

Atf için / For Citation: H. Alıcı, K. Demir, "Parkinson hastalığı ile ilişkili PreNAC fibril kesiti ve onun A53C, A53E, A53G, A53T ve A53V mutasyonlarının yapısal kararlılığın araştırılması", *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 16(1), 66-76, 2021.



## Parkinson Hastalığı ile İlişkilendirilen PreNAC Fibril Kesiti ve Onun A53C, A53E, A53G, A53T, A53V Mutasyonlarının Yapısal Kararlılığın Araştırılması

Hakan ALICI\*<sup>1</sup>, Kadir DEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, 67100, Zonguldak, Türkiye

\*yazışılan yazar e-posta: hakanalici@beun.edu.tr

(Alınış / Received: 10.11.2020, Kabul / Accepted: 09.02.2021, Yayınlanma / Published: 27.05.2021)

**Özet:** Parkinson hastalığının (PD) başlıca patolojik işaretlerinden biri beyinde kümelenmiş alfa-sinüklein agregalarının oluşturdukları fibril yapılarıdır. Bu çalışmada PreNAC olarak adlandırılan bir alfa-sinüklein fibril kesiti ve onun 53. aminoasidinin A53C, A53E, A53G, A53T ve A53V mutasyon fibril yapıları üzerine odaklanılmıştır. Ele alınan tüm fibril kesiti sistemlerinin yapısal kararlılıkları ve yaprak tabakları arasındaki etkileşimler Moleküler Dinamik (MD) simülasyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Böylece ilgilenilen fibril kesitlerinin gelecekteki muhtemel ilaç geliştirme çalışmaları için hedef yapı olabilme ihtimalleri değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgulara göre, vahşi tip fibril kesiti ve onun kalıtsal mutasyonlarını içeren A53E, A53T, A53V fibril kesitlerinin simülasyonlar boyunca önemli ölçüde konformasyonel formlarını kararlı bir şekilde koruduğu gözlemlenirken öte yandan A53G mutasyonunun fibril kesitini dağıtıcı bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** PreNAC, Moleküler dinamik, Simülasyon, Parkinson hastalığı

## Investigation of the Structural Stability of PreNAC and its A53C, A53E, A53G, A53T, A53V Mutant Fibril Segments Associated with Parkinson's Disease

**Abstract:** A pathological hallmark of Parkinson's disease (PD) is the fibrillar structures formed by alpha-synuclein aggregates accumulated in the brain. In this study, we focused on an alpha-synuclein PreNAC fibril segment and its A53C, A53E, A53G, A53T and A53V mutations. The structural stability and the interactions between sheets of all fibril systems studied in this paper were examined using the Molecular Dynamic (MD) simulation method and thus the possibilities of these fibril segments to be target structures for future drug development efforts was evaluated. According to the findings obtained from our MD simulations, it was determined that the wild type (WT) fibril segment and its A53E, A53T and A53V fibril structures with hereditary mutations preserved significantly their stable conformational structure along the simulations, whereas the A53G mutation had a disruptive effect on the fibril segment.

**Key words:** PreNAC, Molecular dynamics, Simulation, Parkinson's disease

## 1. Giriş

Parkinson hastalığı (PD), Alzheimer hastalığından (AD) sonra dünyada insanların maruz kaldığı en yaygın nörodejeneratif hastalıktır[1,2]. PD hastalarının beyinlerinin substantia nigra (SN) bölgesinde, anormal şekilde biriken Lewy cisimcikleri (LB) ve Lewy nöritler (LN) olarak bilinen sitotoksik ipliksi protein fibril kümelerine rastlanılmaktadır[3]. Ayrıca bilindiği üzere LB ve LN'lerin temel fibril bileşenleri ise alfa-sinüklein fibril agregalarıdır. Bu sebeple, alfa-sinüklein fibril kümeleri PD'nin başlıca patolojik işaretlerinden biri olarak kabul edilmektedir[4,5].

Tek bir alfa-sinüklein proteinin asit zinciri 140 aminoaside sahip olup bu yapı literatürde üç farklı domainle sınıflandırılmaktadır[6]. Bunlardan N-terminal domaini, alfa-sinüklein'in 1-60 aminoasitlerini kapsayan ve çoğunlukla pozitif yüklü aminoasitlerden oluşan bir bölge iken alfa-sinüklein'in C-terminal kuyruğu ise 96-140 aminoasitlerini kapsayan çoğunlukla negatif yüklü aminoasitlerden oluşan asidik bir domaindir. NAC (non-amyloid- $\beta$  component) olarak bilinen ve proteinin çekirdek bölgesi olan domain ise alfa-sinüklein'in 61-95 aminoasitlerini içermekte olup alfa-sinüklein fibril yapılarının oluşumu ve onun agregasyonu ile ilişkilendirilmektedir[7-10]. Sunulan bu çalışmada, alfa-sinüklein'in N-terminalinin bitişiindeki ve NAC domainin hemen öncesindeki (47-56) aminoasitleri içermesinden dolayı PreNAC olarak adlandırılan bir alfa-sinüklein fibril kesiti üzerine odaklanılmıştır[8]. Literatürdeki araştırmalara göre bu küçük fibril kesitinin fibril tabakaları arası bir arayüz bölgesi olabilme ihtimali çok yüksektir[8,10] ve bundan dolayı PreNAC fibril kesiti arayüz yapılarının çeşitli yöntemlerle incelenmesi alfa-sinüklein fibril kümelerinin birbiri ile etkileşim mekanizmasını aydınlatılabilmesi için büyük önem arz etmektedir.

Öte yandan, PD'nin gelişimi esnasında fibril agregasyon sürecine beyindeki dopaminerjik hücrelerin (dopamin salgılayan sinir hücreleri) zarar görerek ölümlerinin eşlik ettiği gözlemlenmektedir. Bilindiği üzere insanlarda yaşlanmaya bağlı olarak beyindeki dopaminerjik hücrelerin ölümünün gerçekleşmesi sonucu, 65 yaş üzeri insanlarda PD'ye daha çok rastlanılmaktadır. Ancak kalıtsal (aileden gelen) mutasyona sahip bireylerde erken başlangıçlı PD görülmektedir. Literatürde şu ana kadar tespit edilmiş yedi kalıtsal mutasyondan üçüne alfa-sinüklein'in 53. aminoasidinde (A53E[11], A53T[12], A53V[13]) rastlanılmıştır, dolayısıyla bu aminoasidin erken başlangıçlı PD için önemi açıktır. Bu durum, alfa-sinüklein'in 53. aminoasidini üzerinde barındıran PreNAC (47-56) fibril kesitinin önemini daha da artmaktadır.

