

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RAD23 HOMOLOG A PROTENİNİN 26S PROTEOZOMU
BAĞLANTILI PROTEOLİTİK YIKIMDAKİ ROLÜNÜ
MOLEKÜLER DİNAMİK KULLANILARAK MODELLENMESİ

DEVİRAN KARAGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

DANIŞMAN: PROF. DR. FERRUH ÖZCAN

HAZİRAN 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RAD23 HOMOLOG A PROTENİNİN 26S PROTEOZOMU
BAĞLANTILI PROTEOLİTİK YIKIMDAKİ ROLÜNÜ
MOLEKÜLER DİNAMİK KULLANILARAK
MODELLENMESİ

DEVİRAN KARAGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

DANIŞMAN: PROF. DR. FERRUH ÖZCAN

HAZİRAN 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**MODELING THE ROLE OF RAD23 HOMOLOG A
PROTEIN IN 26S PROTEASOME-ASSOCIATED
PROTEOLYTIC DEGRADATION USING MOLECULAR
DYNAMICS**

DEVİRAN KARAGÖZ

A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETIC**

ADVISOR: PROF. DR. FERRUH ÖZCAN

JUNE 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 23/06/25 tarih ve 2025/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/06/2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Devran Karagöz'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

: Prof. Dr. Emel TİMUÇİN

ÜYE

: Doç. Dr. İbrahim YAMAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



Bütün Sevdiklerime...

ÖZET

26S proteozomu bağlantılı proteolitik yıkımda kritik bir rol oynamakta RAD23 Homolog A (RAD23A) proteininin fonksiyonu, N-terminal UBL ve C-terminal UBA domainleri arasındaki etkileşimlerle düzenlenen 'açık' ve 'kapalı' durumlar arasındaki konformasyonel geçişlere sıkı sıkıya bağlıdır. Bu çalışmada, RAD23A'nın yapısal dinamikleri ve bu geçişleri yöneten moleküler mekanizmalar, kapsamlı moleküler dinamik (MD) simülasyonları ve protein-protein docking analizleri ile detaylı olarak incelenmiştir. Bu kapsamda, GROMACS yazılımı kullanılarak yalın (apo) RAD23A, K122 kalıntısından ubikuitinlenmiş RAD23A ve K48-bağlantılı di-ubikitin (di-Ub) ile Rpn10 proteininin UIM domainini içeren üçlü kompleks sistemlerinin 400 nanosaniyeye (ns) varan sürelerde MD simülasyonları yürütülmüştür. Yapısal değişimler RMSD, RMSF, Yarıçap (Rg), SASA, PCA ve kümeleme analizi gibi metriklerle değerlendirilmiştir. Ayrıca RAD23A'nın potansiyel düzenleyicisi SIK2 kinazı ile etkileşimi, HADDOCK docking sunucusu ile modellenmiştir.

Simülasyon sonuçları, yalın RAD23A'nın başlangıçtaki açık formdan, domainlerinin birbirine yaklaşmasıyla zamanla daha kompakt (kapalı) bir yapıya evrildiğini doğrulamıştır. Bu geçiş, özellikle 50-60 ns aralığında belirginleşmiş; Yarıçap (Rg) değerinde 5.5 nm'den 3.2 nm'ye, çözünebilir yüzey alanında (SASA) ise 320 nm²'den 220 nm²'ye bir düşüş gözlenmiştir. K122 kalıntısından ubikuitinlenmiş RAD23A'nın, bu kapanma eğiliminin yavaşladığı ve proteinin asimetrik bir hareketle daha esnek bir yapı sergilediği görülmüştür. En dikkat çekici bulgu ise, RAD23A'nın doğal bağlanma partnerleri olan K48-diUb ve Rpn10 ile oluşturduğu kompleks sisteminde, moleküller arası etkileşimlerin molekül içi kapanma eğilimini baskılayarak fonksiyonel olan açık formu stabil bir şekilde koruduğunun belirlenmesidir. Docking analizleri de bu bulguları destekleyerek, özellikle 50 ns ve 200 ns anlarındaki ara konformasyonların SIK2 ile en düşük HADDOCK skorlarına (-106.0 ve -102.7) sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, RAD23A'nın işlevinin, post-translasyonel modifikasyonlar ve partner proteinlerle olan etkileşimler tarafından hassas bir şekilde kontrol edilen bir konformasyonel anahtarlama mekanizmasına dayandığını ve SIK2 kinazının bu düzenlemede potansiyel bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: RAD23A, Ubikitin-Proteazom Sistemi, Moleküler Dinamik, Protein-Protein Etkileşimleri, Konformasyonel Değişim, SIK2.

ABSTRACT

The function of the RAD23 Homolog A (RAD23A) protein, which plays a critical role in 26S proteasome-associated proteolytic degradation, is tightly linked to conformational transitions between 'open' and 'closed' states, orchestrated by interactions between its N-terminal UBL and C-terminal UBA domains. In this study, the structural dynamics of RAD23A and the molecular mechanisms governing these transitions were investigated in detail through extensive molecular dynamics (MD) simulations and protein-protein docking analyses. For this purpose, MD simulations of up to 400 nanoseconds (ns) were conducted using GROMACS software for apo RAD23A, RAD23A ubiquitinated at the K122 residue, and a ternary complex system including K48-linked di-ubiquitin (di-Ub) and the UIM domain of Rpn10. Structural changes were evaluated using metrics such as RMSD, RMSF, Radius of Gyration (Rg), SASA, PCA, and cluster analysis. Furthermore, the interaction of RAD23A with its potential regulator, SIK2 kinase, was modeled using the HADDOCK docking server.

Simulation results confirmed that apo RAD23A evolves from its initial open form to a more compact (closed) structure over time due to its domains approaching each other. This transition, which becomes prominent around 50-60 ns, was characterized by a decrease in the Radius of Gyration (Rg) from 5.5 nm to 3.2 nm and in the solvent-accessible surface area (SASA) from 320 nm² to 220 nm². In the K122-ubiquitinated RAD23A, this closing tendency was observed to be slower, with the protein exhibiting a more flexible structure through an asymmetric motion. Most notably, it was determined that in the complex formed with its natural binding partners, K48-diUb and Rpn10, RAD23A stably maintained its functional open form, as intermolecular interactions suppressed the intramolecular closing tendency. Docking analyses supported these findings, showing that intermediate conformations, particularly at 50 ns and 200 ns, had the lowest HADDOCK scores (-106.0 and -102.7, respectively) for SIK2 interaction.

In conclusion, this study reveals that the function of RAD23A is based on a conformational switching mechanism precisely controlled by post-translational modifications and interactions with partner proteins, and suggests that SIK2 kinase may play a potential role in this regulation.

Keywords: RAD23A, Ubiquitin-Proteasome System, Molecular Dynamics Simulation, Protein-Protein Interactions, Conformational Change, SIK2, Protein Docking.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında değerli bilgi, destek ve yönlendirmeleriyle katkıda bulunan danışmanım Prof. Dr. Ferruh Özcan'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini esirgemeyen aileme, zorlu dönemlerde moral kaynağı olan ve benden desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma ve birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. Ubikitin-Bağlı Proteolitik Yıkım Sistemi (UPS)	3
2.1. 26S Proteazom	4
2.1.1. 26S Proteazomun Yapısı ve İşlevi	4
2.2. Proteazom Degradasyonu İçin Alt Şartlar	6
3. Rad23A ve Ubikitin Sistemi	8
3.1. Rad23A	8
3.1.1. UBL Domaini	8
3.1.2. UBA Domaini	9
3.2. Rad23A ile Protein Bozunması	9
3.3. Ubikuitin	11
3.3.1. Poliubikuitin Zinciri	11
3.4. Rpn10	13
3.4.1. Yapısal Özellikler	13
3.4.2. Fonksiyonel Roller	14
3.4.3. Klinik Önemi	15
3.5. SIK2	15
3.5.1. Fonksiyonel Roller	15
3.5.2. Rad23A ile Olası İlişkisi	17
3.5.3. Klinik Önemi	17
4. METODLAR	18
4.1. Protein-Protein Docking	18
4.2. Yapı Hizalama	19
4.3. Moleküler Dinamik Simülasyonları	20
4.3.1. Enerji Minimizasyonu	22
4.3.2. Dengeleme Fazı (NVT ve NPT)	23
4.3.3. Moleküler Dinamik Koşu (MD Run)	24
4.3.4. Kısıtlama (Restraint)	26
4.3.5. Mesafe Kısıtlaması (Distance Restraint)	26

4.4.	Moleküler Dinamik Analizleri	28
4.4.1.	Validasyon Analizleri	29
4.4.2.	RMSD (Kök Ortalama Kare Sapma)	30
4.4.3.	RMSF (Kök Ortalama Kare Dalgalanma)	31
4.4.4.	SASA (Çözünebilir Yüzey Alanı)	31
4.4.5.	GYRATE (Kütle Merkezi Yarıçapı)	32
4.4.6.	Kümeleme Analizi (Cluster Analizi)	33
4.4.7.	Enerji (Coulomb ve Lennard-Jones)	33
4.4.8.	PCA (Temel Bileşen Analizi)	34
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
5.1.	Validasyon Analizleri	38
5.2.	RAD23A'nın Yalın Formda Geçirdiği Konformasyonel Değişim	38
5.3.	Post-Translasyonel Modifikasyonların RAD23A Yapısına Etkisi	41
5.4.	Protein-Protein Etkileşimlerinin Açık Form Üzerindeki Rolü	44
5.5.	Post-Translasyonel Modifikasyon ve Protein-Protein Etkileşimlerinin Birleşik Etkisi: RAD23A Üçlü Kompleksi	47
5.6.	SIK2 ile RAD23A Arasındaki Konformasyonel Bağımlı Etkileşimlerin Docking Analizi	50
5.7.	Genel Değerlendirme ve Gelecek Perspektif	52
5.7.1.	SIK2 ile Aktivasyonun Olası Etkileri	54
5.7.2.	SIK2 ile Deaktivasyonun Olası Etkileri	55
	KAYNAKLAR	58
	ÖZGEÇMİŞ	61
	TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR	62
	EKLER	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Gömülü Yüzey Alanı (Buried Surface Area)
di-Ub	: Di-ubikitin
GROMACS	: Groningen Machine for Chemical Simulations
HDAC4	: Histon Deasetilaz-4 (Histone Deacetylase-4)
IRS1	: İnsülin Reseptör Substratı-1 (Insulin Receptor Substrate-1)
MD	: Moleküler Dinamik (Molecular Dynamics)
NER	: Nükleotid Eksizyon Onarımı (Nucleotide Excision Repair)
NPT	: Sabit Basınç ve Sıcaklık (Constant Pressure and Temperature)
NVT	: Sabit Hacim ve Sıcaklık (Constant Volume and Temperature)
OPLS-AA	: Optimized Potentials for Liquid Simulations - All Atom
PCA	: Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis)
PDB	: Protein Veri Bankası (Protein Data Bank)
PME	: Particle Mesh Ewald
Rg	: Yarıçap (Radius of Gyration)
RMSD	: Kök Ortalama Kare Sapma (Root Mean Square Deviation)
RMSF	: Kök Ortalama Kare Dalgalanma (Root Mean Square Fluctuation)
SASA	: Çözünabilir Yüzey Alanı (Solvent Accessible Surface Area)
SIK2	: Tuzla İndüklenebilir Kinaz 2 (Salt-Inducible Kinase 2)
UBA	: Ubikitin İlişkili Domain (Ubiquitin Associated Domain)
UBL	: Ubikitin Benzeri Domain (Ubiquitin Like Domain)
UPS	: Ubikitin-Proteazom Sistemi (Ubiquitin-Proteasome System)
WAT	: Beyaz Adipöz Dokusu (White Adipose Tissue)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Ubiquitin Proteazom Sistemi	3
Şekil 2.2: 26S Protezom	5
Şekil 3.1: Rad23A'nın moleküler yapısı	9
Şekil 3.2: RAD23A açık-kapalı yapısı temsili gösterim	10
Şekil 3.3: Ubikitin moleküler yapısı	11
Şekil 3.4: Ubikitin zincir tipleri ve bağlantı paternleri	12
Şekil 3.5: Rpn10 moleküler yapısı	14
Şekil 3.6: SIK2 Moleküler yapısı	16
Şekil 4.1: Moleküler Dinamik model yapıları	36
Şekil 5.1: RAD23A'nın farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları	39
Şekil 5.2: RAD23A'nın yalın formu için gerçekleştirilen yapısal analizler	40
Şekil 5.3: Ubikuitinlenmiş RAD23A'nın farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları	41
Şekil 5.4: RAD23A Olası Post-Translasyonel Modifikasyonlarının temsili gösterimi	42
Şekil 5.5: Ubikuitinlenmiş RAD23A yapısı için gerçekleştirilen yapısal analizler	43
Şekil 5.6: K48-bağlantılı diubiquitin, RAD23A ve Rpn10'un UIM domaini içeren kompleks yapısının farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları	45
Şekil 5.7: RAD23A'nın K48-diUb ve Rpn10 UIM ile oluşturduğu kompleks yapısı için gerçekleştirilen yapısal analizler	47
Şekil 5.8: K48-bağlantılı diubiquitin, Ubikuitinlenmiş RAD23A ve Rpn10'un UIM domaini içeren kompleks yapısının farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları	48
Şekil 5.9: Ubikuitinlenmiş RAD23A'nın K48-diUb ve Rpn10 UIM ile oluşturduğu üçlü kompleks yapısı için gerçekleştirilen yapısal analizler.	49
Şekil 5.10: SIK2-RAD23A aktif bölge uzaklıkları	52
Şekil 5.11: RAD23A-Proteozom kompleksi model önerisi	53
Şekil 5.12: Katlanmamış proteinin proteozomun ağızına taşınma model önerisi	54
Şekil 5.13: SIK2'nin RAD23A üzerinden proteozomal yıkım süreçlerini modüle etme modeli	55
Şekil 5.14: SIK2'nin RAD23A deaktivasyonu aracılığıyla proteostatik dengeyi sağlaması	56

TABLÖLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Proteozom adaptör proteinleri, proteazom ortakları ve tanınan ubiquitin zincir türleri.	7
Çizelge 3.1: RAD23A proteininin temel domainleri, bu domainlerin kapsadığı residü aralıkları ve biyolojik işlevleri	10
Çizelge 5.1: SIK2 ile RAD23A'nın docking ve aktif bölge uzaklık analizleri	50



1. GİRİŞ

Proteinlerin işlevlerinin anlaşılması, biyosistemlerin temellerinin incelenebilmesi için kritik bir öneme sahiptir. Proteinler hücre içinde oluşan biyokimyasal tepkimelerin düzenlenmesinden gen ifadesinin kontrolüne kadar çoğu temel süreçte rol oynarlar. Bu sebeple protein yapılarının ve fonksiyonlarının araştırılması biyolojinin en temel yapı taşlarından biridir.

Hücre içi protein homeostazının sağlanması, yaşamın devamlılığı için kritik bir öneme sahiptir. Yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinlerin etkili bir şekilde ortadan kaldırılması, hücrel dengeyi korumada önemli bir rol oynar. Bu bağlamda, ubiquitin-bağlı proteolitik yıkım sistemi (UPS), hücre içinde protein yıkımını düzenleyen en önemli mekanizmalardan biri olarak öne çıkar. UPS, yalnızca protein dengesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücrel stres yanıtlarında, sinyal iletiminde ve gen düzenlemesinde kritik işlevlere sahiptir[1].

UPS sisteminde görev alan adaptör proteinler, hedef proteinlerin ubiquitin ile işaretlenmesini ve proteazom adı verilen moleküler makineye taşınmasını kolaylaştırır. RAD23 homolog A (RAD23A) proteini, bu adaptör proteinlerden biridir ve hücredeki yanlış katlanmış proteinlerin tanınmasında ve proteazoma yönlendirilmesinde önemli bir görev üstlenir [2]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, RAD23A'nın ubiquitin-ligaz ve 26S proteazomu ile etkileşim gösteren özel domenleri sayesinde proteinlerin yıkımını kolaylaştırdığını ortaya koymuştur [2, 3]. RAD23A proteininin yapısal ve dinamik özelliklerinin moleküler düzeyde daha iyi anlaşılması, bu proteinin biyolojik fonksiyonlarının çözülmesi ve hastalıklarla ilişkili olası mekanizmaların belirlenmesi için çok önemlidir.

1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışması, RAD23A proteininin ubiquitin-bağlı yıkım mekanizmasındaki rolünü ve bu süreç sırasında meydana gelen konformasyonel değişiklikleri moleküler dinamik (MD) simülasyonları kullanarak açıklamayı amaçlamaktadır. Çalışma kapsamında, RAD23A'nın 26S proteazomu ve ubiquitin ile olan etkileşimleri detaylı bir şekilde incelenmiş, bu mekanizmalara destek olan SIK2 proteininin RAD23A ile etkileşimleri

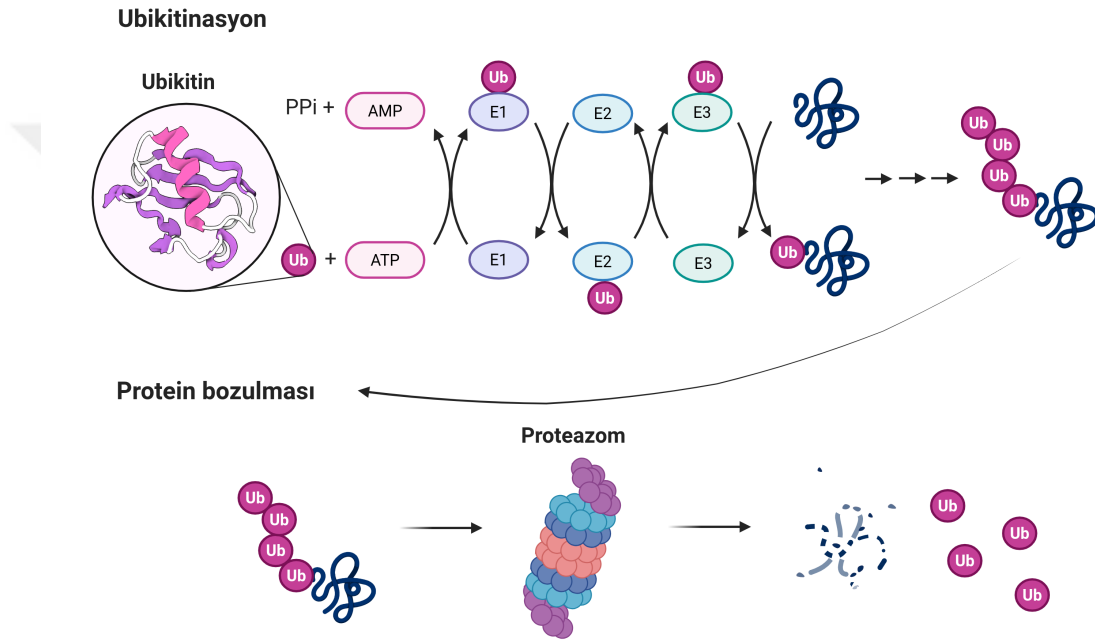
ele alınmıştır. RAD23A'nın, proteinlerin yıkımı sırasında ubiquitin zincirlerini tanıma ve proteazoma yönlendirme süreçlerindeki adaptör rolü, bu çalışmanın temel inceleme alanını oluşturmaktadır.

