromos Force-Field Versions 54a7 and 54b7. *European Biophysics Journal*, 40 (7): 843.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M 1997. A-Synuclein in Lewy Bodies. *Nature*, 388 (6645): 839-840.
- Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL 2005. Structure and Dynamics of Micelle-Bound Human A-Synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (10): 9595-9603.
- Xi W, Vanderford EK, Hansmann UH, 2018 Out-of-Register Aβ42 Assemblies as Models for Neurotoxic Oligomers and Fibrils. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14 (2): 1099-1110.
- Verlet L 1967. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159 (1): 98.
- Yoshino H, Hirano M, Stoessl AJ, Imamichi Y, Ikeda A, Li Y, Funayama M, Yamada I, Nakamura, YSossi V 2017. Homozygous Alpha-Synuclein P. A53v in Familial Parkinson's Disease. *Neurobiology of Aging*, 57: 248-e7.
- Yu, H, Yan Y, Zhang C, Dalby PA 2017. Two Strategies to Engineer Flexible Loops for Improved Enzyme Thermostability. *Scientific Reports*, 7: 41212.
- Zheng J, Ma B, Tsai C-J, Nussinov R 2006. Structural Stability and Dynamics of an Amyloid-Forming Peptide Gnnqqny from the Yeast Prion Sup-35. *Biophysical Journal*, 91 (3): 824-833.