Ayrıca, iyi bilindiği üzere deneysel yöntemlerdeki kısıtlamalar ve karşılaşılan zorluklardan kaynaklı olarak hastalıklara yol açan bu ve benzeri fibril agregalarının etkileşim mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bundan dolayı bu türden etkileşimlerin derinlemesine incelenebilmesi için fibril sistemlerinin teorik yaklaşımlar ile irdelenmesi gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Bu noktada ise Moleküler Dinamik (MD) simülasyon yöntemi biyolojik sistemlerin yapısal karakterlerinin incelenmesi ve zaman içindeki davranışlarının gözlemlenmesi için kullanılan başlıca teorik yaklaşımdır.

Bu bağlamda sunulan çalışmada, hem kalıtsal A53E, A53T, A53V mutasyonların hem de bunlara ilaveten A53C, A53G mutasyonlarının, PreNAC fibril kesitinin konformasyonu üzerindeki etkisini atomik seviyede gözlemlemek üzere Moleküler Dinamik (MD) simülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Sunulan simülasyon çalışmalarımızdan elde edilen bulgular A53G dışındaki ilgilenilen tüm mutasyonlara bu

fibril kesitinde rastlanabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, PreNAC fibril kesitinin gelecekteki muhtemel ilaç geliştirme çalışmaları için hedef yapı olarak kullanılabilmesini sonucu çıkarabilir.

## 2. Materyal ve Metot

Bu çalışmadaki PreNAC(47-56) fibril kesiti için 4ZNN kodu ile Protein Data Bank (PDB)'a depo edilen kristal yapısı kullanılmıştır[8]. Bu fibril kesiti birbirine anti paralel olarak yerleştirilmiş çift yaprak tabakalı (sheet) bir formda olup, her bir yaprak tabakasında beş PreNAC (47-56) iplik (strand) yapısı bulunmaktadır. Başka bir deyişle ele alınan fibril kesiti yapısı, toplamda on tane (10-mer) PreNAC (47-56) ipliği içermektedir. Sunulan bu çalışmada doğal aminoasit dizilimdeki PreNAC (47-56) fibril yapısı literatüre uygun olarak WT (wild-type) olarak adlandırılmıştır. Çalışmada ilgilenilen fibril mutasyon yapıları, WT yapısının 53. aminoasidi olan Alanin'in PyMOL programı kullanılarak her bir mutasyon sitemine uygun olacak aminoasit ile yer değiştirilmesiyle oluşturulmuştur[14].

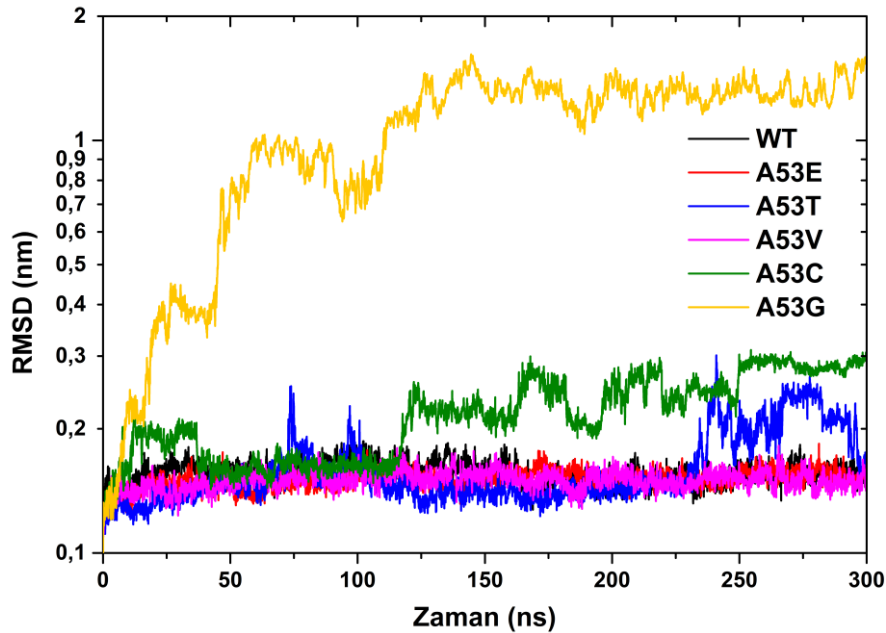
Sunulan çalışmadaki fibril kesiti yapılarının simülasyonlarında, atomik etkileşimler için CHARMM27[15,16] kuvvet alanı ve bu kuvvet alanı için kullanılması önerilen TIP3P[17] çözelti modeli kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarımızda, PreNAC ve benzeri küçük fibril kesitleri için CHARMM27 kuvvet alanının daha makul sonuçlar verdiği gösterilmiştir[18,19]. Araştırmamızdaki MD simülasyonların tümü GROMACS.v4.6.5[20] programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca simülasyonlardaki integrasyon algoritması olarak Verlet algoritması kullanılmış[21] ve integrasyon zaman adımı 2 fs olarak ayarlanmıştır.