RAD23A proteininin yapısal özellikleri ve dinamik davranışları, ubiquitin ve 26S proteazomu arasındaki etkileşimlerdeki kritik rolü ile birleştirilerek ele alınmış ve moleküler dinamik simülasyonlar kullanılarak detaylandırılmıştır. Bu yaklaşımla, RAD23A'nın biyolojik mekanizmalardaki şekillendirici etkisi üzerine yeni bilgiler edinilmesi hedeflenmiştir.



2. Ubikitin-Bağlı Proteolitik Yıkım Sistemi (UPS)

Ubikitin-bağlı proteolitik yıkım sistemi (UPS), hücre içerisinde protein homeostazını sağlayan ve protein yıkımını düzenleyen çok önemli bir mekanizmadır. UPS, yanlış katlanmış, hasar görmüş veya belirli sinyal yollarında rolü sona ermiş proteinlerin kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlar. Bu sistem, proteazom adı verilen bir kompleks yapı aracılığıyla çalışmaktadır [4].



Şekil 2.1: Ubikitin Proteazom Sistemi

UPS'in temel bileşenlerinden biri ubikitindir. Ubikitin, hücrede bulunan proteinlere kovalent olarak bağlanarak, bu proteinlerin yıkım işareti taşımalarını sağlar. Bu işaretleme süreci, E1 ubikitin aktive edici enzim, E2 ubikitin konjuge edici enzim ve E3 ubikitin ligaz enzimlerinden oluşan karmaşık bir mekanizma aracılığıyla gerçekleştirilir[5] (bkz. Şekil 2.1). Bu mekanizmada:

1. E1 Enzimi: Ubikitini aktive ederek, onu E2 enzimine aktarır.
2. E2 Enzimi: Aktive edilmiş ubikitini hedef proteine taşır.
3. E3 Enzimi: Ubikitin molekülünün hedef proteine spesifik olarak bağlanmasını düzenler.

Hedef protein, poliubikitin zinciri oluştuktan sonra proteazoma yönlendirilir. Proteazom, hücredeki protein yıkımını gerçekleştiren ana yapıdır ve 20S katalitik çekirdek ile 19S düzenleyici alt birimlerden oluşur. 19S alt birimi, poliubikitin zincirini tanıyarak hedef proteinin proteazoma alınmasını sağlarken, 20S çekirdek protein yıkımını gerçekleştirir [6].

UPS, sadece proteinlerin yıkılmasını sağlamakla kalmaz; aynı zamanda hücrel sinyal iletimi, stres yanıtı, gen ekspresyonu ve döngü kontrolü gibi birçok biyolojik süreçte hayati bir rol oynar. Sistemdeki herhangi bir aksaklık, protein birikimi, nörodejeneratif hastalıklar veya kanser gibi ciddi patolojik durumlara yol açabilir. Bu nedenle UPS, temel biyolojik mekanizmaların anlaşılması ve hastalıklara yönelik terapötik hedeflerin belirlenmesi için yoğun olarak araştırılan bir alandır.

2.1. 26S Proteazom

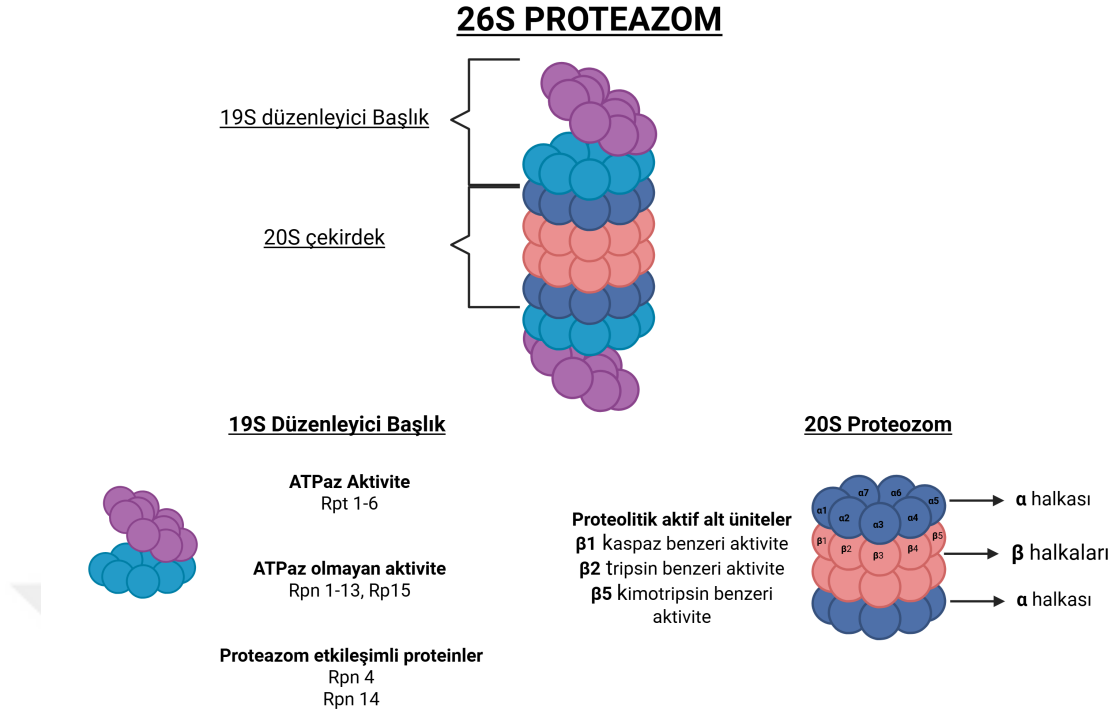
26S proteazom, ökaryotik hücrelerde protein yıkımından sorumlu en önemli proteolitik komplekslerden biridir. Protein homeostazının sağlanmasında temel bir role sahip olan 26S proteazom, yanlış katlanmış, hasar görmüş ya da görevini tamamlamış proteinlerin kontrollü bir şekilde yıkımını gerçekleştirir. Bu yıkım süreci, hücrel dengenin korunması ve birçok biyolojik sürecin düzenlenmesi için kritik öneme sahiptir[7].

26S proteazomunun önemi, hücrel işlevlerin düzenlenmesinde kritik bir kontrol noktası olmasıdır. Bu kompleksin işleyişindeki aksaklıklar, çeşitli hastalıkların, özellikle nörodejeneratif hastalıkların ve kanserin gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, 26S proteazomunun yapısal ve işlevsel özelliklerini anlamak, biyoloji ve tıp alanındaki birçok araştırmanın odak noktası olmuştur.

2.1.1. 26S Proteazomun Yapısı ve İşlevi

26S proteazom, ökaryotik hücrelerde protein yıkımını düzenleyen karmaşık bir biyomoleküler makinedir. Bu yapı, 20S katalitik çekirdek partikülü ve 19S düzenleyici partikülden oluşur. İki ana bileşenin koordineli çalışması, proteazomun hem yapısal hem de işlevsel gereksinimlerini karşılar [8] (Şekil 2.2).

20S çekirdek partikül bölgesi, proteazomun proteolitik aktivitelerinin gerçekleştiği ana bileşendir. Silindirik bir yapıya sahip olan bu bölge, proteinlerin yıkımını gerçekleştiren



Şekil 2.2: 26S Protezom

aktif bölgeleri barındırır. Yalnızca dar eksenel gözenekler aracılığıyla erişilebilen bu aktif alanlar, proteazomun seçici çalışmasını sağlar. Böylece yalnızca işaretlenmiş proteinlerin yıkıma uğratılması garanti edilir. Çekirdek partikül, iki iç halka ve iki dış halkadan oluşur. İç halkalar, proteolitik enzimlerin bulunduğu bölgelerdir; dış halkalar ise yapısal destek sağlayarak proteazomun stabilitesini korur[7].

19S düzenleyici partikül, proteazomun işlevselliğini artıran bir diğer kritik bileşendir. Bu yapı, poliubikitin zincirlerini tanıyarak substrat proteinlerin seçimini sağlar ve bu zincirlerin çıkarılmasını koordine eder. Ayrıca proteinlerin katlanmış yapısını çözerek onları 20S çekirdeğine yönlendirir. Düzenleyici partikül, ATPaz aktivitesine sahip alt birimlerden oluşur. Bu birimler, substratların mekanik olarak çözülmesini ve proteolitik bölgeye aktarılmasını sağlar. Aynı zamanda substrat tanıma ve poliubikitin zincirlerinin uzaklaştırılması işlemleri de bu kompleks tarafından gerçekleştirilir[7].

26S proteazom, ATP kullanarak çalışan bir mekanizmadır. AAA+ ATPaz alt birimleri, proteinlerin katlanmamış bir yapıya dönüştürülmesini ve bu yapıların proteolitik bölgeye taşınmasını sağlar. Bu enerji bağımlı süreç, proteazomun yüksek seçicilikle çalışmasını ve farklı türde substratları etkili bir şekilde işlemekten geçirmesini mümkün kılar[9].

2.2. Proteazom Degradasyonu İçin Alt Şartlar

Proteazomun substratı etkin bir şekilde bozabilmesi için, substratın belirli yapısal özelliklere sahip olması gerekir. Bu şartlar, bir hedefleme sinyali ve yapılandırılmamış bir başlatma bölgesinin varlığını kapsar. Hedefleme sinyali, genellikle substrat proteinine eklenmiş bir poliubikitin zinciridir. Rad23A ve Dsk2 gibi ubikitin reseptörleri (Detaylı proteozom adaptör proteinleri tablosu 2.1), substratı proteazoma taşıyarak degradasyon sürecini başlatır [16].

Ubikitin zincirlerinin proteazoma tanıtılmasında Rad23A kilit bir rol oynar. Rad23A, substratları özellikle Rpn1 ve Rpn10 gibi proteazomal alt birimlere bağlarken[3, 17], Dsk2 de benzer bir mekanizma ile substrat taşınmasını destekler[17]. Bu bağlantı, substratı motorun gözenek halkasına yaklaştırarak protein yıkımının ilk adımını kolaylaştırır. Ek olarak, Rad23A, substratın ubikitin zincirine bağlı esnekliğini koruyarak, proteazomun substratı şekil değişikliğine uğratmasını sağlar[6].

Substratların degradasyonu için diğer bir şart, protein yapısında esnek bir başlatma bölgesinin bulunmasıdır. Bu bölge, proteazom motorunun substratı tutması ve çekmesine olanak tanır. Rad23A'nın dahili esnek bölgeleri proteazoma erişim için tek başına yeterli uzunlukta olmadığından, substratın proteazoma etkili bir şekilde taşınabilmesi için 3-4 ubikitin uzunluğunda ve K48 zincirine sahip bir poliubikitin zinciri gereklidir. Rad23A, bu zinciri tanıyarak substratı proteazomal alt birimlere bağlar ve yıkım sürecini destekler[6].

Sonuç olarak, Rad23A'nın proteazomun substrat tanıma ve işleme mekanizmalarındaki rolü, proteazomal degradasyon için kritik bir adım oluşturur. Bu adaptör proteinin etkili bağlanma ve esneklik sağlama yeteneği, proteazom fonksiyonunun temel taşlarından biridir.

Çizelge 2.1: Proteozom adaptör proteinleri, proteazom ortakları ve tanınan ubiquitin zincir türleri [10–15].

Protein	Proteazom Ortağı	Tanınan Zincir
hHR23A (İn- san)	Rpn1, Rpn10	K48-bağlı poliubikitin (≥ 3 Ub tercihi); yüksek konsantrasyonda K63'e zayıf bağlanma
hHR23B (İn- san)	Proteazom (genel, UBL aracılığıyla)	K48-bağlı poliubikitin (spesifik)
Rad23 (Maya)	Proteazom (genel, UBL aracılığıyla)	Çoklu ubiquitinlenmiş proteinler
Dsk2 (Maya)	Rpn1, Pre2	K48-bağlı poliubikitin zincirleri (mono- Ub değil)
Ubikulin-1 (İnsan)	Rpn10/S5a (UBL aracılığıyla)	Poliubikitin zincirleri (K48 & K63, di- Ub için az bağlantı seçiciliği)
Ubikulin-2 (İnsan)	Rpn1, Rpn10, Rpn13 (UBL aracılığıyla çıkarımsal)	Poliubikitin zincirleri (az bağlantı ter- cihi)
Ubikulin-4 (İnsan)	PSMD2 (Rpn1), PSMD4 (Rpn10) (UBL aracılığıyla)	K48-bağlı poliubikitin zincirleri
p62/SQSTM1 (İnsan)	Rpn10, Rpt1 (PB1 alanı aracılığıyla); Protea- zomun kendisi (otofaji için UBA aracılığıyla)	K48-, K63-, M1-bağlı poliubikitin (K63/M1'i K48'e tercih eder); ZZ alanı K48/K63'e bağlanır
Ddi1 (Maya)	Proteazom (UBL aracılığıyla)	Uzun poliubikitin zincirleri (>8 Ub), kesim için K48'i K63'e tercih eder
DDI2 (İnsan)	Proteazom (çıkarımsal)	Yüksek derecede poliubikitinlenmiş substratlar (örneğin NRF1) kesim için

3. Rad23A ve Ubikitin Sistemi

Ubikitin-proteazom sistemi(UPS) hücrel dengein korunmasının ötesinde sinyal iletimi, hücre döngüsü ve stres yanıtları gibi birçok hayati sürecin yönetiminde yer alır.

Rad23A'nın proteazom alt birimleri ve ubikitin zincirleriyle olan etkileşimi, substrat tanıma ve işlem sürecinin şeklini önemli ölçüde etkiler. Bu adaptör proteinin yapısal esnekliği ve spesifik bağlanma yeteneği, ubikitin sisteminin etkin bir parçası olmasını sağlar. Bu bölüm, Rad23A'nın bu karmaşık sistemdeki rolünü anlamaya yönelik bir temel sunmayı amaçlamaktadır.

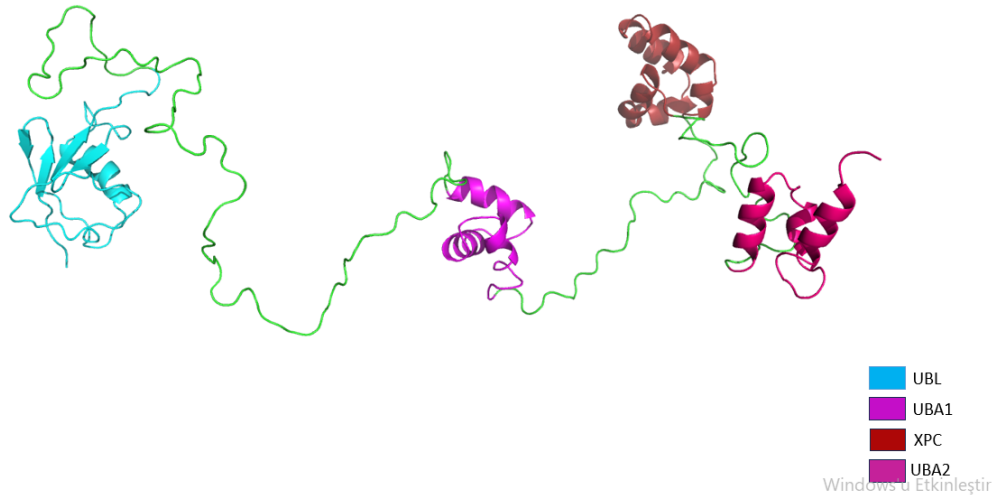
3.1. Rad23A

Rad23A, insanlarda RAD23A geni tarafından kodlanan ve hücredeki protein homeostazını sağlamak için kritik roller üstlenen bir proteindir. Bu protein, nükleotid ekzizyon onarımı (NER) ve ubikitin-proteazom sistemi (UPS) süreçlerinde önemli görevler üstlenir. *Saccharomyces cerevisiae*'deki Rad23'ün insan homologlarından biri olan Rad23A, özellikle DNA onarımı ve proteazomal yıkım mekanizmalarında adaptör bir protein olarak işlev görür[18].

Rad23A, 19. kromozom üzerinde yer alır ve yaklaşık 40 kDa ağırlığında, 363 amino asit uzunluğunda bir proteindir. Alternatif kesim ile oluşturulmuş iki izoformu daha bulunmaktadır. Rad23A, dört ana domain içerir: UBL, UBA1, ile Bağlanma ve UBA2. Bu domainler, proteinin hem DNA onarımı hem de proteazom ile olan etkileşimlerini düzenler. Ayrıca, UBL ve UBA1 domainleri arasında serin, prolin, treonin ve alanin amino asitlerinden zengin bir bölge yer alır. Bu özellikler, Rad23A'nın esnek yapısını ve çok işlevli doğasını destekler[18]. (Şekil 3.1, Tablo 3.1)

3.1.1. UBL Domaini

Rad23A'nın N-terminal UBL domaini, proteazomun alt birimlerine bağlanmada ve substratların proteazoma taşınmasında kritik bir rol oynar. Bu domain, proteazomal hedefleme süreçlerinde bir köprü işlevi görerek substratların doğru bir şekilde yönlendirilmesine olanak tanır. UBL domainleri, hücrel süreçlerde geniş bir yelpazede



Şekil 3.1: Rad23A'nın domain yapısı. PDB 1OQY Model 1 [18]

işlev görür; otofaji, inflamasyon, transkripsiyon, DNA onarımı ve bağışıklık yanıtları gibi çok sayıda biyolojik süreçte yer alır. Rad23A, bu domaini aracılığıyla 26S proteazom ile doğrudan etkileşim kurar ve degradasyon sürecine katkı sağlar[19].

3.1.2. UBA Domaini

UBA domainleri, poliubikitin zincirlerini tanıma ve bağlama işleviyle ön plana çıkar. Rad23A, özellikle K48 bağlantılı poliubikitin zincirlerini tanıyarak substratların proteazoma doğru bir şekilde yönlendirilmesini sağlar. Bu domainler, proteazomun etkinliğini artırarak substratların doğru bir şekilde işlenmesine yardımcı olur. Ayrıca, UBA domainleri, substratların seçiciliğini artırarak sadece hedef proteinlerin proteazoma taşınmasını mümkün kılar. Rad23A'nın UBA domainleri, UPS yolunda merkezi bir role sahiptir ve protein kalite kontrol mekanizmalarının kritik bir bileşeni olarak görev yapar[20].

3.2. Rad23A ile Protein Bozunması

Rad23A, proteazom aracılı protein yıkımında kritik bir adaptör protein olarak görev yapar. Proteinlerin bozunma sürecinde, Rad23A özellikle poliubikitin zincirlerinin tanınması ve hedef proteinlerin proteazoma taşınmasında önemli bir rol oynar. Bu süreç, hücrel dengeyi korumakla birlikte sinyal iletimi, hücre döngüsü ve stres yanıtları gibi temel biyolojik işlevleri destekler[21].

