



İnsan Kemokin Reseptörü CXCR3'ün N-Terminal Bölgesinin (1-53) Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemi ile Modellenmesi ve Yapısal Analizi

Modelling and Structural Analysis of the N-Terminal Region of Human Chemokine Receptor CXCR3 (1-53) by Molecular Dynamic Simulation Method

Hakan Alıcı^{1*} , Volkan Karacaoğlan² , Kadir Demir¹ 

¹Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Zonguldak, Türkiye,

²Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

Öz

G protein eşlikli reseptör (GPER) ailesinden olan Kemokin reseptörlerinin birçok ilaç için hedef bölgesi teşkil etme potansiyelleri ve farklı hücre tiplerini aktive ederek çeşitli hastalıkların oluşmasında önemli roller oynadıkları bilinmektedir. Bu reseptörlerden biri olan CXCR3 kemokin reseptörünün kristalografik yapısının elde edilmiş olmaması CXCR3-ligand etkileşimlerinin açıklanmasını ve bu reseptöre yönelik ilaçların geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu reseptörlerin özellikle hücre dışında bulunan N-terminal bölgesinin, bağlanma afinitesi ve reseptör seçiciliğinin belirlenmesinin yanı sıra sinyal iletiminin düzenlenmesinde de kritik roller oynadığını göstermiştir. Bu bölgenin doğal ligandlarıyla etkileşimi hakkında birçok çalışma olmasına rağmen, oldukça esnek bir yapıya sahip olan CXCR3'ün N-terminal bölgesinin katlanma mekanizması ve yapısal özellikleri henüz tam olarak analiz edilmemiştir. Bu nedenle, farklı konformasyonlar gösterebilen bu esnek yapının dinamik davranışlarını incelemek için bölgenin aminoasit sekanslarından yola çıkarak bilgisayarlı yöntemler ile modellenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla çalışmamızda Moleküler Dinamik simülasyon yöntemiyle CXCR3'ün N-terminal bölgesinin aminoasit kompozisyonu modellenerek yapının 300 K sıcaklıkta sulu çözelti içindeki kararlılığı ve dinamik davranışları incelenmiştir. Sonuç olarak modellenen yapının iyi bir şekilde katlanarak kompakt bir form oluşturduğu ve bu yapısal oluşumda hidrojen bağlarının önemli rol oynadığı görülmüştür. Elde edilen bulguların gelecekteki muhtemel ilaç tasarım ve hedefleme çalışmalarına rehberlik etmesi beklenmektedir.


Anahtar Kelimeler: CXCR3, G protein eşlikli reseptör, Kemokin reseptörü, Moleküler dinamik, Simülasyon

Abstract


Chemokine receptors are one of the members of the G protein-coupled receptor (GPCR) family, and these receptors are target regions for many drugs. It is known that these receptors play an important role in the formation and treatment of various diseases by activating different types of cell. The lack of crystallographic structure of the CXCR3 chemokine receptor from these receptors complicates the explanation of CXCR3-ligand interactions and the development of drugs for this receptor. In addition, studies have shown that the particularly extracellular N-terminal domain of these receptors play critical roles in determining binding affinity, receptor selectivity and regulation of signaling activities. Although there are many studies on the interaction of this region with its natural ligands, the folding mechanism and structural properties of the N-terminal region of CXCR3, which has a highly flexible structure, have not yet been analyzed. For this reason, in order to investigate the dynamic behaviors of this region which can show different conformations, it is very important to model this region by using computerized methods from the amino acid sequences. For this purpose, we investigated the amino acid composition of the N-terminal region of CXCR3 by computationally modeled with the MD simulation technique and researched its stability and dynamic behavior at 300 K temperature in solution. As a result, the hydrogen bonds play an important role in the fact that the modeled structure folds well in a compact form. The findings are expected to guide future possible drug design and targeting studies.

Keywords: CXCR3, G protein coupled receptor, Chemokine receptor, Molecular dynamic, Simulation

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: hakanalici@beun.edu.tr

Hakan Alıcı  orcid.org/0000-0001-5105-8331

Volkan Karacaoğlan  orcid.org/0000-0002-1953-7807

Kadir Demir  orcid.org/0000-0001-7312-3878

1. Giriş

G protein eşikli reseptörler (GPER) en genel anlamda hücre içindeki hedef enzimlere uyarı iletiminden sorumlu proteinlerdir (Baykal vd. 1996). Piyasadaki ilaç geliştirme çalışmalarının yaklaşık %40' ı bu reseptörleri hedef alarak gerçekleştirilmektedir. Bilindiği gibi karakteristik olarak bir GPER, doğal ligandların bağlanması önemli rol oynayan bir hücre dışı N-terminal bölgesi, bir sitoplazmik C-terminal bölgesi, üç hücre dışı ilmek ve biyolojik aktivitelerinin gerçekleştiği yedi trans-membran heliksten oluşmaktadır (Horuk 2001). Hedef enzimlere sinyalin iletilmesi ve hücrel cevapların oluşması aşamalarında birbirini takip eden ardışık reaksiyonların başlayabilmesi için GPER' lerin hücre dışı bölgelerinin bir ligand ile etkileşime girerek uyarılmaları gerekmektedir. GPER lerin bir grubu kemokin reseptörleri olup bu reseptörlerin doğal ligandı kemokinlerdir. Literatürde kemokin reseptörleri üzerine yapılan çalışmalar, özellikle hücre zarı dışında kalan N-terminal bölgesinin, bağlanma afinitesi, reseptör seçiciliğinin belirlenmesi ve sinyal iletimi gibi aktivitelerde kritik roller oynadığını göstermiştir (Blanpain vd. 1999, Gozansky vd. 2005, Prado vd. 2007, Rajagopalan ve Rajarathnam 2006, Szpakowska vd. 2012, Veldkamp vd. 2008, Veldkamp vd. 2006).