Simülasyonların başlangıcında tüm sistemler 6.3x6.3x6.3 nm boyutlarında kübik bir simülasyon kutusunun merkezine yerleştirilmiş ve bu yerleştirmede fibril kesitlerinin herhangi bir atomu ile simülasyon kutusu arasındaki minimum uzaklık 1 nm olarak alınmıştır. Daha sonra simülasyon kutularının içerisi su molekülleri ile doldurulmuş, ardından nötr olmayan sistemleri simülasyonlarda kullanılan PBC (Periodic Boundary Condition) ve PME[22,23] (Particle Mesh Ewald teorisi) gereğince nötralize etmek için, sistemlere gereken miktarlarda Na<sup>+</sup> veya Cl<sup>-</sup> iyonları eklenmiştir. Daha sonra, nötralize haldeki tüm sistemlerdeki kötü temasları ve uygun olmayan geometrileri dinamik simülasyonlar öncesinde ortadan kaldırmak adına sistemlerin enerjileri ardışık olarak "Steepest Descent" ve "Conjuge Gradient" metotları kullanılarak minimize edilmiştir. Enerji minimizasyon aşamalarından sonra ise her biri 1ns'lik iki aşamalı dengeleme simülasyonlarına geçilmiştir. Dengeleme simülasyonlarının ilk aşaması NVT istatistiksel kümede ikinci aşaması ise NPT istatistiksel kümede gerçekleştirilmiştir. Bilindiği gibi MD simülasyonların içerdiği stokastik yaklaşımlar nedeniyle yalnızca bir yörünge dosyası kullanılarak yapılan analizler yeterince nicel olmayabilir. Bundan dolayı simülasyon sonuçlarını daha güvenilir kılabilmek için, NVT dengeleme simülasyonlarının başında her bir fibril sistemi için rastgele hız dağılım fonksiyonlarına sahip üç bağımsız yörünge dosyası (trajectory) üretilmiştir. Böylece her bir fibril sistemi için birbirinden bağımsız dengelenmiş üç simülasyon setine sahip olunmuştur. Daha sonra NPT kümede her bir sistem için 300ns uzunluklara sahip üç birbirinden bağımsız ürün simülasyonları yürütülmüştür. Dinamik simülasyonlarda sıcaklık v-rescale termostatı[24] ile 310 K'de, basınç Parrinello–Rahman barostatı [25] ile 1 bar da sabit tutulmuştur. Çalışmada ürün simülasyonlardaki MD yörüngeleri, analizler için 20 ps aralıklarla kaydedilmiştir.

Grafiklerde sergilenen metrik analizlerin sonuçları, aksi belirtilmedikçe her bir fibril sistemi için üretilen üç adet birbirinden bağımsız yörünge için elde edilen verilerin ortalamasını göstermektedir. Ayrıca, sistemlerin üç boyutlu (3-B) yapıların görselleştirilmesi PyMOL programı kullanılarak elde edilmiştir[14].

### 3. Bulgular

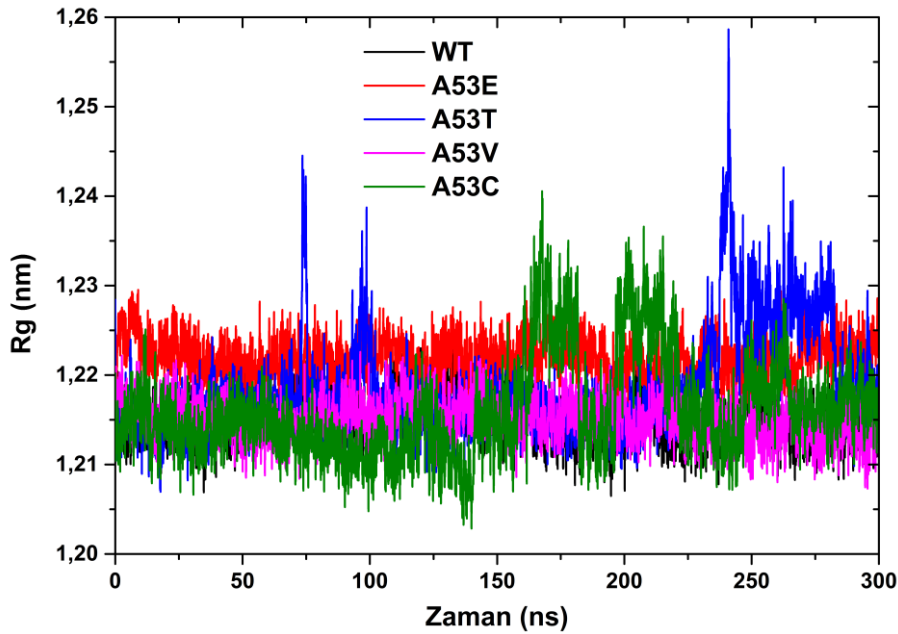
İlgilenilen fibril sistemlerin konformasyonlarının dinamik özelliklerini inceleyebilmek için ilk olarak kök-ortalama-kare sapması (RMSD: root-mean-square deviation) analizi yapılmıştır. Bu analiz proteinlerin konformasyonlarındaki değişimleri tespit edebilmek için kullanılan başlıca analizlerden biri olup, protein omurgasındaki (backbone) atomların simülasyon boyunca doğal konformasyonlarından ne kadar uzaklaştığının bir ölçüsüdür. Her bir fibril sistemi için yapılan RMSD hesaplamalarının ortalama değerlerinin simülasyon boyunca değişimi Log<sub>10</sub> ölçeğinde Şekil 1 de sergilenmiştir. Şekil incelendiğinde, WT ve kalıtsal mutasyonlu fibril yapılarının iki tanesi A53E ve A53V'nin RMSD değerlerinin simülasyonlar boyunca benzer istikrarlı (kararlı) değerlere ( $\approx 0.15$  nm) ve davranışlara sahip olduğu gözlemlenmektedir. Bir başka kalıtsal mutasyonlu fibril sistemi olan A53T ise, genel anlamda 230ns'ye kadar WT ve diğer iki kalıtsal mutasyonlu fibril sistemleriyle benzer RMSD değerlerine ve onların değişimlerine sahiptir. Ancak A53T'nin, 230ns'den simülasyon sonuna kadar geçen sürede, bahsi geçen diğer sistemlerden hem daha yüksek hem de daha değişken (istikrarsız) değerlere sahip olduğu gözlemlenmektedir. Bu çalışma da ilgilenilen diğer mutasyonlu fibril sistemleri A53C ve A53G ise WT ve onun kalıtsal mutasyona sahip sistemlerinden hem daha yüksek hem de istikrarsız RMSD değerlerine sahiptir. Özellikle A53G fibril sistemi için elde edilen değerlerin, bahsi geçen tüm sistemlerden elde edilen verilerden önemli ölçüde fazla olduğu açıkça görülmektedir. Bu durum, ilgili fibril yapısının 53. aminoasit pozisyonundaki Gly mutasyonun, yapının kararlılığını önemli ölçüde etkileyerek fibril bütünlüğünü dağıttığının bir işareti olabilir.