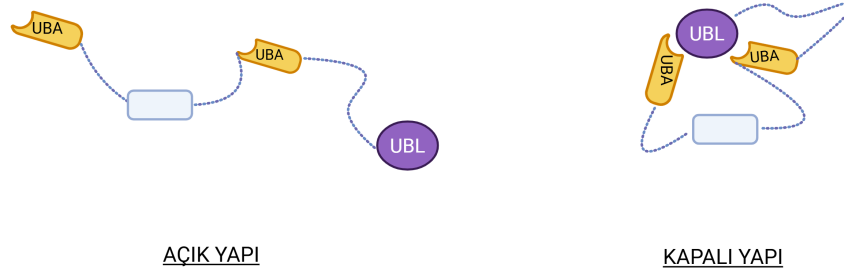
Protein yıkımı sırasında K48 bağlantılı poliubikitin zincirleri, proteazom tarafından

Çizelge 3.1: RAD23A proteininin temel domainleri, bu domainlerin kapsadığı residü aralıkları ve biyolojik işlevleri

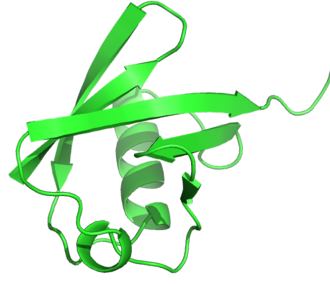
Domain	Residu Aralığı	İşlev
UBL (Ubiquitin Like Domain)	1–76	Proteozomun reseptör alt birimi Rpn10 gibi proteinlerle etkileşime geçerek proteozomal hedeflemeyi sağlar.
UBA1 (Ubiquitin Associated Domain 1)	163–226	Ubiquitinlenmiş substratların tanınmasında görev alır.
XPC Bağlanma Bölgesi	158–183	DNA onarım proteinlerinden XPC ile etkileşir; nükleotid eksizyon onarımında (NER) rol oynar.
UBA2 (Ubiquitin Associated Domain 2)	312–363	Ubiquitinlenmiş substratların taşınmasında görev alır, substrat bağlanmasına ve stabilizasyonuna katkı sağlar.

tanınmak üzere hedef proteinlere eklenir. Rad23A, UBA domaini aracılığıyla bu poli-ubikitin zincirlerini seçici olarak tanır ve bağlanır. Bu işlev, hedef proteinlerin doğru bir şekilde proteazoma taşınmasını sağlayarak yıkım sürecinin etkinliğini artırır. Özellikle Rad23A'nın Rpn1 (PSMD2) ve Rpn10 (PSMD4 veya S5a) gibi proteazomal alt birimlerle etkileşimleri, bu adaptör proteinin proteazom üzerinde stabil bir bağlanma oluşturmaya olanak tanır[21, 22].

Rad23A'nın iki farklı konformasyonel yapıda olduğu düşünülmektedir: kapalı ve açık konformasyon. Kapalı yapıda, Rad23A'nın UBA ve UBL domainleri kendi içinde



Şekil 3.2: RAD23A açık-kapalı yapısı temsili gösterim



Şekil 3.3: Ubikuitin moleküler yapısı. Model 1UBQ [24]

etkileşerek daha kompakt bir yapı oluşturur. Açık konformasyonda ise bu domainler ayrılarak poliubikitin zincirlerinin tanınması ve hedef proteinlerin proteazoma taşınması için uygun bir yapı oluşturur[18, 23] (Şekil 3.2). Rad23A'nın hangi etkileşimler altında bu iki konformasyondan birine daha kararlı geçtiği konusu, detaylı bir şekilde araştırılmayı gerektiren bir alan olmaya devam etmektedir.

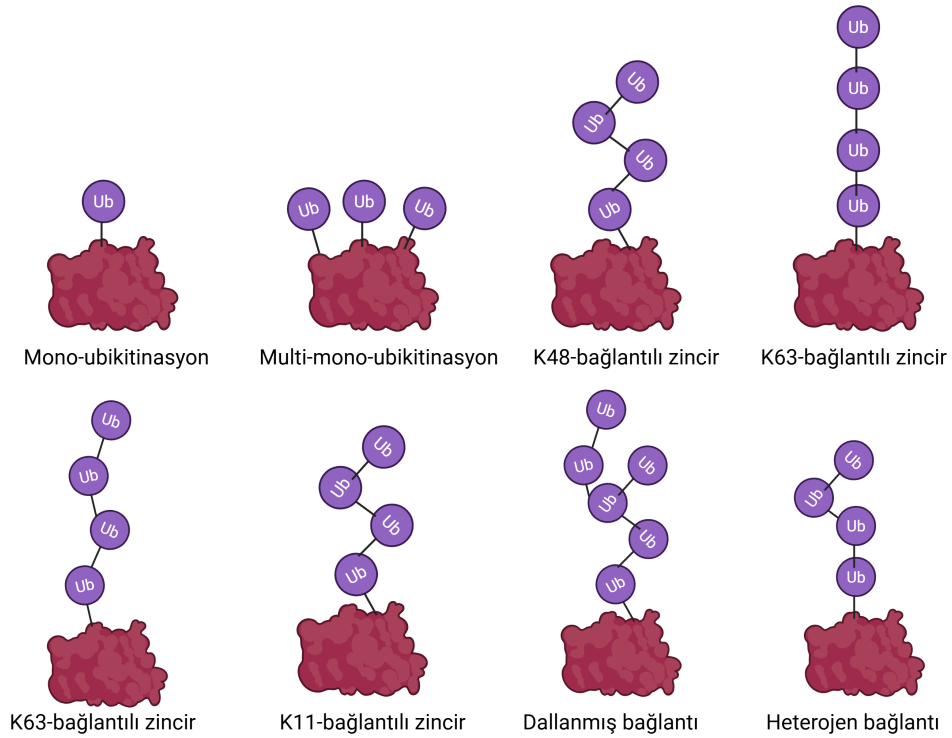
Bu yapısal değişimlerin, Rad23A'nın proteazomal degradasyondaki rolünü etkileyen önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Rad23A'nın kompleks yapısı ve etkileşimleri, protein bozunma sürecinin hassas bir şekilde düzenlenmesine katkıda bulunur ve degradasyon sürecinin doğruluğunu ve seçiciliğini artırır. Bu adaptör proteinin etkinliği, hücresel işlevlerin sürdürülebilirliği açısından hayati bir öneme sahiptir.

3.3. Ubikuitin

Ubikuitin, 76 amino asitten oluşan küçük, korunmuş bir proteindir (Şekil 3.3) ve hücre içi protein homeostazının sağlanmasında kritik bir role sahiptir. Proteinlerin seçici olarak işaretlenmesi ve proteazomal yıkıma yönlendirilmesi süreçlerinde merkezi bir molekül olarak görev yapar. Ubikuitin, hedef proteinlere kovalent olarak bağlanarak protein yıkımını düzenler ve aynı zamanda hücresel sinyal iletimi, DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü ve stres yanıtı gibi çok sayıda biyolojik süreçte görev alır [5].

3.3.1. Poliubikuitin Zinciri

Ubikuitin, genellikle hedef proteinlerin belirli lizin (Lys) kalıntılarına kovalent bağlanır ve daha sonra diğer ubikuitin molekülleri, bağlanmış olan ubikuitinin kendi lizin kalın-



Şekil 3.4: Ubikitin zincir tipleri ve bağlantı paternleri [5]

tılarına eklenerek bir poliubikuitin zinciri oluşturur. Poliubikuitin zincirleri, zincirdeki bağlanma yerlerine bağlı olarak farklı yapısal özellikler ve biyolojik işlevler sergiler. Bu zincirlerin en yaygın türleri, K48 ve K63 bağlantılı poliubikuitin zincirleridir (Şekil 3.4) [5].

- **K48 Bağlantılı Zincirler:** K48 bağlantılı poliubikuitin zincirleri, proteazomal yıkım için hedefleme sinyali olarak bilinir. Bu zincirler, RAD23A gibi adaptör proteinler tarafından tanınır ve hedef proteinlerin proteazoma etkili bir şekilde taşınmasını sağlar (Figür 4). K48 zincirleri, proteazomal degradasyonun seçiciliğini ve etkinliğini artırmak için kritik bir sinyal olarak hizmet eder.
- **K63 Bağlantılı Zincirler:** K63 poliubikuitin zincirleri, protein yıkımından ziyade sinyal iletimi, DNA onarımı ve membran trafik işlevlerinde rol oynar. Ayrıca, bu zincirler Dsk2 gibi adaptör proteinler tarafından tanınabilir ve bu sayede belirli proteinlerin proteazom ile ilişkili olmayan süreçlerde düzenlenmesine katkı sağlar.
- **M1 Zinciri ve Diğer Kombinasyonlar:** M1 bağlantılı poliubikuitin zincirleri, genellikle sinyal iletimi ve bağışıklık tepkileri gibi süreçlerde rol oynar. Ayrıca, K48 ve K63 bağlantı kombinasyonlarına sahip zincir motifleri, karmaşık biyolo-

jik işlevleri düzenlemek için bir desen oluşturabilir. Bu hibrit zincirler, belirli bağlama proteinlerinin tanınmasını sağlayarak hücrel süreçlerin çok yönlü kontrolüne katkıda bulunur.

Poliubikuitin zincirleri, proteazomun işlevini yönlendiren bir "ubikuitin kodu" oluşmasını sağlar.[5] Bu kod, zincirin kompaktlığı, esnekliği ve özgül yapısına bağılı olarak proteazom ve adaptör proteinler tarafından tanınır. Zincirlerin özgül yapısal özellikleri, hangi proteinlerin yıkım için seçileceğini ve bu işlevin ne kadar etkin bir şekilde gerçekleşeceğini belirler.

Ubikuitin ve poliubikuitin zincirlerinin rolleri, sadece protein yıkımı ile sınırlı kalmaz; aynı zamanda hücrel dengenin korunması ve çok sayıda biyolojik sürecin düzenlenmesi açısından hayati önem taşır. Bu zincirlerin Rad23A ve proteazom ile olan etkileşimi, protein yıkım mekanizmasını anlamada kilit bir bileşen oluşturur.

3.4. Rpn10

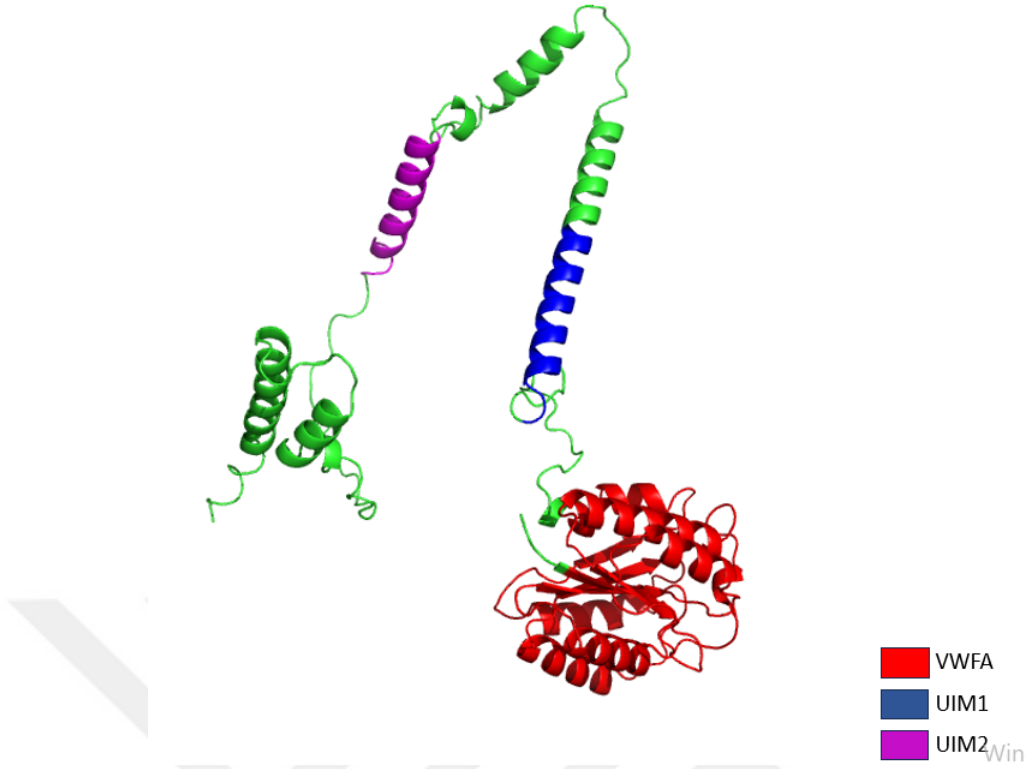
Rpn10 (26S proteazomun ATP'den bağımsız düzenleyici alt birimi PSMD4), 26S proteazomunun 19S düzenleyici partikülünün bir parçası olarak çok önemli rollere sahiptir. Bu protein, ubikuitinle işaretlenmiş proteinlerin proteazomal yıkımı için tanınması ve yönlendirilmesinde anahtar bir rol oynar. Rpn10, hem sitozolik ortamda serbest halde bulunabilir hem de proteazom kompleksinin bir bölümü olarak çalışabilir[25, 26].

Rpn10, ubikuitin-proteazom sistemi içinde merkezi bir adaptör proteindir. Poliubikuitin zincirlerini tanıma, adaptör proteinlerle etkileşim ve proteazomal degradasyonun etkinliğini artırma gibi işlevleriyle, hücrel protein dengesinin korunmasında hayati bir rol oynar[23, 27].

3.4.1. Yapısal Özellikler

Rpn10, çeşitli domainlere sahip bir proteindir. Bu domainler şunlardır[29] (Şekil 3.5):

- **VWFA (von Willebrand Faktör Tip A):** Proteazomun diğer alt birimleriyle etkileşimde rol oynar.
- **UIM (Ubikuitin ile Etkileşim Motifi):** Rpn10'un poliubikuitin zincirlerini tanımasını sağlar. Özellikle iki önemli UIM, RAD23A ve Dsk2 gibi adaptör protein-



Şekil 3.5: Rpn10 moleküler yapısı. Model AF-P55036-F1-v4 (AlphaFold) [28]

lerin bağlanmasında kritik rol oynar.

- **SAM (Steril Alfa Motifi):** Protein-protein etkileşimlerini destekler ve proteazomun yapısal bütünlüğünü korur.

3.4.2. Fonksiyonel Roller

- **Ubikuitin Tanıma ve Bağlanma:** Rpn10, poliubikuitin zincirlerini tanıyarak proteazoma taşır. Özellikle K48 bağlantılı poliubikuitin zincirlerine olan yüksek bağlanma afinitesi, hedef proteinlerin proteazoma doğru bir şekilde yönlendirilmesini sağlar. Bu bağlanma, RAD23A ve Dsk2 gibi adaptör proteinler aracılığıyla da desteklenir.
- **Proteazomun Yapısal Bütünlüğü:** Rpn10, 19S düzenleyici partikülün yapısal stabilitesini korumada önemli bir rol oynar. Bu stabilite, proteazomun karmaşık işlevlerini yerine getirmesi için hayati önem taşır.
- **Adaptör Proteinlerle Etkileşim:** Rpn10, RAD23A ve Dsk2 gibi adaptör proteinlerin docking alt birimi olarak çalışır. RAD23A ve Dsk2, ubikuitinle işaretlenmiş proteinleri Rpn10'a taşıyarak proteazomal degradasyonun hassasiyetini ve etkin-

liğini artırır.

- **Hedef Proteinlerin Seçimi:** Rpn10, multiubikuitin zincirlerini tercih ederek hedef proteinlerin yıkım için doğru bir şekilde tanınmasını sağlar. Bu fonksiyon, proteazomal degradasyonun spesifikliğini artırarak yanlış proteinlerin yıkımını önler.

3.4.3. Klinik Önemi

Rpn10'un işlevindeki bozukluklar, proteazomal degradasyonun etkinliğini azaltarak hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimine yol açabilir. Bu durum, nörode-jeneratif hastalıklar (örneğin, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), kardiyovasküler rahatsızlıklar ve kanser gibi çeşitli patolojilerle ilişkili olabilir. Bu nedenle, Rpn10 ve bağlı alt birimler, terapötik hedefler ve biyobelirteçler olarak potansiyel taşıır.

3.5. SIK2

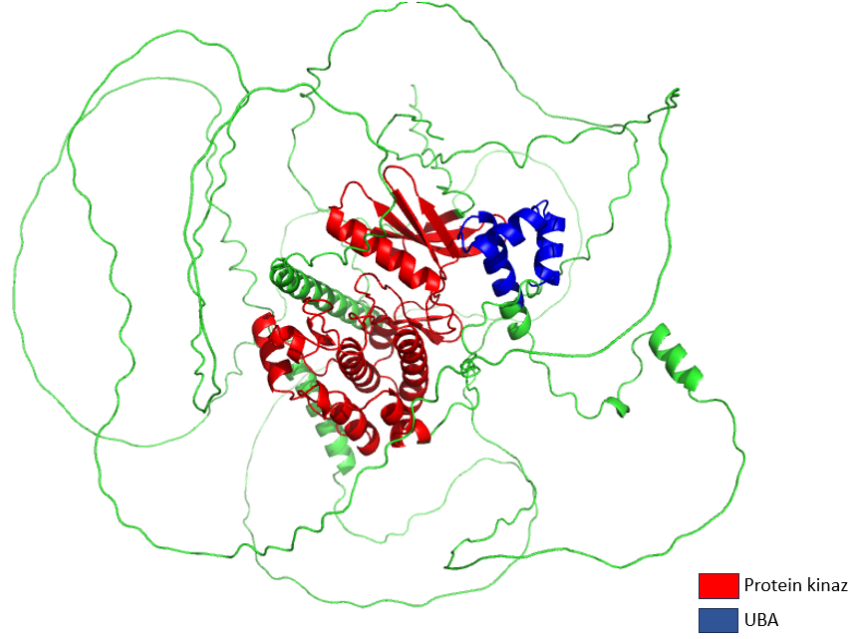
SIK2 (Salt-Inducible Kinase 2), serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesi olup, çok çeşitli biyolojik süreçlerde düzenleyici rol oynayan önemli bir proteindir (Şekil 3.6). İlk kez fare adipöz dokusunda tanımlanmış olan SIK2, metabolik düzenlemede ve insülin sinyal yolağında kritik görevler üstlenir[30].

SIK2, 3T3-L1 adipositlerinde ve beyaz adipöz dokusunda (WAT) farklılaşma sürecinde aktive olan bir proteindir. SIK2 geni, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynayan bir serin/treonin kinaz kodlar. Bu protein, substratının fosforilasyonu yoluyla biyolojik fonksiyonları modüle eder[30, 31].