İlaç endüstrisinde GPER' leri hedef alan birçok ilacın bulunmasının sebebi; bu proteinlerin birçoğunun spektral yöntemlerle moleküler yapısının büyük ölçüde ortaya çıkarılmasıdır (Higashijima vd. 1991, Noel vd. 1993). Bu yapılar kullanılarak hem ilaç reseptör etkileşimi açıklanabilmekte hem de ilaç hedef bölgeleri bulunabilmektedir. Bilgimiz dâhilinde bulunan 15 adet kemokin reseptöründen biri olan CXCR3 reseptörünün ise kristal yapısı henüz çözümlenmemiş olup, bu durum CXCR3-ligand etkileşimlerinin açıklanmasını ve bu reseptöre yönelik ilaçların geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca CXCR3 kemokin reseptörünün kanser, karaciğer fibrozu, melanom, meme ve prostat kansinomları, nöroblastoma, ateroskleroz, multipl skleroz, pulmoner fibrozis, tip-1 diyabet, otoimmün miyastenia gravis, nefrotoksik nefrit, akut kardiyak allogreft reddi ve çölyak gibi çeşitli hastalıkların oluşmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Hancock vd. 2000, Lammers vd. 2008, Sun vd. 2010).

Yukarıda bahsedilen tüm bu özellikler ve öneminden dolayı bu çalışmada CXCR3 kemokin reseptörünün N-terminal bölgesi üzerine odaklanılmıştır. Lasagni ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada CXCR3' ün, doğal ligandlarına hücre zarı dışında kalan N-terminal bölgesi

ve diğer üç loop bölgesinden bağlandıkları gösterilmiştir. Ayrıca, bu hücre zarı dışında kalan alanların CXCR3' ün reseptör fonksiyonuna katkılarının araştırılmasının önemi ortaya konulmuştur (Lasagni vd. 2003). Son zamanlarda yine CXCR3 reseptör-ligand sistemleri üzerine yapılan bir çalışmada, CXCR3' ün doğal ligandlarıyla olan kompleksleri modellenerek araştırılmış ve bu komplekslerin kararlılığı, ligandlar ile CXCR3'ün N-terminal bölgesi arasındaki aromatik ve elektrostatik etkileşimlerle koruduğu gösterilmiştir (Trotta vd. 2009). Ayrıca CXCR3' ün üç ligand kompleksi ile yapılan bir başka çalışmada ise ligandlar ile etkileşime giren CXCR3' ün yapısal bölgeleri incelenmiş ve iki ligandın CXCR3' ün N-terminal bölgesiyle bağlanabildiğini gösterilmiştir (Palladino vd. 2012). Doğal ligandlar ile etkileşimleri ve yapısal özellikleri üzerinde yapılan tüm bu çalışmalara rağmen, CXCR3' ün N-terminal bölgesinin katlanma mekanizması henüz tam olarak analiz edilememiştir. Bu durum bu bölgenin çok hareketli ve oldukça esnek doğasından kaynaklanmaktadır (Szpakowska vd. 2012). Bu türden esnek yapıların konformasyonlarını elde etmek ve bazı etkileşim özelliklerini deneylerle izlemek oldukça zor olduğundan, bilgisayar hesaplamalı yöntemler ile bu tip yapıların modellenmesi ve etkileşimlerinin incelenmesi daha uygun bir teknik olarak görülmektedir. Bu bağlamda, moleküler dinamik (MD) simülasyonu, protein konformasyonu ve katlanma özelliklerinin ayrıntılarını anlamak için en çok tercih edilen simülasyon tekniklerinden biridir (Demir vd. 2018, Kılıç ve Demir 2017). MD simülasyonu ayrıca, yapı kararlılığı ve hidrofobite bilgisine dayanan ilaçları ve kompleks yapıları tasarlamak için de gelecek vaat eden bir araç olarak kabul edilmektedir.

Literatürde, CXCR3 reseptörün N-terminal bölgesinde bulunan ilk 48 aminoasitin modellemesine yönelik bir çalışmada, öncelikle yapının hücre zarı yüzeyine yakın bir kısmı (daha az esnek olan kısmı) homoloji yöntemiyle modellenmiştir. Yapının geri kalan kısmındaki aminoasit dizilimi ise uzatılmış (sırasıyla uç uca eklenmiş, extended) yapıdan başlayarak simülasyon yöntemiyle modellenerek bu iki bilgiyle CXCR3 (1-48) sekansının yapısı ortaya konulmuş ve özellikleri araştırılmaya çalışılmıştır (Raucci vd. 2014). Bizim yaptığımız bu çalışmada ise CXCR3'ün N-terminal bölgesinin aminoasit sekansının tamamına karşılık gelen 53 aminoasit extended yapıdan başlanarak modellenmeye çalışılmıştır. İncelenen aminoasit diziliminin tek harfli kodlaması "M-V-L-E-V-S-D-H-Q-V-L-N-D-A-E-V-A-A-L-L-E-N-F-S-S-S-Y-D-Y-G-E-N-E-S-D-S-C-C-T-S-P-P-C-P-Q-D-F-S-L-N-F-D-R" şeklindedir. Çalışmamızda, ilgili bölgenin modellenmesi

esnasında, peptidin yapısal özelliklerini ve katlanma mekanizmasını doğru bir şekilde ortaya koyabilmek için MD simülasyonları iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki vakum ortamında benzetişimli tavlama (SA; Simulated Annealing) yöntemidir. SA algoritması katı cisimlerin soğurken kazandıkları mükemmel şekilde atomik dizilişlerini örnek alarak tasarlanmıştır. Malzemelerin atomları yüksek sıcaklıklarda yüksek enerji seviyelerindedir ve düzgün dizilimler için daha fazla hareket serbestliğine sahiptirler. Sıcaklık düştüğünde ise atomik enerji azalır ve düzgün yapı bir kristal sağlandığında sistem minimum enerjiye sahip olur. Bu özelliği sayesinde büyük oranda yerel minimumlardan kurtulabilme kabiliyetine sahip olan SA algoritması (Kirkpatrick vd. 1983), özellikle extended yapıdan başlanılan simülasyonlarda yapının doğru örneklenmesi bakımından çok elverişli bir yöntemdir (Kılıç vd. 2017). Çalışmamızda bu ilk aşamada SA yöntemiyle elde edilen yapı ikinci adımın başlangıç yapısı olarak kullanılmıştır. İkinci aşamada ise proteinlerin fizyolojik ortamına uygun olacak şekilde çözelti ortamında 300 K sıcaklıkta MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