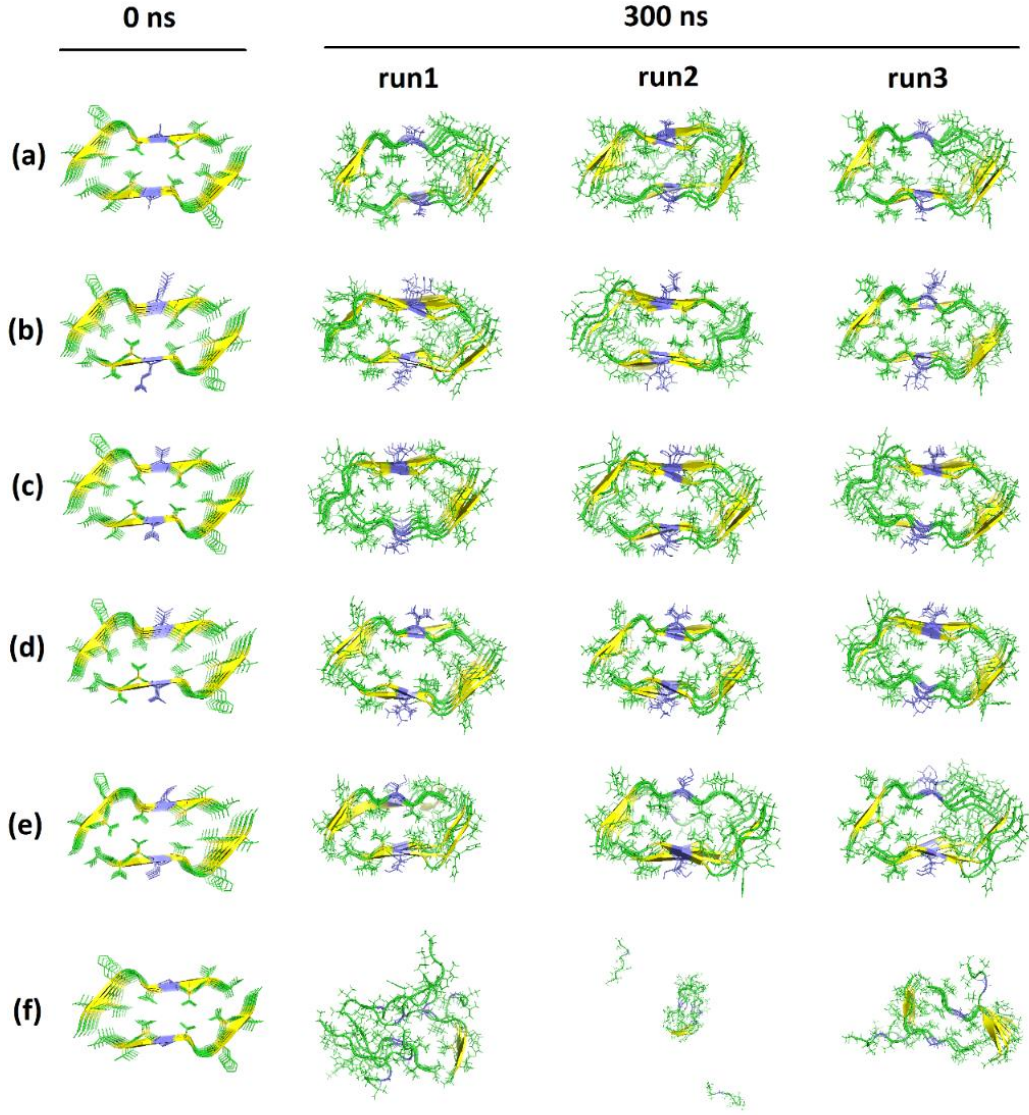
Şekil 1. Ortalama RMSD değerlerinin simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi.

Daha sonra, fibril sistemlerindeki konformasyonel değişimleri daha derinlemesine araştırabilmek için Rg (jirasyon yarıçapı) analizi yapılmıştır. Bu analiz proteinin

omurgasındaki atomlarının simülasyon boyunca proteinin kütle merkezine göre konumlarındaki değişimin bir göstergesi olup proteinin boyutları başka bir deyişle kompaktlığı hakkında önemli bilgiler sağlar. Bu analizlerin sonuçları Şekil 2’de sergilenmiş olup, A53G fibril sistemi için elde edilen değerler (ortalama  $\approx 1.79$  nm) çok yüksek olduğundan bu mutasyonun Rg değerleri bu grafiğe konulamamıştır. Bu yüksek değer yapının ipliklerinin kütle merkezine göre doğal konumlarından önemli ölçüde uzaklaştığı göstermektedir dolayısıyla bu durum RMSD bulgularından elde ettiğimiz A53G mutasyonu için fibril bütünlüğünün bozulmuş olabileceği hakkındaki sezgisel beklentiyi desteklemektedir. Ayrıca, şekilde sergilenen tüm sistemler için elde edilen değerlerin yaklaşık simülasyon boyunca benzer değer aralığı ( $1.21\text{nm} < R_g < 1.23\text{nm}$ ) içinde kaldığı görülmekte olup, bu sistemlerdeki fibril yapılarının 10 iplikli bütünlüklerini korudukları söylenebilir. Bu durumun daha derinlemesine gözlemlenebilmesi için, her bir fibril sistemi için birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilen üçer adet simülasyon setinin her birinin 300 ns’lik simülasyonlarının sonundaki 3-B konfigürasyonlarının anlık görüntüleri (snapshots) Şekil 3’de sergilenmiştir. Ayrıca şekilde, simülasyon sonundaki konfigürasyonlarla kıyaslayabilmek için her bir sisteminin simülasyon başlangıçlarındaki doğal konformasyonlarının 3-B görselleri de sergilenmiştir. Şekil incelendiğinde WT ile birlikte onun kalıtsal mutasyon fibril sistemleri A53T, A53E ve A53V’nin gerçekleştirilen üç simülasyon seti içinde doğal düzenli istiflenmiş konformasyonel dizilimlerini büyük ölçüde koruduğu söylenebilir. A53C fibril sistemi için ise, başta üçüncü simülasyonu olmak üzere doğal fibril konformasyonun bir miktar bozulduğu ve fibril iplikçilerinin az bir miktarda da olsa düzenli istif yapısını kaybettiği söylenebilir. Öte yandan, A53G sistemi incelendiğinde ise bu sistemin üç simülasyonu için de iplikçiklerin iç içe girerek ya da birbirinden uzaklaşarak düzenli istif yapısının ortadan kalktığı gözlemlenmektedir. Tüm bu gözlemler, RMSD ve Rg analizleri sonucu elde edilen bulguları desteklemektedir.