SIK2, protein fosforilasyonu yoluyla metabolik denge ve enerji homeostazının sağlan-masında kritik bir rol oynar. Bu fonksiyonları, SIK2'yi hem temel biyolojik araştırmalar hem de klinik uygulamalar için önemli bir hedef haline getirir.

3.5.1. Fonksiyonel Roller

- **İnsülin Sinyalizasyonunda Rolü:** SIK2, insülin reseptör substratı-1 (IRS1) üz-erinde Ser-794 kalıntısını fosforile ederek insülin sinyal yolağını modüle eder. Bu fosforilasyon, insülin sinyalizasyonunun etkinliğini etkiler ve insülin direnci



Şekil 3.6: SIK2 Moleküler yapısı. Model AF-Q9H0K1-F1 (Aplhafold) [32]

ile ilişkili durumlarda artış gösterebilir. Bu özelliğiyle SIK2, tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıkların gelişiminde rol oynayabilir.

- **Glikoz ve Lipid Metabolizması:** SIK2, hepatositlerde ve adipositlerde glikoz ve lipid metabolizmasını düzenler. Özellikle CRT2'nin fosforilasyonu yoluyla glukoneogenezi inhibe eder ve insülinin refeeding sırasında glukoneojenik gen ekspresyonunu azaltmasına katkıda bulunur. p300'ü fosforile ederek yağ asidi sentezini ve lipogenezi sınırlayan mekanizmaları destekler.
- **Enerji Dengesi ve Stres Yanıtı:** SIK2, stres ve hormonal uyarılara yanıt olarak enerji metabolizmasını düzenler. Glikoz alımını teşvik ederken GLUT4 ekspresyonunu ve histon deasetilaz-4 (HDAC4) fosforilasyonu üzerinden insülin aracılı süreçleri modüle eder.
- **Diğer Fonksiyonlar:** SIK2, otofaji ve bağışıklık yanıtlarında da görev alır. Özellikle p300'ü fosforile ederek transkripsiyonel düzenlemeyi etkiler ve belirli transkripsiyon faktörlerinin (PPARA ve MLXIPL gibi) DNA'ya bağlanma yeteneğini modüle eder.

3.5.2. Rad23A ile Olası İlişkisi

Bu tez çalışmasında, aktif SIK2 proteininin Rad23A proteinini fosforile edebileceği ve bunun Rad23A'nın etkinliğini düzenleyebileceği hipotezi üzerine odaklanılmıştır. Bu hipotez, Rad23A'nın protein yıkımı sürecindeki rolünü ve SIK2'nin bu süreçteki potansiyel düzenleyici etkisini anlamayı amaçlamaktadır.

3.5.3. Klinik Önemi

SIK2'nin metabolik hastalıklar, tip 2 diyabet ve kanser gibi durumlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. SIK2'nin etkinliğini artıran veya azaltan terapötik yaklaşımlar, bu hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak etkili olabilir. Ek olarak, SIK2'nin otofaji ve bağışıklık yanıtlarındaki rolü, iltihaplanma ve enfeksiyonlarla ilişkili hastalıkları anlamada yeni yollar açabilir.

4. METODLAR

Bu bölümde, çalışma sürecinde kullanılan metodlar detaylı bir şekilde sunulmuş, uygulama adımları ve temel kavramlar özetlenmiştir. Bu yöntemler, protein-protein etkileşimlerini incelemek, moleküler seviyede dinamik davranışlarını analiz etmek ve bu çalışmanın bilimsel temelini oluşturan teknikleri kapsamaktadır.

4.1. Protein-Protein Docking

Protein-protein docking, iki proteinin olası etkileşim modunu tahmin etmek için kullanılan bir hesapsal biyoloji yöntemidir[33]. Bu çalışmada, docking analizi RAD23A ve SIK2 proteini arasındaki potansiyel bağlantıyı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Docking işlemi, proteinlerin bağlanma bölgelerindeki moleküler etkileşimleri simüle ederek en olası kompleks yapılarını tahmin etmeyi amaçlar. Bu tür analizlerde, genellikle deneysel veriler veya biyolojik olarak anlamlı bilgiler kullanılarak bağlanma modları optimize edilir.

Docking sürecinde aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Hazırlık:

- Docking işleminde kullanılan proteinlerin üç boyutlu yapıları Protein Data Bank (PDB) veri tabanından indirilmiştir.
- Protein yapılarındaki eksik atomlar ve yan zincirler modellerle tamamlanmış, kristal yapıdaki çözücü moleküller ve iyonlar temizlenmiştir.
- Proteinlerin bağlanma bölgelerindeki aktif ve pasif kalıntılar belirlenmiştir.

2. Aktif ve Pasif Kalıntılar:

- RAD23A ve SIK2'nin deneysel verilere veya literatüre dayalı olarak bilinen bağlanma bölgeleri docking analizine dahil edilmiştir.
- HADDOCK gibi yazılımlar, aktif bölgelerin esnekliğini dikkate alarak etkileşimleri optimize etmiştir.

3. Docking Uygulaması:

- Docking analizi için HADDOCK yazılımı kullanılmıştır. HADDOCK, deneysel kısıtlamalara dayalı olarak protein-protein etkileşimlerini modelleyen esnek bir

platformdur.

- HADDOCK, belirlenen aktif ve pasif bölgeleri dikkate alarak enerji minimizasyonu ve moleküler dinamik yöntemleri ile kompleks yapılarını simüle etmiştir.

4. Sonuçların Analizi:

- HADDOCK tarafından oluşturulan modeller, bağlanma enerjileri ve geometrik parametreler açısından sıralanmıştır.

- En uygun kompleks yapıları, toplam enerji, bağlanma enerjisi (Coulomb ve van der Waals) ve arayüz alanına dayalı olarak seçilmiştir.

Docking işlemleri sırasında, HADDOCK gibi yazılımlar iki ana strateji kullanır[33]:

- Rigid Docking: Proteinlerin bağlanma sırasında yapısal esneklik göstermediği varsayımı ile hızlı ve ilk tahminlerin yapılması.
- Flexible Docking: Proteinlerin bağlanma sırasında dinamik yapısal değişikliklerini dikkate alarak daha doğru sonuçlar elde edilmesi.

Bu çalışmada, özellikle esnek docking yaklaşımı kullanılmış ve RAD23A ile SIK2 arasındaki olası bağlanma bölgeleri belirlenmiştir. Analiz sonuçları, bu iki protein arasındaki etkileşim mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamıştır.

4.2. Yapı Hizalama

Yapı hizalama, moleküler modelleme ve simülasyon çalışmalarında hem ön hazırlık aşamasında hem de analiz sürecinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, iki ya da daha fazla protein yapısının ortak yapısal özelliklerine göre hizalanarak üst üste çakıştırılmasını sağlar. Böylece moleküller arasındaki konformasyonel benzerlikler, farklar ve etkileşim bölgeleri daha net bir şekilde analiz edilebilir. Bu çalışmada yapı hizalama iki temel amaçla kullanılmıştır:

1. Kompleks Yapıların Oluşturulması

Bu çalışmada bazı protein-protein komplekslerin moleküler yapıları doğrudan deneysel verilerden elde edilemediği için, farklı protein modelleri hizalanarak yeni yapılar oluşturulmuştur. Bu amaçla, aynı veya benzer proteinleri içeren yapılar arasında yapı hizalaması gerçekleştirilmiş ve üst üste gelen bölgelerden biri çıkartılarak biyolojik olarak anlamlı tek bir yapı elde edilmiştir.

Örnek olarak; 1oqy ve 1p9d PDB modelleri hizalanmış, her iki yapıda da ortak olan RAD23A proteini referans alınarak hizalama yapılmıştır. Ardından 1p9d yapısında bulunan ve 1oqy’de halihazırda yer alan UBL domaini silinmiş; sadece S5A ile RAD23A’nın diğer bölgelerini içeren bir kompleks yapı elde edilmiştir. Bu yapı, daha sonra moleküler dinamik simülasyonları için kullanılmıştır.

Bu yaklaşım, deneysel olarak elde edilmemiş çoklu protein komplekslerinin hibrid modelleme yoluyla oluşturulmasına olanak tanımıştır. Yapı hizalama, farklı PDB dosyalarının içeriğindeki benzer bölgelerin örtüştürülmesiyle güvenilir başlangıç yapıları hazırlamak için kullanılmıştır.

2. Simülasyonlar Arası Yapısal Karşılaştırma

Yapı hizalama aynı zamanda simülasyon öncesi ve sonrası moleküler yapıların karşılaştırılması amacıyla da kullanılmıştır. RAD23A proteininin farklı simülasyon koşullarında gösterdiği konformasyonel değişiklikleri anlamak amacıyla, simülasyonların başlangıç ve bitiş yapılarına hizalama uygulanmıştır. Böylece, proteinin farklı koşullar altındaki yapısal stabilitesi, hareketlilik düzeyi ve genel şekil değişimi değerlendirilmiştir.

Bu analizlerde PyMOL yazılımı kullanılmış; RMSD temelli otomatik hizalama yöntemleriyle farklı zaman noktalarındaki yapılar üst üste çakıştırılarak görsel ve sayısal değerlendirmeler yapılmıştır. Ayrıca farklı simülasyonlardan elde edilen RAD23A yapıları da hizalanarak, sistemin hangi durumlarda daha stabil ya da esnek olduğu karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

4.3. Moleküler Dinamik Simülasyonları

Moleküler dinamik (MD) simülasyonları, biyolojik sistemlerin atomik seviyedeki hareketlerini zaman içinde simüle etmek için kullanılan güçlü bir hesapsal yöntemdir. Bu yöntem, Newton’un hareket denklemlerine dayanarak moleküllerin konum ve hızlarının belirli zaman aralıklarında güncellenmesini sağlar. MD simülasyonları, proteinler, nükleik asitler, lipidler ve diğer biyomoleküler sistemlerin dinamik özelliklerini anlamak için yaygın olarak kullanılır. Bu simülasyonlar, biyomoleküler yapıların stabilitesini, esnekliğini ve işlevsel mekanizmalarını ortaya koymak için moleküllerin zamana bağlı etkileşimlerini analiz eder.

MD simülasyonlarında, sistemin atomları arasındaki bağ kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri gibi fiziksel etkileşimler bir kuvvet alanı ile tanımlanır. Bu tezde, **GROMACS** yazılımı kullanılarak MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. GROMACS, biyomoleküler sistemlerin simülasyonlarında geniş ölçekte kullanılan, yüksek performanslı ve esnek bir MD simülasyon yazılımıdır [34, 35].

MD simülasyonlarının temel prensibi, sistemdeki atomların birbirleriyle olan kuvvetlerini ve potansiyel enerjilerini bir kuvvet alanı (force field) aracılığıyla tanımlamaktır. Kuvvet alanları, atomlar arasındaki bağ kuvvetlerini, elektrostatik etkileşimleri ve van der Waals kuvvetlerini içeren matematiksel fonksiyonlardan oluşur. Bu tezde kullanılan **OPLS-AA** kuvvet alanı, proteinler, organik moleküller ve küçük biyolojik sistemler için optimize edilmiş bir kuvvet alanıdır ve sistemin fiziksel ve kimyasal özelliklerini doğru bir şekilde modellemek için geniş kapsamlı bir parametre setine sahiptir[36].

MD simülasyonları sırasında, sistemin doğru bir şekilde modellenmesi için çeşitli başlangıç işlemleri yapılır. Bu işlemler enerji minimizasyonu, dengeleme fazları (NVT ve NPT) ve serbest simülasyon (üretim fazı) gibi adımları içerir. Simülasyon boyunca periyodik sınır koşulları uygulanır ve uzun menzilli elektrostatik etkileşimlerin hesaplanmasında Particle Mesh Ewald (PME) yöntemi tercih edilir. Bu tez çalışmasında, solvent molekülleri için **SPC/E** su modeli kullanılmıştır. Bu su modeli, biyolojik sistemlerdeki hidrolitik dinamikleri ve protein-su etkileşimlerini doğru bir şekilde modellemek için geliştirilmiştir[34, 35].

Bu tezde, farklı proteinlerin ve protein-protein komplekslerinin dinamik özelliklerini incelemek amacıyla çeşitli moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir simülasyon, sistemin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak, dinamik dengeye ulaşmasını sağlamak ve biyolojik süreçlerdeki işlevlerini açıklamak için özel olarak tasarlanmıştır. Bu simülasyonlar, gelecekteki biyokimyasal deneylerin temelini oluşturacak bilgiler sağlamaktadır.

Moleküler dinamik koşumlarında kullanılan komutlar için **EK-B MD similasyonlarında kullanılan komutlar** bölümüne bakınız. Moleküler dinamik koşumlarında kullanılan MDP dosyaları ve parametreler için **EK-A MD similasyonlarında Kullanılan mdp dosyaları** bölümüne bakınız.

4.3.1. Enerji Minimizasyonu

Enerji minimizasyonu, moleküler dinamik simülasyonlarının ilk aşamalarından biridir ve sistemdeki atomlar arasındaki fiziksel olmayan çakışmaları ve yüksek enerjili durumları ortadan kaldırmayı amaçlar. Simülasyona başlamadan önce, protein yapısındaki veya diğer moleküllerdeki yüksek enerjili çakışmalar simülasyonun dengesizliğine yol açabilir. Bu nedenle, enerji minimizasyonu ile sistem, fiziksel olarak anlamlı bir konuma getirilir.

Enerji minimizasyonu, sistemin potansiyel enerji yüzeyinde daha düşük enerjiye sahip bir duruma geçmesini sağlar. Minimizasyon sırasında, atomların pozisyonları, kuvvet alanı parametrelerine dayanarak optimize edilir. Bu işlem, hem biyolojik moleküllerin hem de solventin stabilitesini artırır ve simülasyonun sonraki aşamaları için uygun bir başlangıç durumu oluşturur.

Minimizasyon işlemi için steepest descent algoritması tercih edilmiştir. Bu algoritma, her adımda potansiyel enerjiyi azaltarak sistemin daha kararlı bir enerji durumuna ulaşmasını sağlar. İşlem sırasında, protein atomlarına pozisyon kısıtlamaları uygulanarak su molekülleri ve iyonların serbest hareket etmeleri sağlanmıştır[37].

Kullanılan minimizasyon parametreleri aşağıdaki gibidir:

- Entegratör: Steepest descent yöntemi kullanılmıştır.
- Adım Sayısı (nsteps): 50.000 adım boyunca minimizasyon gerçekleştirilmiştir.
- Enerji Toleransı (emtol): Minimizasyon işlemi sırasında sistemin toplam kuvveti, 100 kJ/mol/nm'nin altına indiğinde işlem sonlandırılmıştır.
- Adım Büyüklüğü (emstep): 0.01 nm olarak belirlenmiştir.

Aşağıda, minimizasyon işlemi sırasında kullanılan belirli parametrelerin kısa açıklamaları verilmiştir:

- Coulomb Etkileşimleri: Elektrostatik etkileşimler PME (Particle Mesh Ewald) yöntemi ile hesaplanmıştır. Coulomb kesme yarıçapı 1.4 nm olarak ayarlanmıştır.
- Van der Waals Etkileşimleri: Van der Waals etkileşimleri için kuvvet alanında kesme yarıçapı 1.4 nm olarak belirlenmiş ve force-switch yöntemi kullanılmıştır.
- Sınır Koşulları: Sistem, periyodik sınır koşulları (PBC) ile çevrilmiştir. Bu,

simülasyon kutusunun kenarlarından çıkan atomların karşı tarafta tekrar görünmesini sağlar.

- Konum Kısıtlamaları: Protein atomları için pozisyon kısıtlamaları uygulanmıştır. Bu, protein yapısının minimize sırasında deformasyonunu önlemek için önemlidir.
- Dispersiyon Düzeltmesi: Uzun menzilli dispersiyon etkileri için enerji ve basınç düzeltmeleri uygulanmıştır.

Enerji minimizasyonu sonucunda, simülasyonun başlangıç durumu fiziksel anlamda daha kararlı hale getirilmiştir. Bu adımın tamamlanması, sonraki dengeleme ve üretim aşamalarının sorunsuz bir şekilde yürütülmesi için gereklidir.

4.3.2. Dengeleme Fazı (NVT ve NPT)

Moleküler dinamik simülasyonlarında dengeleme fazı, enerji minimizasyonunun ardından sistemin kararlı bir duruma ulaşmasını sağlamak için kritik bir adımdır. Bu süreçte, sistemin enerji, sıcaklık, yoğunluk ve basınç gibi fiziksel parametreleri belirli bir dengeye oturtulur. Dengeleme, sistemin biyolojik gerçekliklere uygun hale getirilmesini sağlar ve üretim (serbest simülasyon) fazına doğru başlangıç koşullarını oluşturur [37].

Dengeleme iki aşamada gerçekleştirilir:

- NVT (Sabit Hacim ve Sıcaklık): Sistem sabit bir hacimde tutulurken, sıcaklık belirlenen değere dengelenir.
- NPT (Sabit Basınç ve Sıcaklık): Sistem, sabit bir sıcaklıkta basınca adapte edilir.

NVT aşaması, solvent molekülleri ve iyonların sisteme uyum sağlaması için önemlidir. NPT aşamasında ise sistemin yoğunluğu ve hacmi, biyolojik ve fiziksel gerçeklikleri yansıtabilecek şekilde ayarlanır. Bu çalışmada her iki aşama da hassas bir şekilde optimize edilmiştir.

NVT fazında, sistemin sıcaklığı hedeflenen değere ulaştırılır ve kararlı bir sıcaklık profili elde edilir. Bu fazda, protein yapısını korumak amacıyla protein atomlarına pozisyon kısıtlamaları uygulanır. Böylece solvent molekülleri ve iyonlar serbestçe hareket ederek dengeye ulaşır.

Bu çalışmada NVT fazı sırasında sıcaklık kontrolü için genellikle V-rescale (Modified Berendsen thermostat) kullanılmıştır. Bu termostat, sıcaklığı sabit bir seviyede tutarken

enerji değişikliklerini kontrol eder ve sistemin dinamik özelliklerini korur.

NPT fazında, sistemin basıncı hedeflenen seviyeye ayarlanır ve yoğunluk optimize edilir. NPT fazı genellikle iki aşamada gerçekleştirilmiştir:

- Hızlı Dengeleme: İlk aşamada, daha hızlı bir dengeleme sağlamak için Berendsen barostati kullanılmıştır.
- Hassas Dengeleme: İkinci aşamada, daha hassas bir basınç kontrolü ve kararlılık için Parrinello-Rahman barostati tercih edilmiştir.

NPT fazı, sistemin biyolojik olarak anlamlı bir dengeye ulaşmasını sağlarken, simülasyonun başlangıç yapısının bozulmasını önler.

Kullanılan Yaklaşımlar

- Sıcaklık Kontrolü: Protein ve solvent molekülleri ayrı gruplar olarak tanımlanmış ve her biri için bağımsız sıcaklık kontrolü uygulanmıştır. Bu yaklaşım, sistemin homojen bir sıcaklık dağılımına sahip olmasını sağlamıştır.
- Basınç Kontrolü: Sistemin basıncı izotropik olarak kontrol edilmiştir ve hacim değişiklikleri eşit olarak dağıtılmıştır.