2. Gereç ve Yöntem

Bütün MD simülasyonları OPLS-AA kuvvet alanı (Kaminski vd. 2001) varlığında GROMACS moleküler modelleme paketi 4.6.5 versiyonu (Van Der Spoel vd. 2005) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PyMOL moleküler modelleme programıyla aminoasitler sırasıyla uçuca eklenmiş ve CXCR3 kemokin reseptörünün N-terminal bölgesinin extended 1-53 sekansı oluşturulmuştur (DeLano 2002). Peptidin katlanma ve yapısal özelliklerini ortaya koyabilmek için gerçekleştirdiğimiz iki aşamalı MD simülasyonlardan ilki vakum ortamında SA yöntemi kullanılarak, ikincisi ise ilk aşamadan elde edilen yapı kullanılarak fizyolojik ortama uygun şekilde çözelti ortamında 300 K sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Vakum ortamında gerçekleştirilen MD simülasyonun ilk adımında uçları bağlanan extended yapının yakın van der Waals temaslarını kaldırmak ve uygun olmayan geometrileri yok etmek amacıyla sistemin enerjisi iki aşamada minimize edilmiştir. Bu enerji minimizasyon aşamaları sırasıyla 50 kJ mol⁻¹nm⁻¹ enerji gradiyenti elde etmek için önce "Steepest Descent" ardından "Conjuge Gradient" metodları ile 2000 zaman adımı kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra yine vakum ortamında, moleküler dinamikte konformasyonel örneklemeyi geliştirmek için peptid yüksek sıcaklığa (1000K) ısıtılmış ve daha sonra 40 ns lik simülasyon zaman

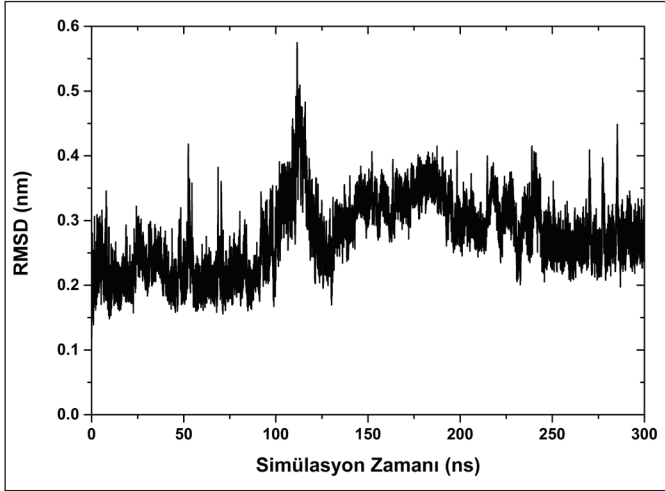
periyodunda SA yöntemi ile yavaşça oda sıcaklığına (300K) soğutulmuştur.

Bu adımdan sonra vakum ortamından elde edilen son yapı (frame) peptidin çözelti ortamındaki simülasyonu için başlangıç yapısı olarak seçilerek ikinci aşamaya geçilmiştir. Seçilen yapı bu aşamada ilk olarak 14x14x14 nm boyutlarında bir simülasyon kutusunun merkezine yerleştirilmiştir. Bu yerleştirmede peptidin herhangi bir atomu ile simülasyon kutusu arasındaki minimum uzaklık 1 nm olarak alınmıştır. Daha sonra simülasyon kutusunun içerisine SPC216 su modeli kullanılarak 9200 adet su molekülü eklenmiştir. Ayrıca, dengeleme ve ürün simülasyonlarında ihtiyaç duyulan PME teorisi gereğince yapının nötralle olması için sisteme 10 tane Na⁺ iyonu "genion" programıyla eklenmiştir. Nötralle olmuş çözelti içerisindeki bu sistemin enerjisi, vakum ortamındakine benzer şekilde iki aşamada minimize edilmiştir. Daha sonra enerjisi minimize olmuş peptid, ilgilenilen sıcaklıklar için 2 adımda dengeleme simülasyonlarına tabi tutulmuştur. Bilindiği gibi, bu simülasyonlar sistemlerin faz uzayı üzerinde istenilen yörüngelere yerleşmesi için yapılmaktadır. Dengeleme simülasyonlarının ilk aşaması NVT kümede 1 ns simülasyon süresince gerçekleştirilmiş olup sıcaklığı sabit tutmak için v-rescale termostatı kullanılmış ve çiftlenim parametresi 0.1 ps olarak seçilmiştir (Bussi vd. 2007). ikinci aşaması ise NPT kümede 1 ns simülasyon süresince gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada sıcaklığı sabit tutmak için v-rescale termostatı (Bussi vd. 2007) basıncı sabit tutmak için Parinello–Rahman barostatı (Parrinello ve Rahman 1981) kullanılmış ve çiftlenim parametreleri sırasıyla 0.1 ps ve 2 ps olarak seçilmiştir. En son aşamada ise dengelenmiş sistemin ürün simülasyonları ise 300 K sıcaklıkta NPT kümede 300 ns simülasyon zamanı uzunluğunda gerçekleştirilmiştir. Ürün simülasyonları süresince sıcaklık v-rescale termostatı ve 0.1 ps çiftlenim sabiti ile basınç ise Parinello –Rahman barostatı ve 2 ns çiftlenim sabiti ile sabit tutulmuştur. Dengeleme ve ürün simülasyon aşamalarında uzun erimli (long-range) etkileşimleri betimlemek için Particle Mesh Ewald (PME) (Darden vd. 1993) metodu kullanılmış ve kesim mesafeleri (cut-off), coulomb etkileşmelerinde 0.9 nm ve van der Waals etkileşmelerinde ise 1.0 nm olarak seçilmiştir. Ayrıca, Lincs (Hess vd. 1997) algoritması kullanılarak yapıdaki kovalent bağlar sınırlandırılmıştır.

3. Elde Edilen Bulgular

Bu çalışma kapsamında ilgilenilen insan kemokin reseptörü CXCR3'ün N- terminal bölgesine karşılık gelen ilk 53 ami-