Şekil 2. Ortalama Rg değerlerinin simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi.



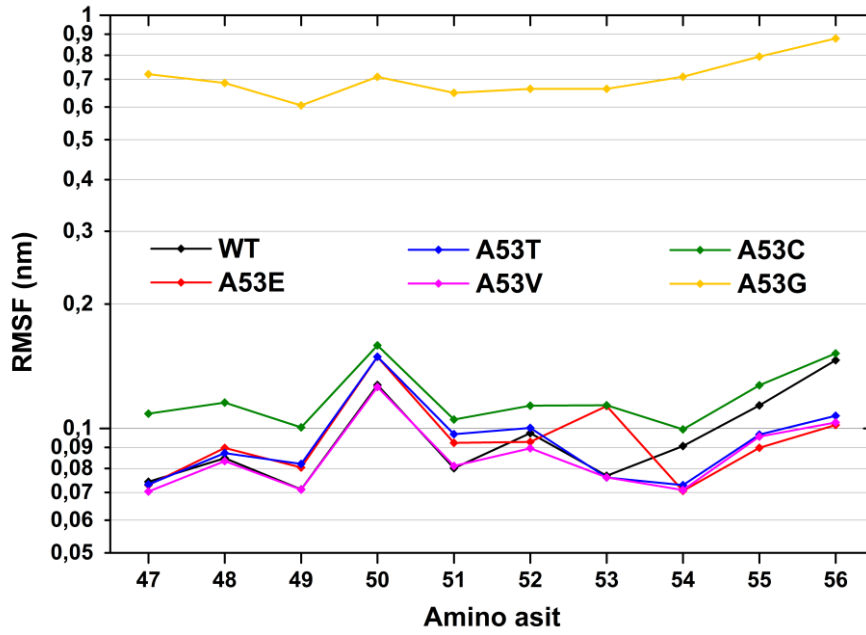
**Şekil 3.** İlgilenilen WT ve onun mutant sistemlerinin her bir simülasyonu için simülasyon sonundaki (300 ns) anlık görüntüleri. Burada; (a) WT, (b) A53E, (c) A53T, (d) A53V, (e) A53C ve (f) A53G sistemleridir.

Yukarıda yapılan analizlere ek olarak, fibril sistemlerindeki her bir aminoasitin ayrı ayrı konformasyonel değişimlerini inceleyebilmek ve böylece fibril sistemlerinin konformasyonlarındaki bölgesel bozulmaları tespit edebilmek için kök-ortalama-kare dalgalanma (RMSF, root mean square fluctuations) analizi yapılmış ve Şekil 4 de sergilenmiştir. Bu şekilde yatay eksen aminoasit numaralarını gösterirken dikey eksen  $\text{Log}_{10}$  skalasında onların RMSF değerlerini gösterir. Şekil incelendiğinde diğer analizlerden de beklenildiği gibi en yüksek değerler A53G fibril mutasyon sistemi için elde edilmiştir. Bu yüksek RMSF değeri, fibril ipliğinin 53 nolu pozisyonundaki Alanin aminoasidinin, yan zincirinde sahip olduğu yalnızca bir Hidrojen atomu ile en basit ve en küçük aminoasit olan Glisin ile yer değiştirmesinin iplik omurgasının esnekleşmesine neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla A53G sisteminde gözlemlenen fibril bütünlüğünün bozulmasındaki temel etkenin yüksek ihtimalle bu olduğu söylenebilir. Bundan önce sunduğumuz RMSD ve  $R_g$  analizlerinde, A53C fibril mutasyon sisteminin WT ve diğer kalıtsal mutasyon fibril sistemlerine kıyasla bir miktar daha yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlenmişti. Bu tutumun



RMSF değerlerinde de devam ettiği ancak fibril ipliğinin bölgesel konformasyonel davranışının diğer sistemler ile benzer davranış eğilimine sahip olduğu görülmektedir. En düşük RMSF değerlerine sahip WT sistemi ve onun A53E, A53T ve A53V kalıtsal mutasyona sahip fibril sistemleri, yapılarıdaki her bir aminoasidin konformasyonel davranışlarına bakılarak kendi aralarında kıyaslandığında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmaktadır;

- İplik üzerindeki ilk altı aminoasitin (Gly47-Val48-Val49-His50-Gly51-Val52) bu dört sistem içinde benzer konformasyonel davranış eğilimine sahip olduğu ve genel anlamda bahsi geçen aminoasitler için WT ve A53V sistemlerinin A53E ve A53T den bir miktar daha düşük değerlere sahip olduğu söylenebilir.
- Mutasyonların gerçekleştiği 53 nolu aminoasitler için WT, A53V, A53T sistemlerinin hemen hemen aynı RMSF değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Ancak Glu ikamesi ile A53E sistemin daha yüksek değerlere sahip olması dikkat çekicidir.
- Kalıtsal mutasyon fibril sistemlerinin iplik üzerindeki son 3 aminoasit (Thr54-Val55-Ala56) için WT' ye kıyasla nispeten daha küçük değerlere sahip olduğu ve bundan dolayı ailesel mutasyonların bu aminoasit bölgesi üzerindeki konformasyonel kararlılığı artıracak etkisi olduğu söylenebilir.



Şekil 4. İlgilenilen WT ve onun mutant sistemlerinin RMSF değerlerinin değişimleri.

Ayrıca ilgilenilen PreNAC fibril sisteminin yaprak tabakaları arasındaki etkileşimlerin kararlılığının bir ölçüsü olarak yaprak tabakaları arası serbest bağlanma enerjisi değerleri hesaplanmış ve serbest bağlanma enerjisi değerlerine katkı veren enerji tipleri de dahil olmak üzere elde edilen sonuçlar Tablo 1'de listelenmiştir. Bu hesaplamalarda, Kumari ve arkadaşları tarafından geliştirilen MM-PBSA yaklaşım metodu kullanılmıştır[26]. Bu metot su ve iyonları açıkça hesaba katmadığı için, bu yaklaşımda su veya iyonların salınması veya tutulması nedeniyle oluşan entropik katkılar ihmal edilmektedir. İçerdiği birtakım sınırlandırmalara rağmen, termodinamik integrasyon veya serbest enerji pertürbasyon yöntemlerinden hem daha az hesaplama zamanına ihtiyaç duyması hem de