Dengeleme süreci, sistemin başlangıçtaki fiziksel olmayan özelliklerini gidermiş ve biyolojik olarak anlamlı bir yapıya ulaşılmasını sağlamıştır. Bu süreç, üretim simülasyonlarının doğruluğunu artırmış ve simülasyon sonuçlarının güvenilir olmasını temin etmiştir.

Bu tezde gerçekleştirilen dengeleme fazları, proteinlerin ve protein-protein komplekslerinin dinamik özelliklerini incelemek için bir temel oluşturmuş ve simülasyonların başarılı bir şekilde ilerlemesine katkıda bulunmuştur.

4.3.3. Moleküler Dinamik Koşu (MD Run)

Bu çalışmada, proteinlerin zamana bağlı atomik hareketlerini modellemek için çeşitli moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Enerji minimizasyonu ve dengeleme (NVT ve NPT) aşamalarının ardından sistemler üretim fazına alınarak serbest simülasyon süreci başlatılmıştır [37].

Her bir koşuda, protein yapılarına ait atomik konumlar, belirli zaman adımlarında güncel-

lenerek sistemin doğal ortamındaki dinamik davranışı simüle edilmiştir. Simülasyonlar boyunca sıcaklık, basınç ve diğer fiziksel parametreler sabit tutulmuş; protein-protein etkileşimleri ve yapısal kararlılık analiz edilmiştir.

Simülasyon süresince konformasyonel değişikliklerin izlenebilmesi amacıyla her sistem için 100 veya 200 nanosaniye simülasyonlar uygulanmış; bazı durumlarda üçlü tekrarlar (replikalar) kullanılarak elde edilen verilerin istatistiksel güvenilirliği artırılmıştır.

Moleküler dinamik simülasyonları çizelgesinde (Çizelge 4.1), bu tez kapsamında yürütülen tüm moleküler dinamik simülasyonlarının detayları özetlenmiştir (Gerçekleştirilen simülasyonlara ait başlangıç modelleri şekil 4.1):

Çizelge 4.1: Bu tez kapsamında gerçekleştirilen moleküler dinamik simülasyonları

Simülasyon Sistemi	Süre	Tekrar Sayısı	Model Detayı
SIK2	100 ns	3 tekrar	AlphaFold modeli, manuel yapısal düzenleme yapılmıştır.
RAD23A(1oqy-model1)	100 ns	2 tekrar	Kristal yapı tabanlı model kullanılmıştır.
RAD23A(1oqy-model1)	200 ns	2 tekrar	Uzun süreli simülasyon ile konformasyonel değişim gözlemlenmiştir.
RAD23A(1oqy-model1)	400 ns	1 tekrar	Uzun süreli simülasyon ile konformasyonel değişim gözlemlenmiştir.
Ubikuitin-RAD23A kompleksi	100 ns	2 tekrar	1oqy-model1 üzerine manuel olarak ubikuitin eklenmiştir.
S5A-RAD23A-UbK48 kompleksi	100 ns	2 tekrar	1oqy yapısı, 1zo6 ve 1q9d ile hizalanmış; fazlalık moleküller çıkarılmıştır.
S5A-UbRAD23A-UbK48 kompleksi	100 ns	2 tekrar	Önceki yapıya manuel olarak ikinci bir ubikuitin eklenmiştir.

4.3.4. Kısıtlama (Restraint)

Moleküler dinamik simülasyonlarında “kısıtlama” (restraint) terimi, sistemdeki belirli atomların veya atom gruplarının hareketlerinin sınırlandırılması anlamına gelir. Bu yöntem, özellikle simülasyonun belirli bölgelerinde yapısal bütünlüğü korumak, doğal sistemlerdeki sabit konumları taklit etmek ya da belirli etkileşimleri daha gerçekçi bir şekilde modellemek için kullanılır. Uygulanan kısıtlamalar, genellikle atomların uzaydaki konumlarını sabit tutmak yerine, onların yalnızca sınırlı bir hareket aralığında salınım yapmalarına olanak tanır. Böylece sistemin geri kalanı serbestçe dinamik davranış sergilerken, belirli bölgelerin konformasyonel stabilitesi korunur [37].

Bu tez çalışmasında, yalnızca belirli bir kompleks yapısına yönelik olarak kısıtlama uygulanmıştır. S5A–UbRAD23A–UbK48 kompleksine ait simülasyonlarda, S5A molekülünün alfa karbonlarına konum kısıtlaması uygulanmıştır. Bu yaklaşımın temel amacı, S5A’nın proteozom içindeki doğal konumuna benzer şekilde sabitlenmesini sağlamaktır.

S5A (aynı zamanda PSMD4 olarak da bilinir), 26S proteozomunun 19S düzenleyici alt birimi içinde yer alan ve Rpn10 olarak tanımlanan bir proteinin parçasıdır. Bu alt birim, proteazomal degradasyon sürecinde ubiquitin zincirlerini tanıyan ve substratların yönlendirilmesini kolaylaştıran önemli bir adaptör görevi üstlenmektedir. Ancak bu çalışmada yalnızca S5A’nın yapısı simülasyon sistemine dahil edilmiş olup, proteozomun geri kalan yapısı modellenmemiştir. Bu nedenle, proteozom ortamını taklit edebilmek ve simülasyon sırasında yapay bir konum kaymasının önüne geçmek için S5A’nın alfa karbonlarına kısıtlama uygulanmıştır.

Bu kısıtlama sayesinde, RAD23A ve ubiquitin zincirleri ile olan etkileşimlerin daha gerçekçi bir şekilde gözlemlenmesi hedeflenmiş; sistemin dinamik davranışları proteozomal bağlamda modellenmiştir.

4.3.5. Mesafe Kısıtlaması (Distance Restraint)

Moleküler dinamik simülasyonlarında mesafe kısıtlaması, belirli atom çiftleri arasındaki uzaklığın belirli bir aralıkta tutulmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu tür kısıtlamalar, özellikle biyolojik olarak anlamlı etkileşimlerin, kovalent bağların veya protein modifikasyonlarının simülasyon ortamında taklit edilmesi gerektiğinde kullanılır. Atomlar

arasında doğrudan kovalent bağ tanımlanamadığı durumlarda, bu yöntem bağ benzeri davranışları modellemek için tercih edilir. Mesafe kısıtlamaları, sistemin kuvvet alanına eklenen potansiyel enerji terimleriyle uygulanır ve ilgili atom çiftlerinin birbirine belirli mesafelerde kalmasını sağlar[37].

Bu çalışmada mesafe kısıtlamaları, ubikuitin modifikasyonlarının simülasyon ortamında doğru şekilde temsil edilebilmesi için kullanılmıştır. Ubikuitin proteine bağlandığında, hedef proteinin lizini (Lys, K) ile ubikuitinin C-terminal glisin kalıntısı (Gly, G76) arasında bir izopeptid bağı oluşur. Bu bağ, klasik peptid bağından farklı olarak bir yan zincir (ϵ -amino grubu) ile karboksil grubu arasında kurulan kovalent bir bağ türüdür. Ubikuitin modifikasyonları biyolojik olarak bu izopeptid bağıyla gerçekleştirilse de, simülasyon sisteminde bu bağ doğrudan tanımlanamadığından dolayı mesafe kısıtlaması yoluyla taklit edilmiştir.

Bu kapsamda uygulanan kısıtlamalar şunlardır:

UbRAD23A simülasyonlarında, RAD23A'nın K122 kalıntısındaki epsilon azotu (NZ) ile ubikuitinin G76 kalıntısındaki karboksil karbonu (C) arasında mesafe kısıtı uygulanmıştır. Bu, tekli ubikuitinlenmiş RAD23A modelini temsil etmektedir.

UbK48 zinciri içeren komplekslerde (örneğin S5A–UbRAD23A–UbK48 kompleksi), birinci ubikuitin molekülündeki K48-NZ ile ikinci ubikuitin molekülündeki G76-C atomları arasında benzer şekilde mesafe kısıtı tanımlanmıştır. Bu sayede, K48 bağlantılı poliubikuitin zincirinin yapısal bütünlüğü korunmuştur.

Bu kısıtlamaların uygulanabilmesi için GROMACS yazılımında aşağıdaki biçimde bir 'distance_restraints' tanımı yapılmıştır:

```
[ distance_restraints ]
; ai    aj    type    index    type'    low    up1    up2    fac
  1868   6714    1        0        1      0.15   0.20   0.25   1.0
```

Farklı simülasyon zamanlarındaki protein yapılarının RMSD tabanlı olarak hizalanması, yapısal değişikliklerin analizini kolaylaştırmıştır. Bu analiz için PyMOL kullanılmıştır.

4.4. Moleküler Dinamik Analizleri

Moleküler dinamik (MD) simülasyonları, biyomoleküllerin zaman içindeki atomik düzeydeki davranışlarını modellemek için güçlü bir araçtır. Ancak bu simülasyonların bilimsel anlamda yorumlanabilmesi için simülasyon sonrası elde edilen verilerin detaylı şekilde analiz edilmesi gereklidir. MD analizleri, simülasyon sırasında elde edilen konformasyonel verilerin istatistiksel, yapısal ve enerjetik yönlerden değerlendirilmesini sağlayarak proteinlerin stabilitesi, esnekliği, etkileşim yüzeyleri ve bağlanma enerjileri gibi çok sayıda parametreyi anlamaya yardımcı olur[34, 35, 37?].

Bu tez çalışmasında, gerçekleştirilmiş olan MD simülasyonlarının doğruluğunu, kararlılığını ve biyolojik anlamını değerlendirebilmek amacıyla çeşitli analiz yöntemleri uygulanmıştır. Bu analizler hem bireysel proteinler (örneğin RAD23A veya SIK2) hem de protein-protein kompleksleri (örneğin RAD23A-ubikuitin, RAD23A-S5A gibi) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Moleküler dinamik analizlerinde kullanılan komutlar için **EK-C MD analizlerinde kullanılan komutlar** bölümüne bakınız.

Analiz sürecinde uygulanan başlıca yöntemler şunlardır:

- **Yapısal Stabilité Analizleri:** Simülasyon boyunca yapıların genel stabilitesini değerlendirmek amacıyla **kök ortalama kare sapma (RMSD)**, **kök ortalama kare dalgalanma (RMSF)** ve **kütle merkezi yarıçapı (Radius of Gyration)** gibi metrikler hesaplanmıştır.
- **Çözünebilirlik ve Yüzey Etkileşimi:** Proteinlerin solvent ile olan ilişkisini belirlemek için **çözünebilir yüzey alanı (SASA)** analizleri yapılmıştır.
- **İnteraktif Davranışlar:** Protein içi veya proteinler arası **hidrojen bağları**, **elektrostatik (Coulomb)** ve **van der Waals (Lennard-Jones)** etkileşimleri hesaplanarak moleküller arası etkileşimlerin doğası incelenmiştir.
- **Konformasyonel Değişimler ve Hareketlilik:** Zaman içerisinde oluşan yapısal dönüşümleri daha geniş bir perspektiften incelemek için **temel bileşen analizi (PCA)** kullanılmıştır.
- **Yapısal Gruplama:** Simülasyon boyunca oluşan farklı yapısal durumları belirlemek için **kümelenme (cluster)** analizi uygulanmıştır.

Bu analizlerin tümü, simülasyonların güvenilirliğini değerlendirmek ve proteinlerin biyolojik fonksiyonları ile ilişkilendirilebilecek yapısal özelliklerini ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. Her analiz, ilgili alt başlıklar altında detaylı olarak sunulacaktır.

4.4.1. Validasyon Analizleri

Moleküler dinamik simülasyonlarının güvenilir sonuçlar verebilmesi için, simülasyon sürecinin çeşitli fiziksel ve termodinamik parametreler açısından doğrulanması gereklidir. Bu doğrulama, genellikle sistemin enerjik ve çevresel dengelerinin sağlanıp sağlanmadığını değerlendirmek amacıyla yapılan temel analizler yoluyla gerçekleştirilir. Bu analizler, simülasyonun başarıyla ilerlediğini, sistemin kararlı bir yapıya ulaştığını ve sonuçların bilimsel olarak geçerli olduğunu gösterir[37].

Bu tez çalışmasında, moleküler dinamik simülasyonlarının geçerliliğini değerlendirmek amacıyla aşağıdaki temel parametreler analiz edilmiştir:

- **Potansiyel Enerji:**

Enerji minimizasyonu aşamasında sistemin toplam potansiyel enerjisinin zamanla nasıl azaldığı gözlemlenmiştir. Potansiyel enerji eğrisinin düzgün ve sürekli bir şekilde minimuma inmesi, başlangıç yapısındaki sterik çakışmaların giderildiğini ve sistemin fiziksel olarak anlamlı bir yapıya ulaştığını göstermektedir.

- **Sıcaklık:**

NVT dengeleme fazında sistemin hedeflenen sıcaklığa ulaşp ulaşmadığı ve bu sıcaklığı simülasyon boyunca ne kadar kararlı tuttuğu incelenmiştir. Sıcaklığın ani dalgalanmalar göstermeden sabit kalması, termal dengelemenin başarıyla sağlandığını ifade eder.

- **Basınç:**

NPT dengeleme fazlarında basıncın simülasyon boyunca hedeflenen değer etrafında kararlı olup olmadığı analiz edilmiştir. Özellikle biyolojik sistemlerde, basınç kararlılığı hacimsel değişimlerin önüne geçmek açısından kritiktir.

- **Yoğunluk:**

Sistemdeki atomik dağılımın doğrallığını ölçmek için yoğunluk hesaplamaları yapılmıştır. Bu analiz, sistemin uygun çözücü ile yeterince dengelenip dengelenmediğini ve gerçek biyolojik koşullara yakın olup olmadığını değerlendirmek

açısından önemlidir.

Bu validasyon analizleri sonucunda elde edilen veriler, simülasyonların stabil bir şekilde ilerlediğini ve sistemlerin fiziksel olarak dengeli olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerlerinin kısa bir adaptasyon sürecinin ardından hedeflenen aralıkta sabitlenmesi, üretim simülasyonlarının sağlam bir temele dayandığını göstermektedir.

4.4.2. RMSD (Kök Ortalama Kare Sapma)

RMSD (Kök Ortalama Kare Sapma), moleküler dinamik simülasyonlarının en temel ve yaygın kullanılan analizlerinden biridir. Bu metrik, bir molekülün zaman içerisindeki konformasyonel değişimini nicel olarak değerlendirmek amacıyla kullanılır. RMSD, belirli bir referans yapıya göre atomların konumsal sapmalarını ölçerek, sistemin yapısal stabilitesi hakkında bilgi sağlar[38].

Bu çalışmada, RMSD hesaplamaları simülasyonun başlangıcındaki yapı referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Analiz, proteinlerin ana zincir atomları üzerinden yapılmış ve simülasyon süresi boyunca yapıların bu referans konuma göre ne ölçüde sapma gösterdiği takip edilmiştir. RMSD değerlerinin belirli bir süre sonra sabit bir aralıkta salınım göstermesi, sistemin dinamik olarak dengeye ulaştığını ve yapının genel olarak kararlı kaldığını işaret eder.

Özellikle kompleks yapıların simülasyonlarında, RMSD eğrileri sayesinde alt birimler arasındaki bağlanma stabilitesi, ayrışma eğilimleri veya genel yapısal dağılmalar kolaylıkla gözlemlenebilir. Örneğin bu tez kapsamında yapılan RAD23A, SIK2 ve ubikuitin komplekslerinin RMSD analizleri, sistemlerin zamanla yapısal bütünlüklerini koruyup korumadığını belirlemek için temel bir kriter olarak değerlendirilmiştir.

Analiz sonuçları, simülasyonun ilk birkaç nanosaniyesi içinde meydana gelen hızlı konformasyonel adaptasyonu ve ardından gelen daha dengeli bir yapısal evrimi açıkça göstermektedir. Bu bağlamda RMSD, moleküler dinamik simülasyonlarının güvenilirliğini değerlendirmek ve diğer ileri düzey analizlerin temelini oluşturmak için kritik bir ilk adımdır.

4.4.3. RMSF (Kök Ortalama Kare Dalgalanma)

RMSF (Kök Ortalama Kare Dalgalanma), moleküler dinamik simülasyonlarında atom veya kalıntı (residue) düzeyinde konformasyonel esnekliği değerlendirmek amacıyla kullanılan önemli bir analiz yöntemidir. RMSF, her bir atomun veya kalıntının simülasyon boyunca ortalama konumundan ne kadar saptığını ölçerek, molekülün hangi bölgelerinin daha hareketli, hangi bölgelerinin ise daha rijit olduğunu ortaya koyar[39, 40].

Bu çalışmada, proteinlerin kalıntı bazında esnekliğini incelemek amacıyla RMSF analizi gerçekleştirilmiştir. Özellikle RAD23A, SIK2 ve ubikuitin gibi moleküllerde, belirli bölgelerin yapısal hareketliliği veya bağlanma sonrası esneklik değişimleri bu yöntemle değerlendirilmiştir. UBL ve UBA domainleri gibi fonksiyonel bölgelerin düşük RMSF değerleri göstermesi, bu bölgelerin simülasyon süresince stabil kaldığını; buna karşın uç bölgeler veya bağlantı alanlarında gözlenen yüksek RMSF değerleri ise esnek yapıları yansıtmaktadır.

Kompleks yapılar içeren sistemlerde yapılan analizler ise bağlanma arayüzlerinde meydana gelen hareketliliklerin anlaşılmasını sağlamıştır. Özellikle ubikuitin ile etkileşimli bölgelerdeki RMSF değişimleri, proteinin bağlanma sonrası nasıl bir yapısal düzenleme gösterdiğini ortaya koymuştur.

RMSF analizi sayesinde elde edilen bilgiler, protein-protein etkileşimlerinin doğasını anlamak ve fonksiyonel bölgelerdeki yapısal değişimleri değerlendirmek açısından oldukça değerlidir. Ayrıca bu veriler, serbest enerji hesaplamaları ve bağlanma analizleri gibi ileri düzey analizler için de tamamlayıcı nitelik taşır.

4.4.4. SASA (Çözünebilir Yüzey Alanı)

SASA (Solvent Accessible Surface Area – Çözünebilir Yüzey Alanı), bir molekülün solvent ile doğrudan temas eden yüzeyinin büyüklüğünü belirlemek amacıyla kullanılan önemli bir yapısal analiz yöntemidir. Bu metrik, özellikle proteinlerin çözücü ortamda ne ölçüde erişilebilir olduğunu, katlanma derecesini ve yüzeydeki hidrofobik veya hidrofilik bölgelerin dağılımını değerlendirmek için kullanılır[41].