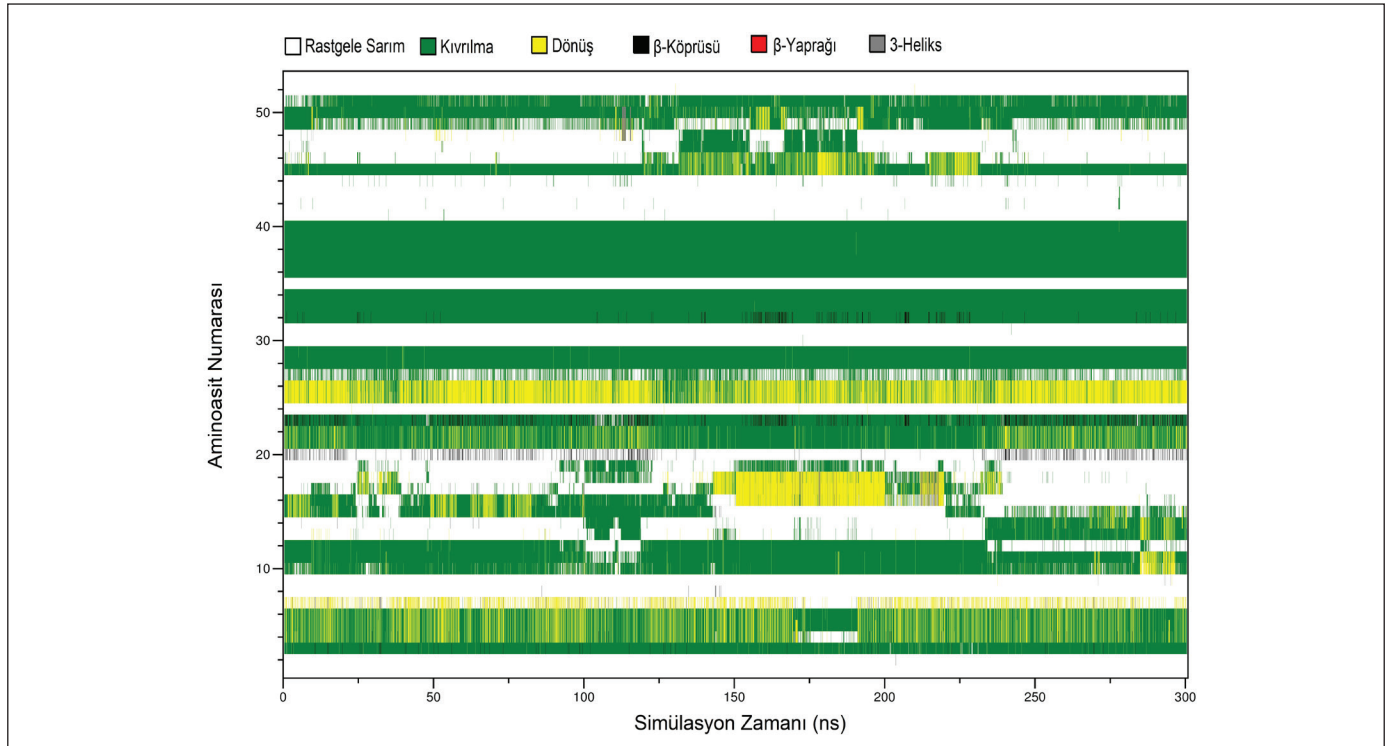
noasit sekansının oluşturduğu peptid modellenerek, sistemin yapısal ve dinamik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak peptidin simülasyon boyunca kare ortalama karekök yer değiştirme (RMSD, root mean square deviation) değerleri incelenmiştir. Bu analiz peptidin başlangıç yapısındaki konumlarından simülasyon boyunca ne kadar uzaklaştığı hakkında bilgi veren bir analiz aracıdır. Yani bu değerlere bakılarak yapı kararlılığı hakkında bazı



Şekil 1. RMSD değerlerinin simülasyon zamanına bağlı olarak değişimi.

ipuçları elde edilebilir. Peptidin simülasyon zamanına bağlı olarak RMSD değerlerindeki değişim Şekil 1'de verilmiştir. RMSD değerleri incelendiğinde ortalama değerin yaklaşık 0.28 nm civarında olduğu ve peptidin yaklaşık 240 ns den sonra daha kararlı bir yapıya dönüştüğü görülmektedir. Bunun yanında 0-100 ns, 100-240 ns ve 240-300 ns aralıklarında görülen farklı üç tip dalgalanmaların, aminoasit zincirlerinin ikincil yapılarındaki köklü değişimlerden kaynaklandığı söylenebilir. CXCR3'ün N-terminal bölgesinin bilinen esnek doğası göz önüne alındığında, RMSD değerlerinde bu tip dalgalanmaların gözlenmesinin doğal olduğu ve simülasyon boyunca yapının 3 farklı konformasyon sergilediği düşünülebilir. Bundan dolayı peptidin kararlılığı hakkında daha fazla bilgi sahibi olabilmek için simülasyonlar boyunca ikincil yapılarındaki değişimler DSSP (the dictionary of protein secondary structure) (Kabsch ve Sander 1983) analiz yöntemiyle araştırılmış ve elde edilen bilgiler Şekil 2'de sunulmuştur.

Peptid sekansının ikincil yapı tiplerinin saptanması, peptidin konformasyonel ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Şekildeki düşey eksen aminoasit numarasına karşılık gelmekte iken yatay eksen ise simülasyon zamanını göstermektedir. Şekil 2'de görüldüğü gibi, peptid sekansını oluşturan aminoasitler simülasyon süresince genelde kıvrılma (bend), dönüş (turn) ve rastgele



Şekil 2. MD simülasyon boyunca DSSP analizi.

Çizelge 1. İkincil yapı içeriklerinin ortalama popülasyonları.

Rastgele Sarım (%)	Kıvrılma (%)	Dönüş (%)	β -Köprüsü (%)	β -yaprağı (%)	3-heliks (%)
45.0	45.6	8.6	0.6	0.0	0.2

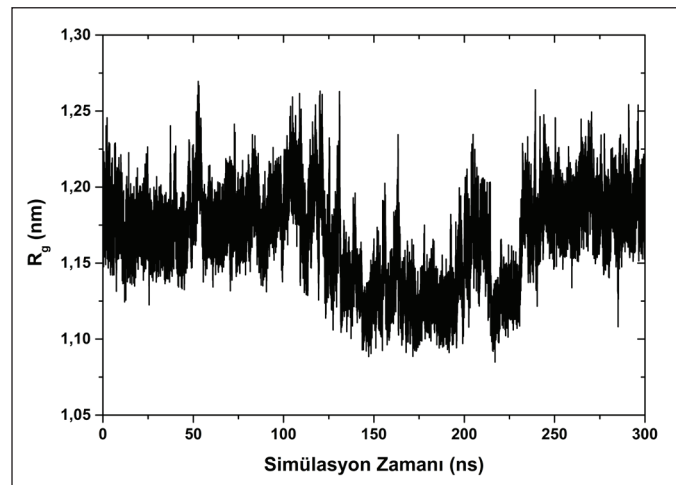
bobin (coil) ikincil yapı tiplerini göstermişlerdir. Ayrıca ilk ve son aminoasitler tüm simülasyon süresi boyunca rasgele bobin ikincil yapı tipine sahiptir. Bu durum, bu peptidin terminal aminoasitlerinin zwitter iyonik formda olması gerçeğinden kaynaklanabilir. Tüm bunlara ilaveten, Leu20, Phe23 ve Asn32 aminoasitlerinin az miktarda da olsa β -Köprüsü (β -Bridge) yapısına sahip olduğu da gözlemlenmektedir.