sağlamış olduğu makul sonuçlar bu yaklaşımı ön plana çıkarmaktadır. Tüm bunlar dikkate alındığında MM-PBSA, protein-protein[18,27] ve protein-ligand[28,29] komplekslerinin serbest bağlanma enerjilerinin hesabı için en çok tercih edilen yaklaşım yöntemlerinden birisidir. Bu bağlamda çalışmamızda ilgili hesaplamaları yapabilmek için, ilk olarak yörünge dosyalarından su ve iyonlar kaldırılmış ve yalnızca proteini içerecek şekilde her 100 ps de bir eşit aralıklarla toplamda 3000 anlık görüntü (snapshots) elde edilerek, bu snapshots'lar üzerinden hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Tablodaki yüksek negatif değerler bağlanmadaki yüksek olumlu katkılara karşılık geliyorken, pozitif değerler bağlanmadaki olumsuz katkılara karşılık gelir. Tablo incelendiğinde, tüm fibril sistemi için yapılan hesaplamalarda  $\Delta E^{ps}$  (polar solvasyon enerjisi) değerlerinin pozitif değerlere sahip olması bu enerji bileşeni katkısının fibril sisteminin yaprakları arasındaki kararlılığı olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bunun dışındaki tüm enerji bileşenlerinin katkıları negatiftir yani yaprak tabakalarının birbirine bağlanmasındaki kararlılığı olumlu anlamda destekleyici tiptedir. Ayrıca tablodan  $\Delta E^{elek}$  (elektrostatik) etkileşimlerinin fibril sistemlerinin yaprak tabakaları arası kararlılık için en baskın etkileşim tipi olduğu açıkça görülmektedir. Bu davranış tutumu literatürdeki bazı küçük fibril segment sistemleri içinde benzerdir [18,28]. Fibril sistemlerinin  $E^{bağlanma}$  değerleri incelendiğinde bundan önceki analizlerde düzenli istif yapısının bozulduğu tespit edilen A53G fibril sisteminin her bir simülasyon çalışması için en düşük değerlere sahip olduğu gözlemlenmektedir. WT, A53C, A53T ve A53V fibril sistemleri için elde edilen bağlanma değerleri ise birbirine yakın ve en yüksek değerler oldukları gözlemlenmektedir. A53E sistemi ise bu sistemlerden bir miktar daha düşük negatif değere sahip olup bu duruma  $\Delta E^{elek}$  değerlerinin diğer sistemlerden daha düşük olması yol açmaktadır. Bu durum A53E'nin sahip olduğu yüklü Glu mutasyonun her bir yaprak içindeki ipliklerin birbirine negatif-negatif itici etkileşim uygulamasından kaynaklanmış olabileceğine dair sezgisel bir beklentiye atfedilebilir.

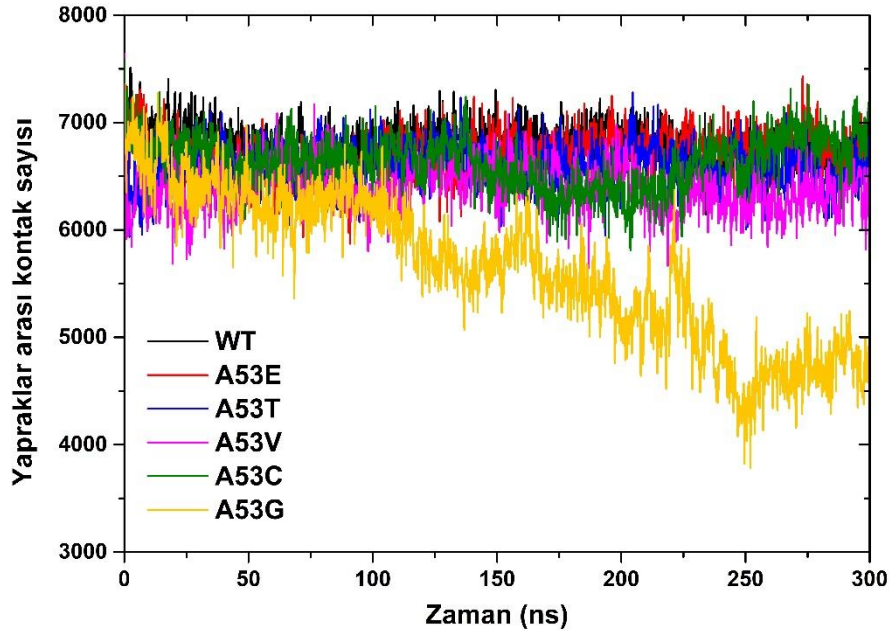
**Tablo 1.** PreNAC ara yüzün yaprakları arasındaki serbest bağlanma enerjisi değerleri ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) ve bu değerlere enerji tiplerinin katkıları

Sistem	Simülasyon	$\Delta E^{vdW}$	$\Delta E^{elek}$	$\Delta E^{ps}$	$\Delta E^{sasa}$	$E^{bağlanma}$
WT	1	-221.6±3.1	-4379.2±15.4	3516.2±14.2	-52.1±0.2	-1136.7±6.5
	2	-217.5±4.0	-4392.7±15.6	3519.9±15.8	-51.5±0.2	-1141.7±6.9
	3	-221.3±3.8	-4415.2±15.4	3544.9±15.2	-52.0±0.2	-1143.6±6.5
	ortalama	-220.1	-4395.7	3527.0	-51.9	-1140.7
A53E	1	-227.4±3.7	-4226.2±15.2	3463.8±15.6	-53.7±0.2	-1043.5±7.9
	2	-218.7±4.1	-4279.6±16.3	3475.0±15.8	-52.2±0.3	-1075.5±8.4
	3	-215.4±4.2	-4261.2±16.3	3469.5±15.0	-52.4±0.3	-1059.4±8.4
	ortalama	-220.5	-4255.7	3469.4	-52.8	-1059.5
A53T	1	-233.5±3.6	-4380.7±17.8	3508.5±17.1	-51.9±0.2	-1157.6±6.8
	2	-226.9±3.7	-4348.1±18.9	3488.6±17.1	-51.3±0.3	-1137.7±7.6
	3	-235.0±3.6	-4426.2±17.0	3549.5±17.1	-52.7±0.2	-1164.4±6.8
	ortalama	-231.8	-4385.0	3515.5	-52.0	-1153.3
A53V	1	-198.8±4.2	-4443.4±16.0	3536.5±15.5	-49.2±0.3	-1154.8±6.3
	2	-205.5±3.7	-4443.6±15.7	3548.7±15.7	-50.2±0.3	-1150.6±6.3
	3	-210.7±4.7	-4426.5±16.1	3533.7±15.6	-50.5±0.3	-1154.0±5.9
	ortalama	-205.0	-4438.8	3540.0	-50.0	-1153.8
A53C	1	-229.5±4.0	-4081.3±31.5	3288.4±23.7	-50.3±0.3	-1072.6±11.7
	2	-237.8±4.3	-4227.2±15.8	3394.9±14.8	-51.8±0.3	-1121.7±8.1
	3	-228.7±1.2	-4469.0±15.4	3567.6±15.6	-52.4±0.2	-1182.5±6.1
	ortalama	-232.0	-4259.2	3417.0	-51.5	-1125.6
A53G	1	-209.9±4.0	-3380.7±86.5	2766.5±69.9	-45.4±0.5	-869.5±19.8
	2	-204.3±5.0	-2860.5±47.7	2403.1±38.2	-42.2±0.6	-703.9±14.7
	3	-196.2±4.2	-3779.8±53.2	3037.7±43.5	-45.2±0.6	-983.4±15.6
	ortalama	-203.5	-3340.3	2735.7	-44.3	-852.3