Moleküler dinamik simülasyonlarında, SASA değeri zaman içinde protein yüzeyinin çözünübilirlik durumunu izlemeye olanak tanır. Yapısal kompaktlık, yüzey kapanması,

açığa çıkan bölgeler gibi konformasyonel değişimlerin izlenmesinde de önemli rol oynar.

Bu çalışmada, SASA analizi ile sistemlerdeki proteinlerin zaman içinde solventle olan temas yüzeyleri değerlendirilmiştir. Analizler, hem bireysel protein simülasyonlarında hem de kompleks yapıların modellenmesinde gerçekleştirilmiş ve yüzey etkileşimlerinin incelenmesine olanak sağlamıştır.

SASA, diğer yapısal analizlerle birlikte kullanıldığında, proteinlerin genel stabilitesi ve etkileşim yüzeylerinin konformasyonel durumları hakkında daha kapsamlı bir yapısal değerlendirme sunar. Analizler sırasında belirli atom grupları (örneğin ana zincir veya tüm protein) referans alınarak çözünebilir yüzey alanları hesaplanmıştır.

4.4.5. GYRATE (Kütle Merkezi Yarıçapı)

Kütle merkezi yarıçapı (Radius of Gyration – GYRATE), bir molekülün kütlesinin merkezine göre nasıl dağıldığını ölçen yapısal bir analiz yöntemidir. Bu metrik, özellikle proteinlerin **kompaktlık derecesini ve katlanma durumunu** değerlendirmek için kullanılır. Kütle merkezi yarıçapı, molekülün merkezinden tüm atomlara olan uzaklıkların kareleri ortalamasının karekökü olarak tanımlanır ve simülasyon boyunca bu değer nasıl değiştiği takip edilir[42].

GYRATE analizi sayesinde bir protein yapısının zamanla daha kompakt hale gelip gelmediği ya da açılarak daha geniş bir yapıya dönüştüğü gözlemlenebilir. Bu yönüyle özellikle katlanma, çözülme (unfolding), kompleks oluşumu veya yapısal stabilite analizlerinde yaygın olarak kullanılır.

Bu çalışmada, kütle merkezi yarıçapı analizleri, simülasyon süresince proteinlerin genel boyut ve yapısal bütünlüklerinin değerlendirilmesi amacıyla uygulanmıştır. Hem tekil protein sistemleri hem de kompleks sistemlerde bu analiz gerçekleştirilmiş, zamanla oluşabilecek büyük yapısal dalgalanmaların veya çökme benzeri durumların ön değerlendirmesi yapılmıştır.

GYRATE analizi, RMSD ve SASA gibi diğer yapısal analizlerle birlikte kullanıldığında, proteinin simülasyon süresince nasıl bir konformasyonel yol izlediğini daha kapsamlı bir şekilde anlamaya yardımcı olur. Analizler, atomik kütlelerin hesaba katılmasıyla gerçekleştirilmiş ve sistemlerin zamana bağlı yapısal evrimleri gözlemlenmiştir.

4.4.6. Kümeleme Analizi (Cluster Analizi)

Kümeleme analizi (cluster analizi), moleküler dinamik simülasyonları süresince oluşan farklı yapısal durumları sınıflandırmak ve tekrar eden konformasyonel örüntüleri tanımlamak için kullanılan bir yöntemdir. Bu analiz, simülasyon boyunca alınan konformasyonel anlık görüntülerin birbirlerine yapısal benzerliklerine göre gruplandırılmasını sağlar. Böylece sistemin zaman içerisinde hangi yapısal durumlarda daha uzun süre kaldığı veya hangi konformasyonların daha baskın olduğu tespit edilebilir [43].

Bu çalışmada, kümeleme analizi gerçekleştirilirken GROMOS algoritması kullanılmış ve yapılar arasındaki RMSD mesafesine göre kümeler oluşturulmuştur. Belirli bir kesim değeri (cutoff) üzerinden RMSD hesaplanarak, birbirine yeterince yakın olan konformasyonlar aynı küme altında gruplanmıştır. Bu işlem sonucunda simülasyon boyunca sistemin kaç farklı baskın yapıya sahip olduğu belirlenmiş ve her bir kümenin içerdiği konformasyon sayısı (kapsama oranı) analiz edilmiştir.

Yapılan analiz ile:

- Simülasyonun büyük bölümünde hangi yapının korunduğu,
- Sistem zamanla belirli bir kararlı duruma mı ulaştı, yoksa farklı yapılar arasında geçiş yaptı mı,
- Konformasyonel çeşitliliğin geniş mi dar mı olduğu

gibi sorulara metodolojik düzeyde yanıt sağlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar, ileri analizlerde temsilci yapıların (representative structures) seçilmesi, serbest enerji manzaralarının çizilmesi ve bağlanma modellerinin değerlendirilmesi gibi pek çok çalışmada temel veri olarak kullanılmıştır. Kümeleme, yapısal analizin bütüncül bir parçası olarak RMSD temelli hareketlerin zamansal örüntüsünü çıkarmak açısından son derece değerlidir.

4.4.7. Enerji (Coulomb ve Lennard-Jones)

Enerji (Coulomb ve Lennard-Jones)

Enerji analizleri, moleküler dinamik simülasyonlarında atomlar ve moleküller arasındaki fiziksel etkileşimlerin nicel olarak değerlendirilmesini sağlar. Bu analizler, özellikle

moleküller arası bağlanma, stabilite ve çözünme süreçlerinin anlaşılmasında kritik öneme sahiptir. GROMACS yazılımında bu tür analizler, yeniden yürütme (rerun) yöntemiyle hesaplanarak simülasyonun belirli enerji bileşenleri detaylı olarak ayrıştırılabilir [44].

Bu çalışmada, iki temel enerji bileşeni analiz edilmiştir:

- **Coulomb Etkileşimleri (Elektrostatik Kuvvetler):**

Protein-protein ve protein-çözücü sistemlerinde atomlar arasında yüklerin oluşturduğu elektrostatik çekim veya itmeler bu enerji bileşeniyle temsil edilir. Özellikle tuz köprüleri, iyonik bağlar ve yüklü yüzey etkileşimleri Coulomb terimi üzerinden değerlendirilmiştir.

- **Lennard-Jones Etkileşimleri (Van der Waals Kuvvetleri):**

Moleküller arası kısa menzilli çekim ve itme kuvvetlerini modelleyen Lennard-Jones potansiyeli, hidrofobik etkileşimleri, sterik çakışmaları ve yüzey uyumunu açıklamada kullanılmıştır.

Analizler hem protein-protein arası hem de protein-çözücü arası etkileşimler bazında gerçekleştirilmiş, bu sayede sistemin hem içsel stabilitesi hem de çevresel çözünürlüğü hakkında ön değerlendirme yapılmıştır. Rerun yöntemiyle enerji hesaplamaları, sistemin simülasyon süresince kaydedilen konformasyonel anlık görüntüleri üzerinden tekrar yürütülerek elde edilmiştir.

Bu metodoloji, enerji bileşenlerinin zaman içerisindeki değişimini takip etmeye ve farklı sistemlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca, bağlanma bölgelerindeki fiziksel etkileşimlerin doğası ve gücü hakkında doğrudan içgörü sunması açısından ileri analizler için temel oluşturmuştur.

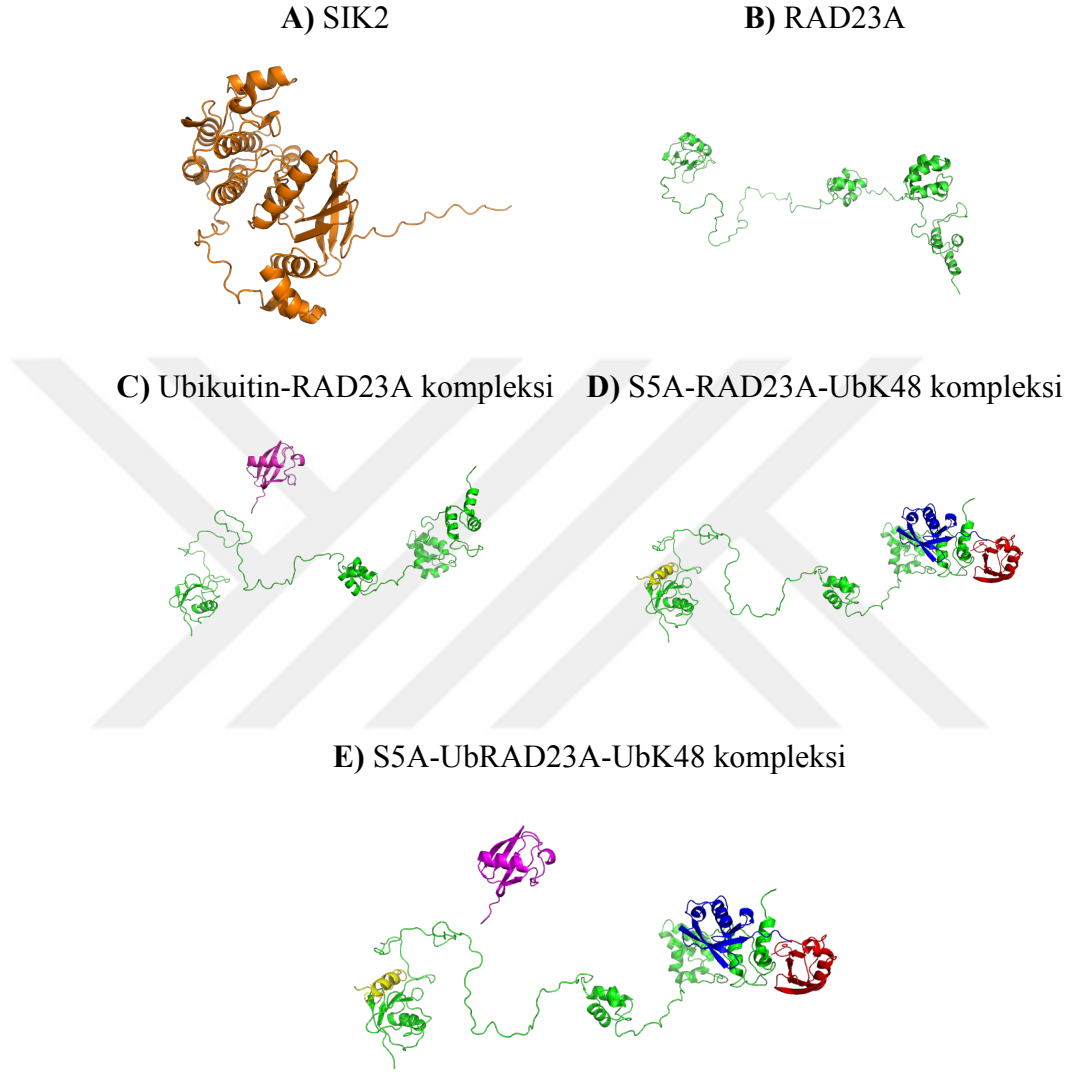
4.4.8. PCA (Temel Bileşen Analizi)

Temel bileşen analizi (Principal Component Analysis – PCA), moleküler dinamik simülasyonlarında proteinlerin büyük ölçekli konformasyonel hareketlerini analiz etmek için kullanılan güçlü bir istatistiksel yöntemdir. Bu analiz, simülasyon boyunca meydana gelen tüm atomik hareketler arasındaki korelasyonları inceleyerek, sistemin genel yapısal değişikliklerini en iyi temsil eden yönleri (modları) ortaya çıkarır [45].

PCA, atomik hareketlerin kovaryans matrisini hesaplar ve bu matrisi özvektör ve özdeğerlerine ayırır. Elde edilen özvektörler, sistemde gözlemlenen temel hareket yönlerini; özdeğerler ise bu hareketlerin büyüklüğünü ifade eder. Genellikle ilk birkaç temel bileşen (PC1, PC2 vb.) toplam hareketin büyük bir kısmını temsil eder ve sistemin baskın konformasyonel değişimlerini anlamak için yeterlidir.

Bu çalışmada PCA analizi, proteinlerin simülasyon boyunca geçirdiği genel yapısal değişiklikleri yorumlamak ve olası konformasyonel geçişleri tanımlamak amacıyla uygulanmıştır. Özellikle protein-protein komplekslerinde, bağlanma sonrası meydana gelen büyük ölçekli yapısal düzenlemelerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

PCA'nın avantajı, rastgele termal salınımları filtreleyerek yalnızca biyolojik olarak anlamlı büyük hareketleri öne çıkarmasıdır. Bu sayede moleküler esneklik, allosterik etkiler ve fonksiyonel yapı değişimlerinin daha net şekilde yorumlanması sağlanabilir.



Şekil 4.1: Tez kapsamında modellenen yapılar. Yapılarda kullanılan renk kodları: RAD23A (yeşil), modifikasyon ubiquitini (magenta), UbK48 ubiquitin-1 (mavi), UbK48 ubiquitin-2 (kırmızı), S5A (UIM) (sarı), SIK2 (turuncu).

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, RAD23A proteininin yapısal dinamikleri ve potansiyel aktivasyon mekanizmaları moleküler dinamik (MD) simülasyonları ile detaylı biçimde incelenmiştir. RAD23A, hücrede protein yıkımı ile ilgili birçok süreçte yer alan, modüler yapıya sahip bir proteindir. Özellikle UBL (ubiquitin-like) ve UBA (ubiquitin-associated) domainleri aracılığıyla hem ubikuitinlenmiş proteinleri hem de proteozom kompleksini tanıma ve bağlama kapasitesine sahiptir. Literatürde RAD23A'nın bu iki yapısal bölgesi arasındaki konformasyonel düzenin, protein-protein etkileşimleri ve post-translasyonel modifikasyonlara bağlı olarak değişebileceğine dair bulgular bulunmaktadır.

Bu bağlamda, çalışmada temel olarak iki hipotez ele alınmıştır;

- (1) RAD23A'nın post-translasyonel modifikasyonlarla (özellikle fosforilasyon ve ubikuitinasyon) yapısal olarak stabil bir açık formda tutulabileceği,
- (2) RAD23A'nın diğer proteinlerle (örneğin proteozomun RPN10 alt birimi veya ubikuitinlenmiş hedef proteinler) kurduğu etkileşimlerin bu açık formu destekleyebileceği.

Simülasyonlar boyunca RAD23A'nın açık ve kapalı formları arasındaki geçişleri anlamaya yönelik analizler yapılmış, ayrıca farklı bağlanma partnerlerinin ve modifikasyonların bu yapısal değişime etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, RAD23A'nın yalın haldeyken daha kompakt (kapalı) bir forma geçme eğiliminde olduğunu; ancak modifikasyonların veya bağlanma partnerlerinin etkisiyle açık formunun stabilize olabileceğini ortaya koymuştur.

Bu bölümde, elde edilen bu bulgular detaylı biçimde tartışılacak; validasyon analizlerinden başlayarak yapısal değişimlerin zamansal profili, PCA temelli büyük ölçekli hareket örüntüleri ve bağlanma enerjisi hesaplamaları üzerinden yorumlanacaktır. Aynı zamanda RAD23A'nın olası biyolojik işlevlerine yönelik hipotezler de veriler ışığında değerlendirilecektir.

5.1. Validasyon Analizleri

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen tüm moleküler dinamik (MD) simülasyonlarında, sistemlerin üretim fazına geçmeden önce fiziksel olarak dengede olduklarından emin olunması adına standart validasyon adımları uygulanmıştır. Bu validasyonlar, simülasyonların güvenilirliğini ve biyolojik gerçekliğe uygunluğunu garanti altına almak amacıyla yapılmıştır.

İlk adım olarak uygulanan enerji minimizasyonu sürecinde, atomlar arası fiziksel olmayan çakışmalar ortadan kaldırılmış ve sistemin potansiyel enerjisi optimize edilmiştir. Steepest descent algoritması ile gerçekleştirilen bu süreç sonunda sistemler kararlı bir enerji seviyesine ulaşmıştır.

Bunu takiben, sistemin sıcaklık ve basınç gibi termodinamik parametrelerinin dengelenmesi amacıyla iki aşamalı dengeleme fazları uygulanmıştır:

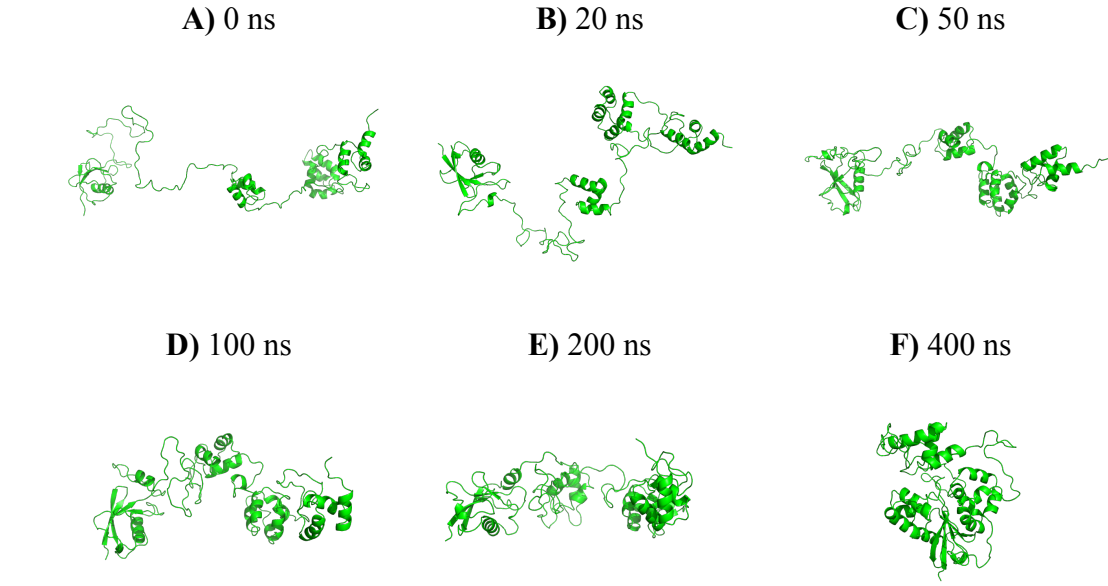
NVT (Sabit hacim ve sıcaklık) dengeleme fazı sırasında, tüm sistem hedef sıcaklık olan 310 K'ye hızla ulaşmış ve bu sıcaklık sabitlenmiştir.

NPT (Sabit basınç ve sıcaklık) dengeleme fazında, ilk olarak Berendsen barostat ile hızlı hacimsel dengeleme sağlanmış, ardından Parrinello-Rahman barostat ile sistemin fiziksel olarak daha gerçekçi davranması hedeflenmiştir. Bu süreç boyunca, yoğunluk değerleri 1000 kg/m³ civarında sabit kalmış, basınç ise 1 bar civarında doğal salınımlar göstermiştir.

Tüm bu validasyon adımları, çalışmada ele alınan tüm sistemler (yalın RAD23A, modifiye edilmiş RAD23A yapıları, protein-protein kompleksleri) için benzer şekilde gerçekleştirilmiştir. Validasyon sonuçları, sistemlerin simülasyon süresince kararlı bir şekilde davranacağını ve elde edilen verilerin güvenilir olduğunu desteklemektedir.