DSSP analizinden elde edilen veriler ışığında peptidin 300 ns ürün simülasyonu boyunca sahip olduğu ikincil yapı içeriklerinin ortalama popülasyon oranları hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 1' de sergilenmiştir. Çizelge incelendiğinde kıvrılma ve rastgele sarım ikincil yapı tiplerinin sırasıyla yaklaşık %45.6 ve %45.0 ortalama popülasyon oranı ile en sık rastlanılan ikincil yapı tipi olduğu görülmektedir. Dönüş ikincil yapı tiplerinin oranı yaklaşık %8.6 civarında iken, az miktarda β -Köprüsü (%0.6) ve 3-heliks (%0.2) yapıları da gözlenmiştir

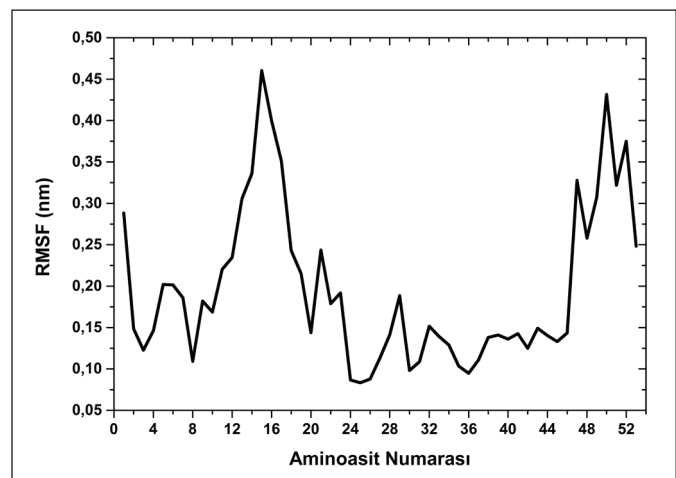
Daha sonra ise kararlı bir konformasyona dönüştüğünü düşündüğümüz peptidin kompaktlığı hakkında bilgi edinebilmek için peptidin simülasyon zamanına bağlı olarak jirasyon yarıçapı (R_g , radius of gyration) değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 3'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde jirasyon yarıçapı için elde edilen yaklaşık 1,17 nm lik küçük değer, peptidin kompakt bir halde bulunduğu göstergesidir. RMSD sonuçlarında gözlenen simülasyon zaman aralıklarındaki farklı 3 tip dalgalanma burada da kendini göstermektedir. Bu sonuçlar tamamen extended yapıdan başlayarak sürdürülen simülasyon çalışmamız sonucunda, sistemin katlanarak kararlı kompakt bir yapı haline dönüştüğünü ve dolayısıyla izlediğimiz simülasyon prosedürünün doğru olduğunu işaret etmektedir.

Katlanarak kompakt ve kararlı bir konformasyona sahip olduğunu düşündüğümüz peptidin her bir aminoasidinin simülasyon boyunca konumlarındaki değişimlerin ortalama bir ifadesi olarak kare ortalama karekök dalgalanma (RMSF, root mean square fluctuations) değerleri incelenmiş ve elde edilen değerler Şekil 4'te gösterilmiştir. Bu hesaplamalarda referans yapısı olarak ürün simülasyonunun başlangıç yapısı alınmıştır. Peptidin uç bölgelerindeki aminoasitlerin sahip olduğu değerlerin yüksek çıkması bu bölgelerin peptidin diğer bölgelere göre daha esnek doğasından

dolayı beklenen bir sonuçtur. Ayrıca en yüksek değer Glu15 negatif yüklü aminoasidinde ~0.46 nm olarak gözlemlenmiştir. Gözlemlenen diğer iki yüksek pik değerine sahip aminoasitler ise sırasıyla ~0.43 nm ile Asn50 ve ~0.32 nm ile Phe47 dir. RMSF değerlerinde rastlanılan bu yüksek değerler genellikle peptid sekansının bu bölgesinin daha fazla çözeltiyeye maruz kalmasıyla açıklanabilmektedir. Bu amaç doğrultusunda simülasyon boyunca peptidin her bir aminoasidinin çözeltiyeye maruz kalan yüzey alanı (SASA, solvent accessible surface area) analizi yapılmış ve analiz sonuçları Şekil 5' de sergilenmiştir. Bu grafik incelendiğinde çok fazla pikle karşılaşmaktadır ve bu piklerden 3 tanesi RMSF değerleri fazla olan Glu15, Phe47 ve Asn50



Şekil 3. Simülasyon boyunca R_g değerlerindeki değişimler.



Şekil 4. Simülasyon boyunca her bir aminoasidin RMSF değerleri.

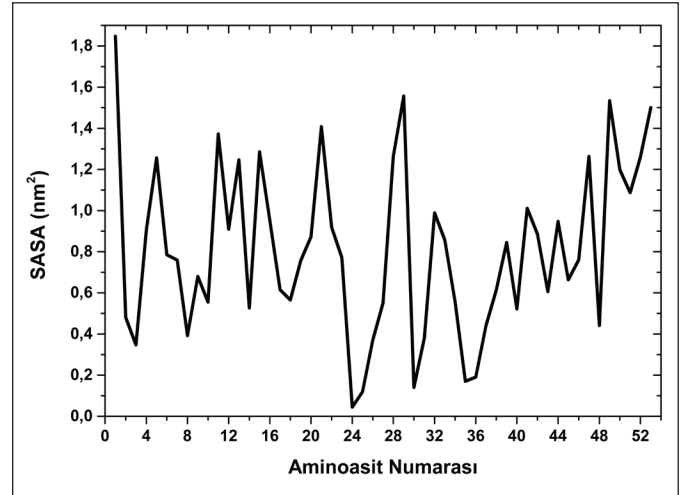
aminoasitlerine aittir. Pik değerlerine sahip olan diğer aminoasitler Val5, Leu11, Asp13, Glu21, Tyr29 ve Leu49 olarak gözlemlenmektedir. En fazla çözeltiliye maruz kalan yüzey alanına sahip aminoasitler ise $\sim 1.56 \text{ nm}^2$ ile Tyr29 ve $\sim 1.53 \text{ nm}^2$ ile Leu49'tır.