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

Son olarak her bir sistemin yaprak tabakaları arasındaki 0.4nm etkileşim mesafesi içinde birbiri ile temas halindeki atomların sayısını veren temas sayısı analizi yapılmış ve Şekil 5’te sergilenmiştir. Bu analizde elde edilen temas sayıları, sistemde bulunan her bir atom için ayrı ayrı elde edilmiş temas sayılarının toplamına karşılık gelmektedir. Temas analizi ile yapılan simülasyonlar boyunca yaprak tabakaları arasındaki konformasyonel kararlılığı dinamik olarak gözlemlemek mümkündür. Simülasyonların başlangıcında her bir sistemde yaprak tabakaları arasında  $\approx 7000$  atom teması bulunmaktadır. Elde edilen değerler incelendiğinde daha önceki analizlerden fibril bütünlüğünün bozulduğunu tespit ettiğimiz A53G mutasyonu için beklenildiği gibi yaprak tabakaları arasındaki temas sayısında ciddi değişken ve azalan değerler gözlemlenmektedir. A53G mutasyonlu fibril sisteminin yaprak tabakaları arası temas sayısında gözlemlenen bu düşüş  $\approx 253$ ns civarında  $\approx 3850$  ile en düşük değerine ulaşmaktadır. Öte yandan, diğer sistemler için elde edilen değerlerin birbirine yakın olduğu ve ayrıca simülasyon başlangıcındaki doğal temas sayısı değerlerini koruduğu söylenebilir.



Şekil 5. Yaprak tabakaları arasındaki temas halindeki atomların sayılarının simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi.

#### 4. Sonuç ve Yorum

Bu çalışmada PreNAC fibril sistemi ve onun 53. aminoasidinin mutasyonunu içeren A53C, A53E, A53G, A53T ve A53V isimli beş farklı fibril sistemi için karşılaştırmalı MD simülasyonları yapılmıştır. Yapılan simülasyonlarda bu mutasyonların ilgilenilen fibril sistem konformasyonlarının dinamik davranışları üzerine etkileri hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda elde edilen bulgulara göre kalıtsal mutasyonlu fibril sistemleri A53E, A53T ve A53V’nin vahşi tip fibril sistemine (WT) benzer davranışlar sergileyerek düzenli istif yapılarını koruduğu tespit edilmiştir. Bu da kalıtsal mutasyonlara, ilgili fibril formunda rastlanabileceğini dolayısıyla bu kalıtsal mutasyonlara sahip hastalara yönelik ilaç geliştirme çalışmaları için PreNAC mutasyon fibril formlarının hedef yapılar olarak ele alınabileceğinin açık göstergesidir. Öte

yandan ailesel mutasyon dışında ele alınan A53G fibril mutasyon sisteminde, Gly mutasyonun, fibril yapısının kararlılığını önemli ölçüde etkileyerek fibril sisteminin düzenli istif yapısını bozduğu ve hatta fibril bütünlüğünü dağıttığı gözlemlenmiştir. Diğer ele alınan mutasyon sistemi A53C için ise, Cys mutasyonun düzenli istif yapısını kararlı sistemlere kıyasla bir miktar bozduğu ancak bu bozulmanın fibril bütünlüğünü etkileyecek ölçüde olmadığı söylenebilir. Bunlara ilaveten MM-PBSA yaklaşımı kullanılarak elde edilen fibril sisteminin yapıları arası serbest bağlanma enerjisi analizine göre, yaprak tabakaları arası kararlılığın korunmasında olumlu katkıya sahip etkileşim tipleri arasında elektrostatik etkileşimlerin daha baskın etkileşim tipi olduğu söylenebilir. Çalışmamızın bu haliyle, PD ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için PreNAC ve benzeri fibril sistemlerini hedef alacak gelecekteki muhtemel ilaç tasarımı çalışmaları için anahtar bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

### **Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı**

Hakan ALICI: Araştırma, Orijinal Taslak Yazımı, Yazılım, İnceleme ve Düzenleme.  
Kadir DEMİR: Doğrulama, İnceleme ve Düzenleme, Denetim/Gözlem/Tavsiye.

### **Destek ve Teşekkür Beyanı**

Bu çalışmaya 2015-22794455-03 nolu Altyapı Projesi ile kaynak sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederiz.

### **Çatışma Beyanı**

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir çatışma beyanımız bulunmadığını bildiririz.

### **Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri**

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir etik kurul onayı ve/veya aydınlatılmış onam bilgileri beyanımız bulunmadığını bildiririz.