5.2. RAD23A'nın Yalın Formda Geçirdiği Konformasyonel Değişim

RAD23A proteininin konformasyonel esnekliği, hücresel işlevlerini yerine getirebilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, açık formuna ait bilinen yapısı üzerinden başlatılan moleküler dinamik (MD) simülasyonları, proteinin zaman içinde daha kompakt (kapalı) bir yapıya yöneldiğini ortaya koymuştur. Bu gözlem, RAD23A'nın yalın

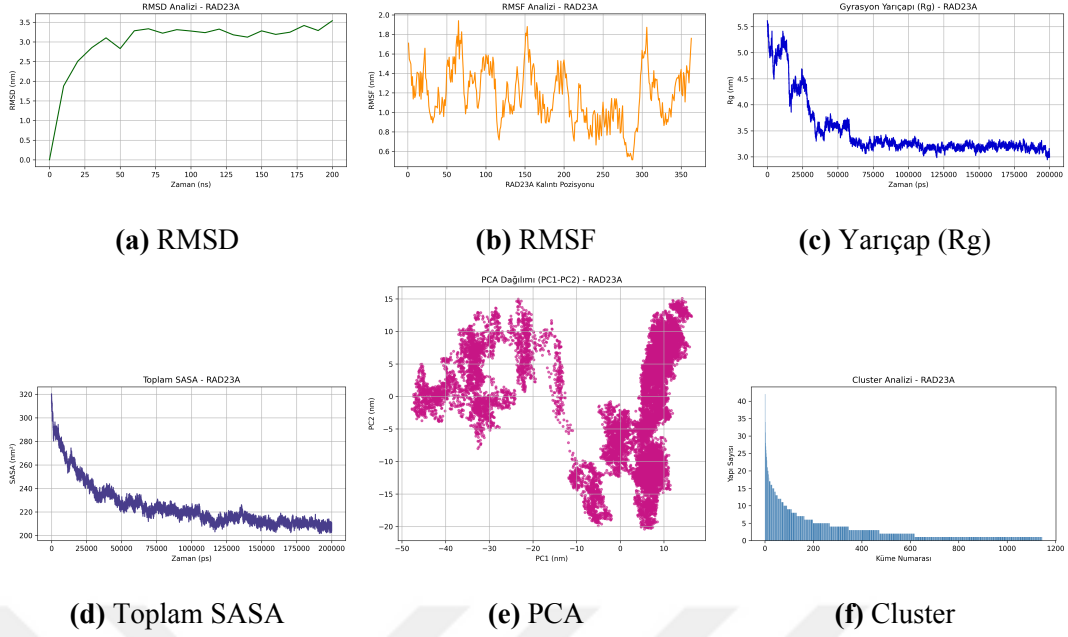


Şekil 5.1: RAD23A'nın farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları

haldeyken intrinsik olarak kapalı konformasyonu tercih ettiğini göstermektedir.

Simülasyonlar için başlangıç yapısı olarak Protein Data Bank'ta yer alan 1OQY (Model 1) kristal yapısı kullanılmıştır. Literatürde bu yapı, UBL ve UBA domainleri arasında belirgin mesafe içeren ve “açık konformasyon” olarak tanımlanan bir modeldir. Bu yapı üzerinde 100 ns, 200 ns ve 400 ns süreyle yapılan simülasyonlar, özellikle domainler arası mesafede belirgin bir azalma ile sistemin giderek daha kompakt bir yapıya evrildiğini göstermiştir (Şekil 5.1).

Bu bölümde, RAD23A'nın yalın formda geçirdiği yapısal değişimler; RMSD, RMSF, yarıçap (R_g), çözünebilir yüzey alanı (SASA), temel bileşen analizi (PCA) ve cluster analizi gibi yapısal ölçütler üzerinden değerlendirilmektedir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: RAD23A'nın yalın formu için gerçekleştirilen yapısal analizler. (A) RMSD, (B) RMSF, (C) Yarıçap (Rg), (D) Çözünebilir yüzey alanı (SASA), (E) PCA analizi, (F) Cluster analizi.

RMSD analizleri, yaklaşık 50–60 ns zaman aralığında belirgin bir konformasyonel bir geçişin yaşandığını ortaya koymaktadır. Bu süreçte, proteinin yaklaşık 3.2 nm'lik bir RMSD değişimi sergilediği ve bu geçişin ardından daha stabil bir yapıya ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.2 A).

RMSF analizleri, özellikle domain bölgelerinde belirgin hareketlilik göstermiştir. UBL (1–81), UBA1 (161–201) ve UBA2 (318–358) domainleri ortalama 1.0–1.2 nm aralığında dalgalanma sergilemiştir. Bu durum, domainler arası etkileşimlerin artmasıyla proteinin kapalı form yönünde bir yeniden yapılanma geçirdiğini desteklemektedir (Şekil 5.2 B).

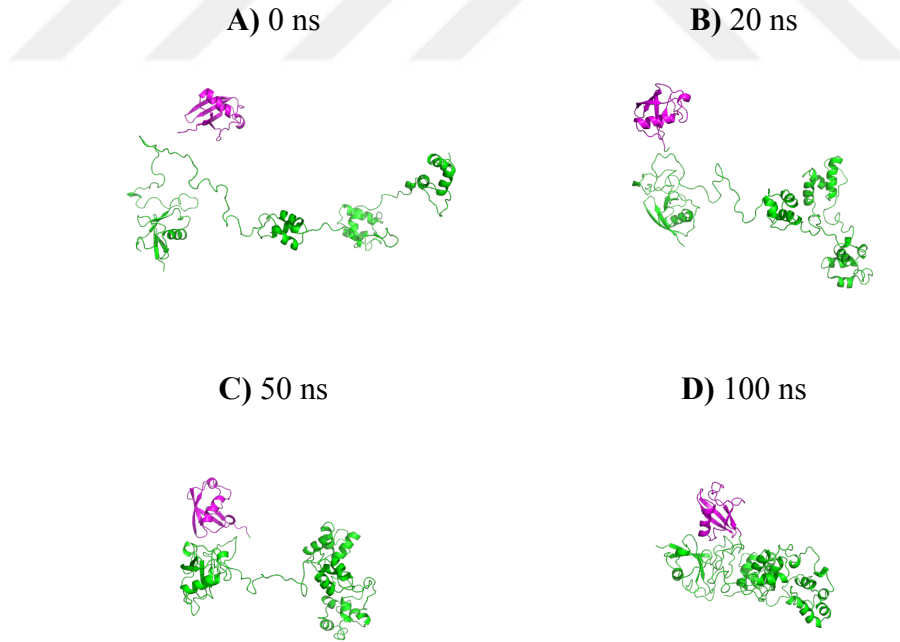
Yarıçap (radius of gyration) analizlerine göre sistemin başlangıçtaki 5.5 nm'lik genişliğinden zamanla 3.2 nm'ye kadar daraldığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, SASA değerleri de 320 nm²'den 220 nm² altına düşerek molekülün çözünebilir yüzey alanının azaldığını ve daha sıkı bir konformasyona geçtiğini göstermektedir. Bu iki ölçüm birlikte değerlendirildiğinde, sistemin belirgin şekilde kompaktlaştığı sonucuna ulaşılmaktadır (Şekil 5.2 C-D).

Cluster analizi, simülasyonun ilk evrelerinde yüksek sayıda (yaklaşık 1000'in üzerinde)

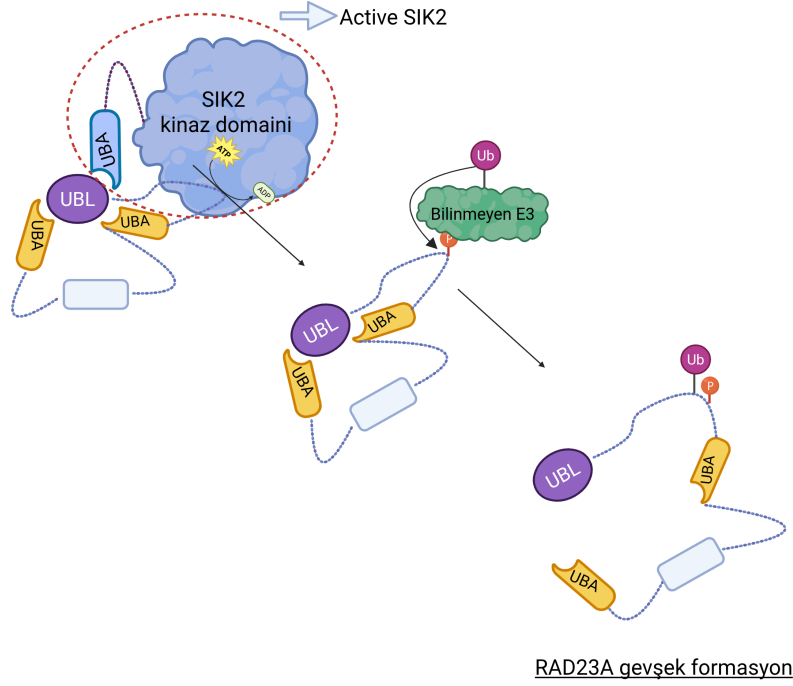
düşük temsil gücüne sahip yapının gözlemlendiğini göstermektedir. Bu durum, proteinin simülasyonun erken fazlarında geniş bir konformasyonel uzayda hareket ettiğine işaret etmektedir. Ancak 60 ns sonrası, belirli yapısal kümelerde toplanma gözlenmiş ve daha kararlı bir yapı eğilimi belirginleşmiştir. PCA sonuçları da bu gözlemleri desteklemekte; ilk 50 ns boyunca daha dağınık bir örüntü görülürken, ilerleyen zaman diliminde yapıların sıkı kümelerle toplandığı dikkat çekmektedir (Şekil 5.2 E-F).

Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, RAD23A'nın yalın haldeyken açık formunu sürdürme eğiliminde olmadığı ve zamanla domainlerinin birbirine yaklaşarak daha kompakt bir yapıya evrildiği görülmektedir. Bu durum, proteinin fonksiyonel aktifliğinin yalnızca yalın halde değil; post-translasyonel modifikasyonlar veya bağlanma partnerleri aracılığıyla açık konformasyonda stabilize edilerek sürdürülebileceğini düşündürmektedir.

5.3. Post-Translasyonel Modifikasyonların RAD23A Yapısına Etkisi



Şekil 5.3: Ubikuitinlenmiş RAD23A'nın farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları. RAD23A (yeşil), modifikasyon ubikitini (magenta)

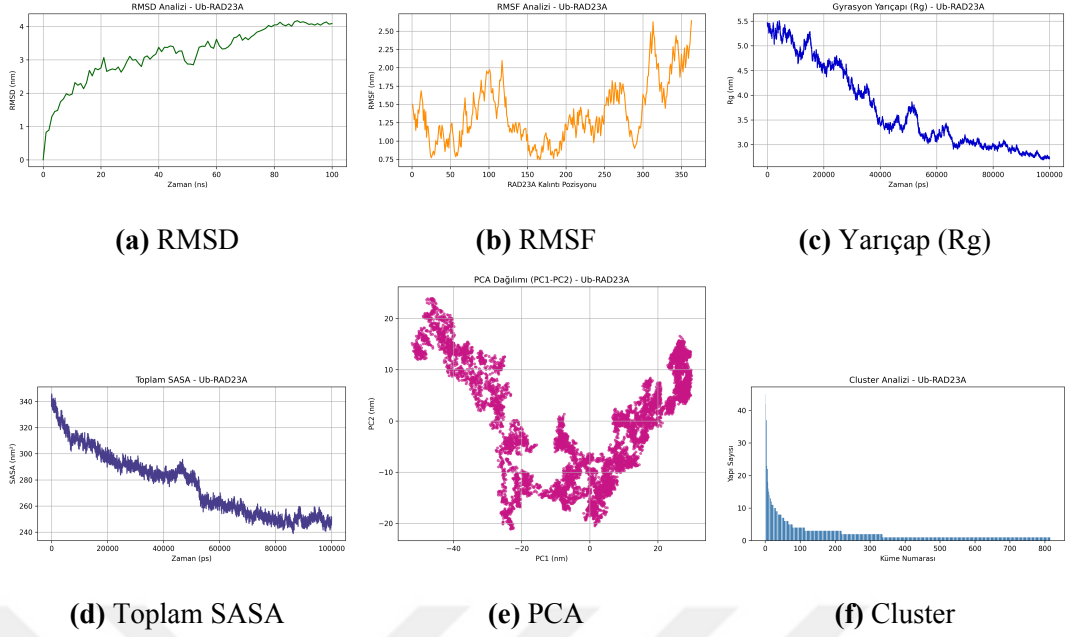


Şekil 5.4: RAD23A Olası Post-Translasyonel Modifikasyonlarının temsili gösterimi

Önceki bölümde sunulan analizler, RAD23A proteininin yalın halde iken açık konformasyonunu sürdüremediğini ve zamanla kapalı forma geçiş yaptığını açıkça ortaya koymuştur. Bu gözlem, proteinin biyolojik bağlamda açık formda fonksiyonel kalabilmesi için bazı düzenleyici etkenlerin gerekli olabileceğini düşündürmektedir.

Bu hipotezi test etmek amacıyla, literatürde SIK2 kinazının RAD23A'yı S123 pozisyonunda fosforilayabildiği bilgisi dikkate alınmıştır. Ayrıca, bu pozisyona oldukça yakın konumda yer alan K122 kalıntısında ubikuitinasyon gözlemlenmiştir. Fosforilasyon ve ubikuitinasyonun bu mekansal yakınlığı, iki maddenin birbiriyle ilişkili olabileceği ve hatta birbirini tetikleyebileceği ihtimalini doğurmuştur(Şekil 5.4).

Yapılan analizlerde, bu potansiyel etkileşimi anlamak için K122 pozisyonuna manuel olarak ubikuitin eklenmiş ve bu modifikasyonun RAD23A yapısal bütünlüğü üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, molekülün açık formunu koruyup koruyamadığını ve kapanma davranışında ne gibi farklılıklar oluşturduğunu gözlemlemeyi amaçlamaktadır.



Şekil 5.5: Ubikuitinlenmiş RAD23A yapısı için gerçekleştirilen yapısal analizler. (A) RMSD, (B) RMSF, (C) Yarıçap (Rg), (D) Toplam çözünebilir yüzey alanı (SASA), (E) PCA analizi, (F) Cluster analizi.

Yapısal analizler, ubikuitinlenmiş RAD23A'nın yalın formu ile kıyaslandığında farklı bir davranış sergilediğini göstermektedir (Şekil 5.5-5.3). RMSD analizleri, bu modifikasyonun RAD23A'nın açık formunu tamamen koruyamadığını ortaya koymuştur. Her ne kadar yeniden kapanma eğilimi gözlemlense de, bu süreç daha lineer bir şekilde ilerlemiş ve sistemin dengeye ulaşmasında yaklaşık 20 ns'lik bir gecikme yaşanmıştır. Bu durum, yapının daha yavaş stabilize olduğunu göstermektedir (Şekil 5.5 A).

RMSF sonuçları ise domain hareketliliğinde belirgin bir değişimi ortaya koymuştur. UBL (1–81) ve UBA1 (161–201) domainleri, yalın formda gösterdikleri yaklaşık 1.2 nm'lik dalgalanmalara kıyasla bu kez 1.0 nm'nin altında hareketlilik sergilemiştir. Buna karşılık, C-terminalde yer alan UBA2 (318–358) domaini yaklaşık 2.0 nm'lik artmış hareketlilik göstermiştir. Baş kısmın ubikuitinle kısıtlanması nedeniyle kapanma hareketinin proteinin arka ucuna kaydığı düşünülmektedir. Bu yapısal asimetri, özellikle substratlara bağlanmada rol oynayan UBA2 domaininin daha serbest hareket etmesine olanak tanımakta ve geçici konformasyonel açıklıklar yaratmaktadır (Şekil 5.5 B).

SASA ve yarıçap (Rg) analizleri de bu eğilimleri desteklemektedir. SASA değeri 340 nm²'den 240 nm²'ye, Rg değeri ise 5.5 nm'den 3.0 nm'ye düşmüştür. Bu bulgular, pro-

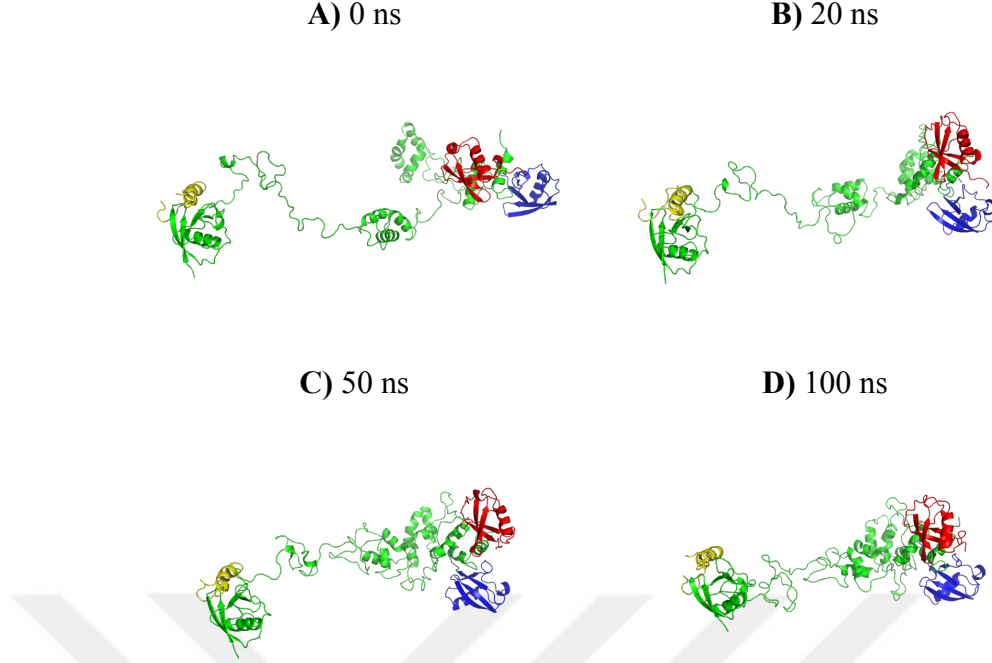
teinin zamanla daha kompakt bir forma geçtiğini göstermektedir. Ancak yalın formda gözlemlenen kararlı fazların aksine, modifiye formda bu parametrelerde net bir plato oluşmamış ve değerler simülasyon boyunca sürekli dalgalanmıştır. Bu da yapının henüz tam anlamıyla stabilize olmadığını, konformasyonel yeniden yapılanmanın sürdüğünü düşündürmektedir. Ayrıca sistemdeki molekül sayısının farklılığı ve kompleks etkileşimler göz önünde bulundurulduğunda, bu metriklerin yalnızca kompaktlık eğilimi açısından değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır (Şekil 5.5 C-D).