Şu ana kadar yapılan analizler ile iyi bir şekilde katlanarak kararlı ve kompakt bir form aldığını gösterdiğimiz peptidin, katlanmasında önemli rol oynadığını düşünülen hidrojen bağlarının sayısı araştırılmış ve bunların simülasyon zamanına göre değişimi Şekil 6' da verilmiştir. Bu hesaplamalarda alıcı ve verici atom arasındaki kesim açısı 30.0° ve mesafesi 0.35 nm olarak seçilmiştir. Hesaplamalarda peptid-peptid (P-P), ana zincir-ana zincir (A-A), ana zincir-yan zincir (A-Y) ve yan zincir-yan zincir (Y-Y) arasındaki hidrojen bağ sayılarının simülasyon boyunca değişimi incelenmiştir. Şekilden görüldüğü gibi peptidin toplam hidrojen bağ sayısını ifade eden P-P etkileşimi sayısı simülasyon boyunca ~ 30 adet hidrojen bağıdır. Peptidin katlanmasında önemli rol oynayan bu etkileşimlerin büyük çoğunluğunun ana zincir atomlarının kendi aralarında yaptığı A-A hidrojen bağlarından kaynaklandığı görülmektedir. En az hidrojen bağı ise A-Y atomları arasında meydana gelmektedir. Bu dağılımı daha net gözlemleyebilmek için hidrojen bağlarının yüzdesel dağılımı Şekil 7' de sergilenmiştir. Buna göre peptidin katlanmasında önemli rol oynayan toplam hidrojen bağ sayısına en fazla katkıyı %51.5 ile A-A arasındaki hidrojen bağları verirken, bu değeri %38 ile Y-Y arasındaki hidrojen bağları takip etmektedir. %10.5 ile en az katkı ise A-Y arasındaki hidrojen bağlarından geldiği açıkça görülmektedir.

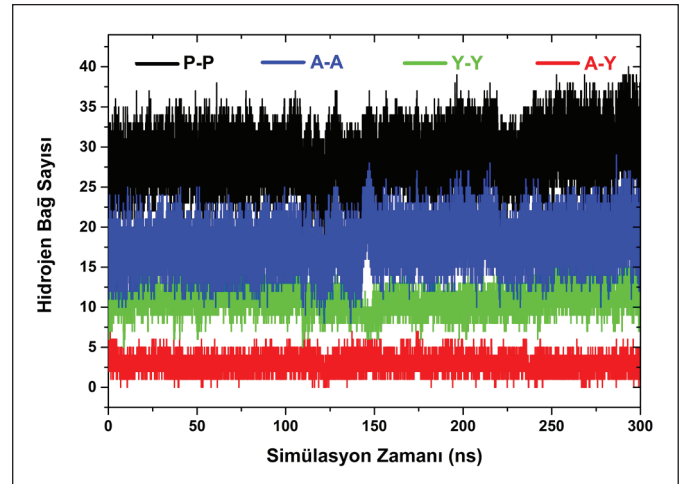
Protein yapılarının ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ve katlanma mekanizmaların ortaya konulmasında yukarıda kullanılan yaklaşımların yanı sıra, yapıların katlanması ve kararlılığı hakkındaki bazı bilgiler, sistemlerin serbest enerjisi ile de ortaya çıkarılabilmektedir. Yüzlerce bağ içeren protein yapıları teorik olarak çok sayıda konformasyona sahiptir, ancak biyolojik olarak bu konformasyonlardan birkaç tanesi baskındır. En düşük Gibbs serbest enerjili konformasyonlar termodinamik olarak en kararlı olanıdır (Bilsel 2009). Bir sistemin serbest enerji yüzeyleri, Denklem (1)'de verilen sistemin Gibbs enerjisindeki değişimle elde edilebilir.

$$\Delta G(R) = -k_B T [\ln P(R) - \ln P_{mak}] \quad (1)$$

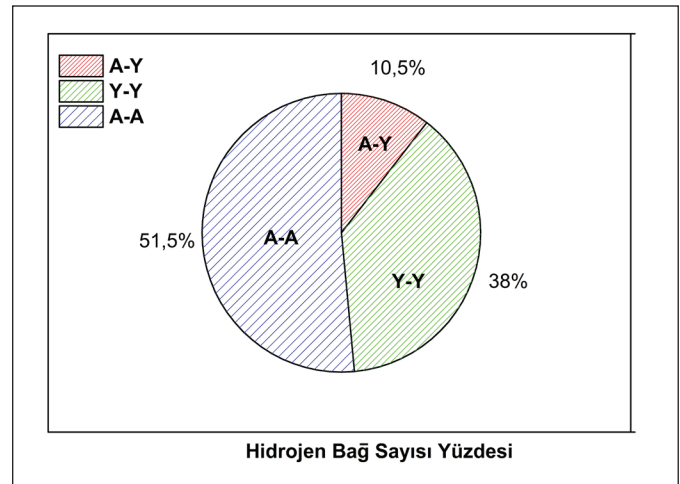
Burada k_B Boltzman sabiti, T sıcaklık, P "R" reaksiyon koordinatlarının olasılık dağılımı ve P_{mak} ise $\Delta G=0$ yapacak şekilde seçilen moleküler sistemin maksimum olasılık dağılımıdır.



Şekil 5. Simülasyon boyunca her bir aminoasidin SASA değerleri.

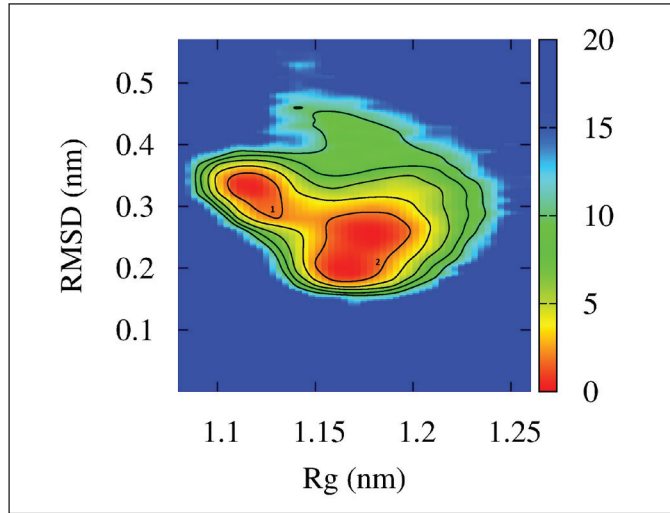


Şekil 6. Simülasyon boyunca hidrojen bağ sayılarındaki değişim.