### **Kaynakça**

- 1 T. Lebouvier, T. Chaumette, S. Paillusson, C. Duyckaerts, S. Bruley des Varannes, M. Neunlist, and P. Derkinderen, "The second brain and parkinson's disease," *Eur. J. Neurosci.*, 30 (5), 735-741, 2009.
- 2 T. R. Mhyre, J. T. Boyd, R. W. Hamill, and K. A. Maguire-Zeiss, Parkinson's Disease. In: Harris J. (eds) Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease. Subcellular Biochemistry, vol 65, Springer, Dordrecht, pp. 2012, 389-455.
- 3 M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert, "A-synuclein in lewy bodies," *Nature*, 388 (6645), 839-840, 1997.
- 4 M. Goedert, R. Jakes, and M. G. Spillantini, "The synucleinopathies: Twenty years on," *J. Parkinson. Dis.*, 7 (s1), S51-S69, 2017.
- 5 M. Goedert, M. G. Spillantini, K. Del Tredici, and H. Braak, "100 years of lewy pathology." *Nat. Rev. Neurol.*, 9 (1), 13, 2013.
- 6 T. S. Ulmer, A. Bax, N. B. Cole, and R. L. Nussbaum, "Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein," *J. Biol. Chem.*, 280 (10), 9595-9603, 2005.
- 7 L. Xu, R. Nussinov, and B. Ma, "Coupling of the non-amyloid-component (nac) domain and the ktk(e/q)gv repeats stabilize the  $\alpha$ -synuclein fibrils," *Eur. J. Med. Chem.*, 121, 841-850, 2016.
- 8 J. A. Rodriguez, M. I. Ivanova, M. R. Sawaya, D. Cascio, F. E. Reyes, D. Shi, S. Sangwan, E. L. Guenther, L. M. Johnson, M. Zhang, L. Jiang, M. A. Arbing, B. L. Nannenga, J. Hattne, J. Whitelegge, A. S. Brewster, M. Messerschmidt, S. Boutet, N. K. Sauter, T. Gonen, and D. S. Eisenberg, "Structure of the toxic core of  $\alpha$ -synuclein from invisible crystals," *Nature*, 525 (7570), 486-490, 2015.
- 9 H. Han, P. H. Weinreb, and P. T. Lansbury, "The core alzheimer's peptide nac forms amyloid fibrils which seed and are seeded by  $\beta$ -amyloid: Is nac a common trigger or target in neurodegenerative disease?," *Chem. Biol.*, 2 (3), 163-169, 1995.

- 10 R. Guerrero-Ferreira, N. M. I. Taylor, A.-A. Arteni, P. Kumari, D. Mona, P. Ringler, M. Britschgi, M. E. Lauer, A. Makky, J. Verasdonck, R. Riek, R. Melki, B. H. Meier, A. Böckmann, L. Bousset, and H. Stahlberg, "Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cryo-electron microscopy," *eLife*, 8, e48907, 2019.
- 11 P. Pasanen, L. Myllykangas, M. Siitonen, A. Raunio, S. Kaakkola, J. Lyytinen, P. J. Tienari, M. Pöyhönen, and A. Paetau, "Novel  $\alpha$ -synuclein mutation a53e associated with atypical multiple system atrophy and parkinson's disease-type pathology," *Neurobiol. Aging*, 35 (9), 2180.e2181-2185, 2014.
- 12 M. H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe, and R. L. Nussbaum, "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with parkinson's disease," *Science*, 276 (5321), 2045-2047, 1997.
- 13 H. Yoshino, M. Hirano, A. J. Stoessl, Y. Imamichi, A. Ikeda, Y. Li, M. Funayama, I. Yamada, Y. Nakamura, V. Sossi, M. J. Farrer, K. Nishioka, and N. Hattori, "Homozygous alpha-synuclein p.A53v in familial parkinson's disease," *Neurobiol. Aging*, 57, 248.e247-248.e212, 2017.
- 14 W. L. DeLano, "Pymol: An open-source molecular graphics tool." *CCP4 Newsletter on protein crystallography*, 40 (1), 82-92, 2002. Available: <https://pymol.org/2/>
- 15 R. B. Best, X. Zhu, J. Shim, P. E. M. Lopes, J. Mittal, M. Feig, and A. D. MacKerell, "Optimization of the additive charmm all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and side-chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  dihedral angles," *J. Chem. Theory Comput.*, 8 (9), 3257-3273, 2012.
- 16 A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus, "All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins," *J. Phys. Chem. B*, 102 (18), 3586-3616, 1998.
- 17 W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water," *J. Chem. Phys.*, 79 (2), 926-935, 1983.
- 18 H. Alici, "Structural analyses and force fields comparison for nacore (68–78) and subnacore (69–77) fibril segments of parkinson's disease," *J. Mol. Model.*, 26 (6), 132, 2020.
- 19 H. Alici, "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, 2021
- 20 S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, and E. Lindahl, "Gromacs 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit," *Bioinformatics*, 29 (7), 845-854, 2013.
- 21 L. Verlet, "Computer "experiments" on classical fluids. Ii. Equilibrium correlation functions," *Phys. Rev.*, 165 (1), 201-214, 1968.
- 22 T. Darden, D. York, and L. Pedersen, "Particle mesh ewald: An n·log(n) method for ewald sums in large systems," *J. Chem. Phys.*, 98 (12), 10089-10092, 1993.
- 23 U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, "A smooth particle mesh ewald method," *J. Chem. Phys.*, 103 (19), 8577-8593, 1995.
- 24 G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, "Canonical sampling through velocity rescaling," *J. Chem. Phys.*, 126 (1), 014101, 2007.
- 25 M. Parrinello, and A. Rahman, "Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method," *J. Appl. Phys.*, 52 (12), 7182-7190, 1981.
- 26 R. Kumari, R. Kumar, and A. Lynn, "G\_mmpbsa--a gromacs tool for high-throughput mm-pbsa calculations," *J. Chem. Inf. Model.*, 54 (7), 1951-1962, 2014.
- 27 H. Alici, "In silico analysis: Structural insights about inter-protofilaments interactions for  $\alpha$ -synuclein (50–57) fibrils and its familial mutation," *Mol. Simulat.*, 46 (12), 867-878, 2020.
- 28 H. Luo, D.-F. Liang, M.-Y. Bao, R. Sun, Y.-Y. Li, J.-Z. Li, X. Wang, K.-M. Lu, and J.-K. Bao, "In silico identification of potential inhibitors targeting streptococcus mutans sortase a," *Int. J. Oral Sci.*, 9 (1), 53-62, 2017.
- 29 W. M. Berhanu, and U. H. E. Hansmann, "Side-chain hydrophobicity and the stability of a $\beta$ <sub>16–22</sub> aggregates," *Protein Sci.*, 21 (12), 1837-1848, 2012.