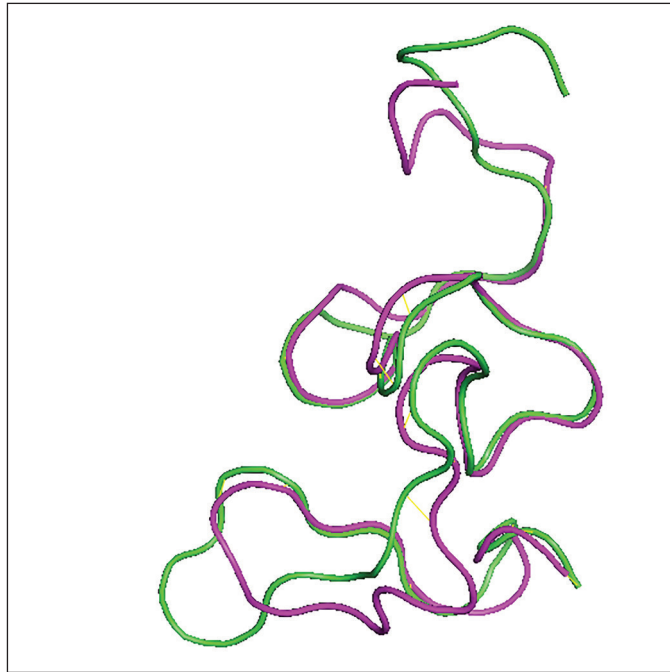


Şekil 7. Hidrojen bağ sayılarının yüzdesel dağılımı.

Sistemin en kararlı katlanmış yapı popülasyonlarını elde edebilmek için literatürdeki popüler reaksiyon koordinat seçimlerine uygun olacak şekilde, sistemin RMSD ve R_g reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri Şekil 8'de sergilenmiştir. Şekil en olası konformasyonların 2 farklı bölgede yoğunlaştığını göstermektedir. Bunlardan "1" nolu bölgede R_g değerleri ~1.10-1.13 nm ve RMSD değerleri ~0.29-0.35 nm civarında yer alırken, "2" nolu bölgede ise



Şekil 8: RMSD ve R_g reaksiyon koordinatlarına göre serbest enerji yüzeyleri.



Şekil 9. En düşük serbest enerji yüzeylerine karşılık gelen bölgelerin konformasyonuna örnekler. Renklendirme: pembe; "1" nolu, yeşil; "2" nolu enerji yüzeyi bölgesi için.

R_g değerleri ~1.15-1.20 nm ve RMSD değerleri ~0.18-0.28 nm aralığına yerleşmiştir. "1" nolu bölge değerleri yaklaşık 150 ile 200 ns simülasyon zaman aralığına karşılık gelen konformasyonları içerirken, "2" nolu bölge 240-300 ns simülasyon zaman aralığındaki konformasyonları genel olarak kapsamaktadır. Bu bölgelere karşılık gelen konformasyonlara birer örnek Şekil 9'da sergilenmiştir. Şekilden de görüleceği üzere en düşük enerji değerlerine sahip bölgelerin olası konformasyonlarının benzer üç boyutlu yapıya sahip olması, simülasyon sonucunda modellediğimiz yapının iyi bir şekilde katlanarak kararlı ve kompakt bir form aldığına göstergesidir.

4. Sonuçlar ve Öneriler

Bu çalışmada CXCR3 insan kemokin reseptörünün N-terminal bölgesinin (1-53) tamamını içeren aminoasit sekansının MD yöntemleri ile modellenmesi ve bu peptidin yapısal ve katlanma özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Hücre zarı dışında yüzeye yakın olan bu esnek yapı için elde ettiğimiz RMSD ve R_g değerleri simülasyon boyunca yapının kabaca 3 farklı kararlı konformasyona sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile Raucci ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan ve bu bölgenin aminoasit sekansının sadece bir kısmını içeren (1-48) çalışma sonuçları karşılaştırıldığında, her iki çalışmada da elde edilen R_g davranışlarının benzer olduğu görülmektedir. Bu uyumlu sonuçlar, her iki çalışma da yapıların katlanarak kompakt bir hal aldığına göstermenin yanı sıra, çalışmamızda uyguladığımız simülasyon prosedürünün ve kullanılan yöntemlerin doğruluğunu ortaya koymuştur. Peptidin kompakt halinin korunması ve yapının kararlılığının sürdürülmesinde önemli rol oynayan toplam hidrojen bağ sayılarının ortalamaları karşılaştırıldığında ise bizim çalışmamızdaki 53 aminoasitli sekansın ~30 adet, Raucci ve arkadaşlarının 48 aminoasitli çalışmasının ise ~27 adet bağa sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar oldukça birbirine yakın olmakla beraber çalışmamızda elde edilen daha yüksek sonuç, ele aldığımız yapının simülasyon boyunca hidrojen bağlarıyla daha kararlı bir konformasyonel yapıya sahip olduğunu gösterebilir. Ayrıca her iki çalışma için etkileşim tipine göre bu hidrojen bağlarının oransal kıyaslaması Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde A-A atomları arasında kurulan hidrojen bağ sayılarının yaklaşık birbirine eşit olduğu gözlemlenmektedir. Burada dikkat çekici husus 53 aminoasitli bizim çalışmamızdaki Y-Y hidrojen bağları %38 ve A-Y hidrojen bağları %10.5 iken, Raucci ve arkadaşları tarafından yapılan 48 aminoasitli çalışmada bu durum tersine dönerek Y-Y hidrojen bağları %8.0 ve A-Y hidrojen bağları %36 olarak

Çizelge 2 Hidrojen bağ yüzdelерinin kıyaslanması.

Aminoasit Sekansı	A-A (%)	A-Y (%)	Y-Y (%)
(1-53)	51.5	10.5	38.0
(1-48)*	56.0	36.0	8.0

*Raucci ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadan alınan değerler (Raucci vd. 2014).

gözlemlenmiş olmasıdır. Bu da 1-53 sekansının katlanma mekanizmasında yan zincir etkileşmelerinin, 1-48 sekansına göre daha fazla rol oynadığını göstermektedir.

Ayrıca peptidin en olası kararlı popülasyonlarının bir ölçüsü olarak serbest enerji yüzeylerini kullanarak elde ettiğimiz konformasyonlar incelendiğinde, en kararlı konformasyonların birbirine çok benzer iki ayrı konformasyona sahip olduğu görülmektedir. Bu da çalışmamızda modellenen yapının iyi bir şekilde katlanarak benzer kararlı konformasyonlar oluşturduğunun göstergesidir.

Çalışmamızda MD simülasyon yöntemleri ile modellenen 53 aminoasite sahip CXCR3 insan kemokin reseptörünün N-terminal bölgesinin, ileriki çalışmalarda doğal ve sentetik ligandlar ile etkileşim özelliklerinin araştırılarak ortaya konulması ve bu sayede muhtemel ilaç hedefleme çalışmalarına rehberlik etmesi beklenmektedir.

5. Teşekkür

Bu çalışmaya 2015-22794455-03 nolu Altyapı Projesi, 2018-YKD-22794455-02 ve 2018-YKD-74509460-01 nolu Uluslararası Toplantı Destek Projeleri ile maddi kaynak sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederiz.

6. Kaynaklar

- Baykal, Y., Özet, G., Karaayvaz, M., Kocabalkan, F. 1996. G Proteinleri. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 16 (2): 133-139.
- Bilsel, M. 2009. Elastin kökenli peptit zincirlerinin yapısal geçişlerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, 100s.
- Blanpain, C., Doranz, B.J., Vakili, J., Rucker, J., Govaerts, C., Baik, S.S., Lorthioir, O., Migeotte, I., Libert, F., Baleux, F. 1999. Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein. *J. Biol. Chem.*, 274 (49): 34719-34727.
- Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.*, 126 (1): 014101.

- Darden, T., York, D., Pedersen, L. 1993. Particle mesh Ewald: An N log (N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98 (12): 10089-10092.
- DeLano, W.L. 2002. The PyMOL molecular graphics system. <http://pymol.org>.
- Demir, K., Alıcı, H., Yaşar, F. 2018. Conformational stability of the tetrameric de novo designed hexacoil-Ala helical bundle. *Chinese J Phys*, 56 (1): 46-57.
- Gozansky, E.K., Louis, J.M., Caffrey, M., Clore, G.M. 2005. Mapping the binding of the N-terminal extracellular tail of the CXCR4 receptor to stromal cell-derived factor-1 α . *J. Mol. Bio.*, 345 (4): 651-658.
- Hancock, W.W., Lu, B., Gao, W., Csizmadia, V., Faia, K., King, J.A., Smiley, S.T., Ling, M., Gerard, N.P., Gerard, C. 2000. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J. Exp. Med.*, 192 (10): 1515-1520.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J., Fraaije, J.G. 1997. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, 18 (12): 1463-1472.
- Higashijima, T., Graziano, M., Suga, H., Kainosho, M., Gilman, A. 1991. 19F and 31P NMR spectroscopy of G protein alpha subunits. Mechanism of activation by Al3+ and F. *J. Biol. Chem.*, 266 (6): 3396-3401.
- Horuk, R. 2001. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 12 (4): 313-335.
- Kabsch, W., Sander, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22 (12): 2577-2637.
- Kaminski, G.A., Friesner, R.A., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L. 2001. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B*, 105 (28): 6474-6487.
- Kılıç, N., Demir, K. 2017. The Study of REMD Simulation of SEB-Binding Repetitive Peptide Sequences. *Karaelmas Fen Müh. Derg.*, 7 (1): 206-217.
- Kirkpatrick, S., Gelatt, C.D., Vecchi, M.P. 1983. Optimization by simulated annealing. *Science*, 220 (4598): 671-680.

- Lammers, KM., Lu, R., Brownley, J., Lu, B., Gerard, C., Thomas, K., Rallabhandi, P., Shea-Donohue, T., Tamiz, A., Alkan, S. 2008. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*, 135 (1): 194-204. e193.
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E. 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.*, 197 (11): 1537-1549.
- Noel, JP., Hamm, HE., Sigler, PB. 1993. The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature*, 366 (6456): 654.
- Palladino, P., Portella, L., Colonna, G., Raucci, R., Saviano, G., Rossi, F., Napolitano, M., Scala, S., Castello, G., Costantini, S. 2012. The N-terminal Region of CXCL11 as Structural Template for CXCR3 Molecular Recognition: Synthesis, Conformational Analysis, and Binding Studies. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 80 (2): 254-265.
- Parrinello, M., Rahman, A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.*, 52 (12): 7182-7190.
- Prado, GN., Suetomi, K., Shumate, D., Maxwell, C., Ravindran, A., Rajarathnam, K., Navarro, J. 2007. Chemokine signaling specificity: essential role for the N-terminal domain of chemokine receptors. *Biochemistry*, 46 (31): 8961-8968.
- Rajagopalan, L., Rajarathnam, K. 2006. Structural basis of chemokine receptor function-a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci. Rep.*, 26 (5): 325-339.
- Raucci, R., Colonna, G., Giovane, A., Castello, G., Costantini, S. 2014. N-terminal region of human chemokine receptor CXCR3: Structural analysis of CXCR3 (1-48) by experimental and computational studies. *BBA Proteins Proteomics*, 1844 (10): 1868-1880.
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R. S., Pienta, KJ., Wang, J. 2010. CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.*, 29 (4): 709-722.
- Szpakowska, M., Fievez, V., Arumugan, K., van Nuland, N., Schmit, JC., Chevigné, A. 2012. Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochem. Pharmacol.*, 84 (10): 1366-1380.
- Trotta, T., Costantini, S., Colonna, G. 2009. Modelling of the membrane receptor CXCR3 and its complexes with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines: putative target for new drug design. *Mol. Immunol.*, 47 (2-3): 332-339.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, AE., Berendsen, HJ. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, 26 (16): 1701-1718.
- Veldkamp, C. T., Seibert, C., Peterson, FC., Norberto, B., Haugner, JC., Basnet, H., Sakmar, T. P. ve Volkman, BF. 2008. Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci. Signal.*, 1 (37): ra4-ra4.
- Veldkamp, CT., Seibert, C., Peterson, FC., Sakmar, TP., Volkman, BF. 2006. Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α /CXCL12). *J. Mol. Biol.*, 359 (5): 1400-1409.