PCA ve cluster analizleri, bu yapısal esnekliği daha da pekiştirmektedir. PCA çıktılarında belirli örüntüler gözlemlense de net kümelenmeler oluşmamıştır. Cluster analizleri, yalın formda gözlemlenen yüksek temsil gücüne sahip yapılara kıyasla daha az sayıda baskın yapı ortaya koymuştur. Bu bulgular, sistemin hâlâ yüksek derecede yapısal esneklik gösterdiğini ve yalın forma göre daha düşük düzeyde yapısal denge sağladığını göstermektedir (Şekil 5.5 E-F).

Genel olarak, K122 pozisyonunda gerçekleştirilen ubikuitinasyonun RAD23A yapısı üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu görülmektedir. Her ne kadar açık formun tam olarak korunması sağlanamamış olsa da, modifikasyon proteinin kapanma davranışında yön değişikliğine neden olmuş ve bazı domainleri kısıtlarken diğerlerini daha serbest bırakmıştır. Bu durum, RAD23A'nın post-translasyonel modifikasyonlar aracılığıyla geçici fonksiyonel konformasyonel açıklıklar yaratabileceği fikrini desteklemektedir. Dolayısıyla bu bulgular, RAD23A'nın görevini gerçekleştirebilmesi için modifikasyonların sadece etkili değil, potansiyel olarak belirleyici rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

5.4. Protein-Protein Etkileşimlerinin Açık Form Üzerindeki Rolü

RAD23A proteini, proteazomal degradasyon sürecinde görev alan önemli bir adaptör moleküldür. Bu görevi sırasında, C-terminalindeki UBA domaini aracılığıyla K48-bağlantılı poliubikuitin zincirlerini tanıma ve N-terminalindeki UBL domaini aracılığıyla 26S proteozomun düzenleyici alt birimi olan Rpn10 ubiquitinle etkileşime giren motif (UIM) domainine sahiptir. Literatürde bu domain-domain etkileşimlerinin RAD23A'nın açık (extended) konformasyonda daha stabil kalmasını sağladığı ileri sürülmektedir.



Şekil 5.6: K48-bağlantılı diubiquitin, RAD23A ve Rpn10'un UIM domaini içeren kompleks yapısının farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları. RAD23A (yeşil), UbK48 ubiquitin-1 (mavi), UbK48 ubiquitin-2 (kırmızı), S5A (UIM) (sarı)

Bu hipotezi değerlendirmek amacıyla, RAD23A proteini, K48-bağlantılı diubiquitin (model substrat) ve Rpn10'un UIM domainini içeren bir kompleks model şeklinde oluşturulmuş ve bu sistem 100 ns süreyle moleküler dinamik simülasyonuna tabi tutulmuştur. Yapılan simülasyonlar sonucunda, sistemin yapısal davranışları, dinamik profili ve protein-protein etkileşimlerinin katkısı çok boyutlu analizlerle değerlendirilmiştir (Şekil 5.6).

Yapısal analiz sonuçları, RAD23A'nın doğal bağlanma partnerleri ile oluşturduğu kompleks sistemde, proteinin kapanma eğiliminde belirgin bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. Bu gözlem beklentilerle uyumludur; zira RAD23A'nın domainlerinin diğer moleküllerle etkileşime girmesi, intramoleküler domain-domain etkileşimini zayıflatabilir. Bu bağlamda, protein-protein etkileşimlerinin RAD23A'ya belirli bir düzeyde yapısal kararlılık kazandırdığı anlaşılmaktadır.

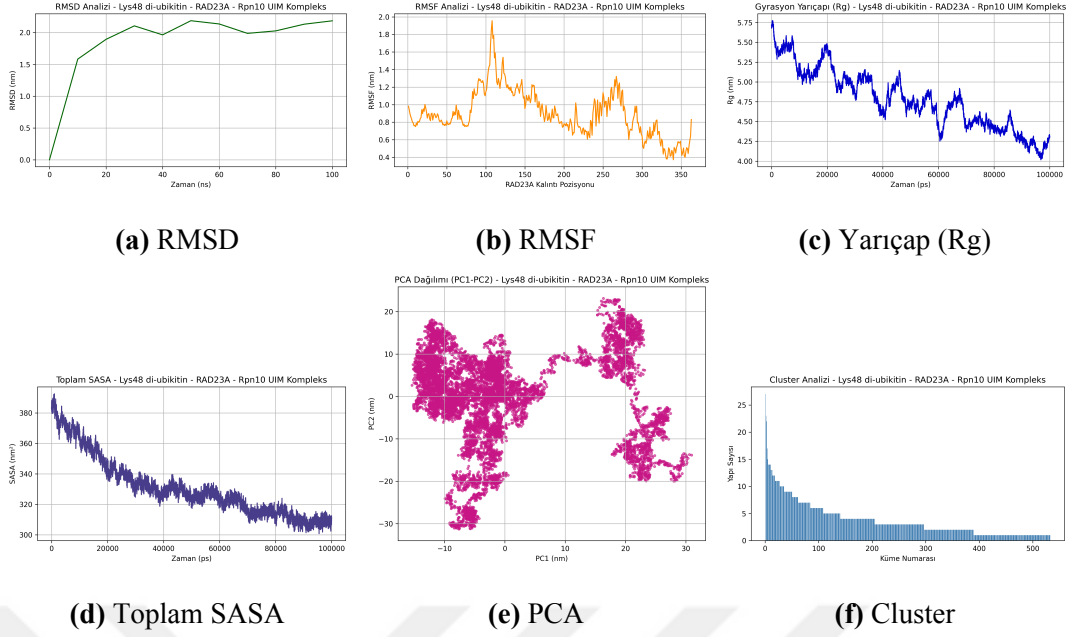
RMSD analizleri, kompleks sistemdeki RAD23A molekülünün genel hareketliliğinde anlamlı bir azalma olduğunu göstermektedir (Şekil 5.7 A). Simülasyonun ilk 20 ns'lik

periyodunda yaklaşık 2.0 nm düzeyinde bir hareketlilik gözlemlenirken, izleyen 80 ns boyunca bu değişimin yalnızca 0.5 nm ile sınırlı kaldığı tespit edilmiştir. Bu durum, sistemin zamanla daha kararlı bir konformasyona ulaştığını ve kompleksin yapı bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir.

RMSF analizleri, bu genel kararlılık eğilimini domain düzeyinde de desteklemektedir (Şekil 5.7 B). Özellikle substrat olan K48-bağlantılı diubiquitin ile etkileşen UBA2 domaininin hareketliliği büyük ölçüde azalmış ve yaklaşık 0.6 nm’lik bir dalgalanma ile sınırlandırılmıştır.

SASA analizinde molekülün daha kompakt bir yapıya yöneldiği açıkça görülmektedir (Şekil 5.7 D). Gyration yarıçapı (R_g) analizinde ise 15–40 ns arasında molekülün yaklaşık 5.25 nm civarında sabit kaldığı, 45–100 ns arasında ise ortalama 4.25 nm seviyelerinde kararlılık gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 5.7 C).

Cluster analizi sonucunda, toplamda 500 farklı konformasyonel küme tanımlanmıştır (Şekil 5.7 F). Bu sayı, yalın haldeki RAD23A sistemine ait 1000 kümenin yarısı kadardır ve kompleksin daha sınırlı sayıda kararlı konformasyona yöneldiğini göstermektedir. PCA projeksiyonları ise yapısal dağılımın belirli alanlarda yoğunlaştığını ve kümelenmenin arttığını ortaya koymaktadır (Şekil 5.7 E).



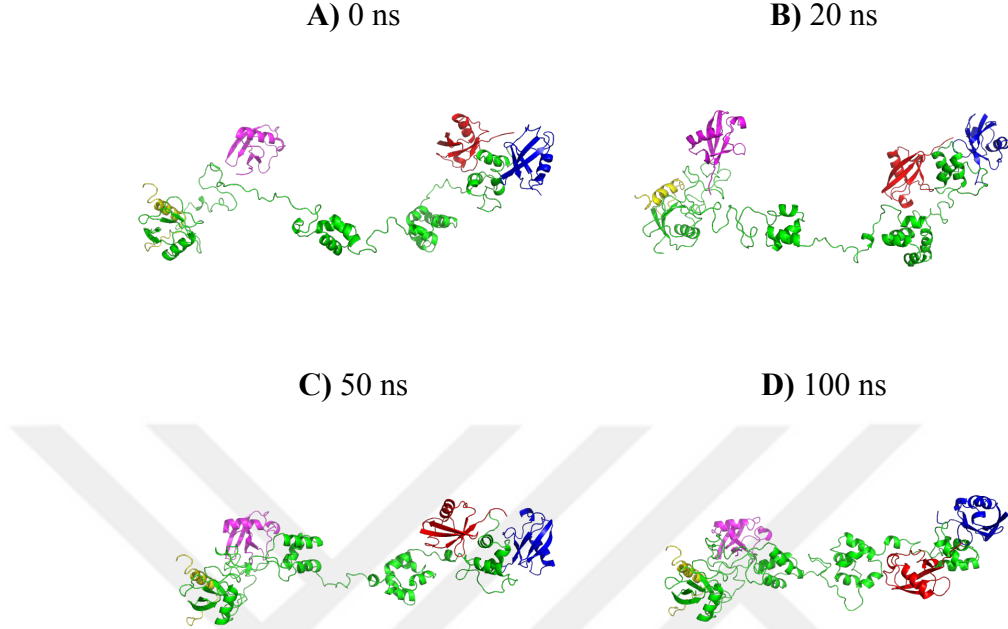
Şekil 5.7: RAD23A'nın K48-diUb ve Rpn10 UIM ile oluşturduğu kompleks yapısı için gerçekleştirilen yapısal analizler. (A) RMSD, (B) RMSF, (C) Yarıçap (Rg), (D) Toplam çözünabilir yüzey alanı (SASA), (E) PCA analizi, (F) Cluster analizi.

Tüm bu analizlerin birleşik değerlendirmesi, RAD23A'nın doğal bağlanma partnerleriyle oluşturduğu kompleks sistemin, proteinin açık formda stabil kalmasını desteklediğini göstermektedir. Bu sonuçlar, protein-protein etkileşimlerinin yalnızca fonksiyonel değil, aynı zamanda yapısal olarak da düzenleyici rol oynadığını güçlü biçimde ortaya koymaktadır.

5.5. Post-Translasyonel Modifikasyon ve Protein-Protein Etkileşimlerinin Birleşik Etkisi: RAD23A Üçlü Kompleksi

Bu bölümde, 5.3 ve 5.4 numaralı bölümlerde incelenen sistemlerin bir araya getirildiği, yani hem post-translasyonel modifikasyona uğramış hem de doğal bağlanma partnerleriyle etkileşim kuran RAD23A'nın yapısal davranışı analiz edilmiştir. 5.3'teki analizler, özellikle UBL ve UBA1 domainleri üzerinde ubiquitin modifikasyonunun belirgin bir hareket kısıtlaması oluşturduğunu göstermiştir. 5.4'te ise, protein-protein etkileşimlerinin RAD23A'nın açık konformasyonunu daha kararlı hale getirdiği ve UBA2 domaini üzerinde ciddi bir hareket kısıtı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.8).

Beklendiği gibi, bu iki sistemin bir arada bulunduğu üçlü kompleks yapısında RAD23A daha stabil bir yapı sergilemiştir. Yapının özellikle daha kompakt bir hale geçmek yerine, lineer ve açık formunu koruyarak kararlı kaldığı dikkat çekmiştir.



Şekil 5.8: K48-bağlantılı diubiquitin, Ubikuitinlenmiş RAD23A ve Rpn10'un UIM domaini içeren kompleks yapısının farklı zaman noktalarındaki moleküler dinamik simülasyonları sonucunda elde edilen konformasyonel yapıları. RAD23A (yeşil), modifikasyon ubikitini (magenta), UbK48 ubiquitin-1 (mavi), UbK48 ubiquitin-2 (kırmızı), S5A (UIM) (sarı)

RMSD analizi, bu yapının ilk 20–30 ns'lik kısmında 2.5–3.0 nm arasında değişen bir hareketlilik gösterdiğini, ardından ise hareketin stabil hale geldiğini ortaya koymuştur. Bu durum, 5.4'teki kompleks yapıya oldukça benzer bir eğilim göstermektedir (Şekil 5.9 A).

RMSF verileri, daha önce gözlenen sonuçlarla uyumlu olarak, UBL, UBA1 ve UBA2 domainleri üzerindeki hareketliliğin büyük ölçüde kısıtlandığını göstermektedir. Bu da modifikasyon ve etkileşimlerin birlikte çalışarak esnekliği azaltma etkisini doğrulamaktadır (Şekil 5.9 B).

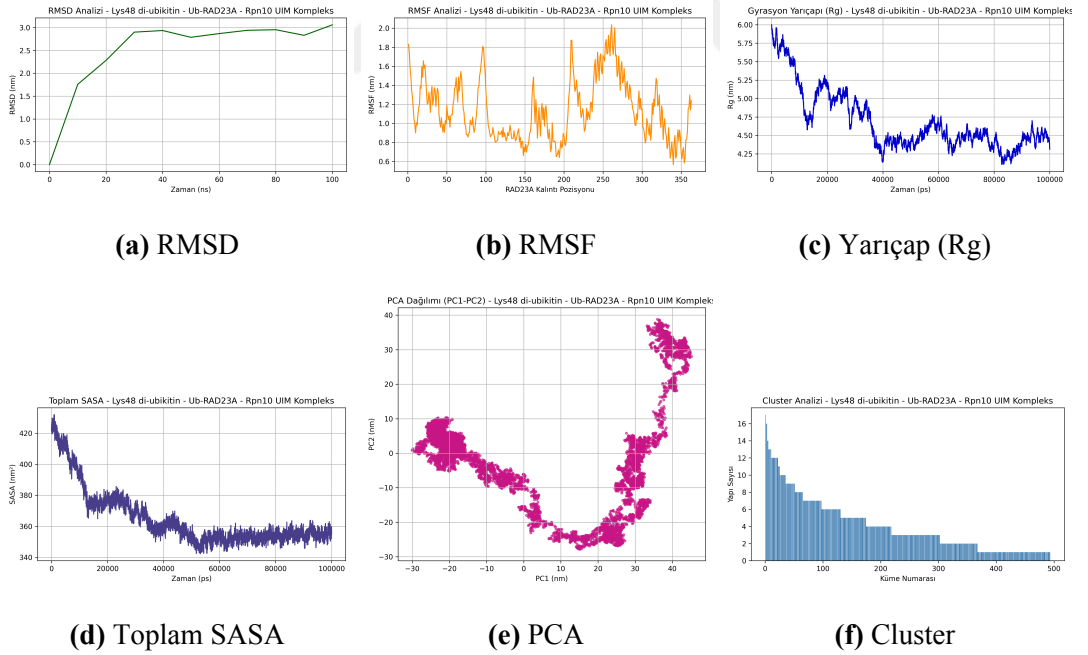
Gyrasyon yarıçapı (R_g) analizinde ise yapının ilk 40 ns boyunca yaklaşık 6.0 nm'den 4.25–4.50 nm bandına gerilediği ve simülasyonun geri kalanı boyunca bu aralıkta kaldığı

gözlenmiştir. Bu durum, proteinin açık formda fakat daha sabit bir yapıda kaldığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, SASA analizinde toplam çözünebilir yüzey alanının 50 ns içinde yaklaşık 450 nm^2 'den 350 nm^2 seviyelerine indiği ve bu değerde sabitlendiği görülmüştür (Şekil 5.9 C-D).

Yapının konformasyonel çeşitliliğini değerlendirmek amacıyla yapılan Cluster analizinde, yalın RAD23A simülasyonuna göre (1000 cluster) bu sistemde küme sayısının yarı yarıya azalarak yaklaşık 500 cluster seviyesine düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca PCA analizinde de belirgin bir alana yönelmiş kümelenme davranışı gözlemlenmiştir (Şekil 5.9 E-F).

Genel olarak, 5.3 ve 5.4'te gözlemlenen sonuçların birleşik etkisi bu bölümde açıkça görülmektedir. RAD23A'nın açık formda kalabilmesi açısından protein-protein etkileşimlerinin daha belirleyici bir rol oynadığı, post-translasyonel modifikasyonların ise bu durumu destekleyici ancak daha çok aktivasyon veya deaktivasyon gibi düzenleyici işlevler için rol alabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu yapısal analizlerin tümüne dair grafiksel veriler Şekil 5.9'de sunulmuştur.



Şekil 5.9: Ubikuitinlenmiş RAD23A'nın K48-diUb ve Rpn10 UIM ile oluşturduğu üçlü kompleks yapısı için gerçekleştirilen yapısal analizler. (A) RMSD, (B) RMSF, (C) Yarıçap (Rg), (D) Toplam çözünebilir yüzey alanı (SASA), (E) PCA analizi, (F) Cluster analizi.

5.6. SIK2 ile RAD23A Arasındaki Konformasyonel Bağımlı Etkileşimlerin Docking Analizi

Çizelge 5.1: SIK2 ile RAD23A'nın farklı konformasyonlarındaki docking sonuçları ve Pymol ile hesaplanan aktif bölgeler arası uzaklıklar (SIK2: Asp142; RAD23A: Ser123).

Docking Sistemi	Zaman (ns)	HADDOCK Skoru	Gömülü Yüzey Alanı (BSA, Å ²)	En iyi Cluster RMSD (Å)	Aktif Bölge Uzaklığı (Å)
SIK2-RAD23A (0 ns)	0	-82.7 ± 6.7	1498.3	21.3	11.1
SIK2-RAD23A (20 ns)	20	-86.1 ± 5.0	1402.5	1.0	13.5
SIK2-RAD23A (50 ns)	50	-106.0 ± 5.8	2067.8	29.4	22.8
SIK2-RAD23A (100 ns)	100	-93.1 ± 8.1	2073.4 221.7	7.4	15.4
SIK2-RAD23A (200 ns)	200	-102.7 ± 6.7	1943.9	1.0	8.1
SIK2-RAD23A (400 ns)	400	-79.8 ± 1.8	1568.4	19.8	9.7

RAD23A'nın konformasyonel dinamikleri doğrultusunda farklı zaman noktalarından (0 ns, 20 ns, 50 ns, 100 ns, 200 ns ve 400 ns)(5.1) alınan yapılarla yapılan docking analizleri, bu proteinin SIK2 ile olan etkileşim yeteneğinin zamana bağlı olarak anlamlı şekilde değiştiğini ortaya koymuştur. Docking işlemleri HADDOCK web sunucusu üzerinden gerçekleştirilmiş olup, analizler HADDOCK skoru, buried surface area (BSA), elektrostatik ve van der Waals etkileşim enerjileri ile değerlendirilmiştir (Çizelge 5.1, Şekil 5.10).

Özellikle, 50 ns ve 200 ns zaman noktalarında elde edilen RAD23A yapıları, diğer yapılara kıyasla daha düşük HADDOCK skorları (sırasıyla -106.0 ve -102.7) ve daha

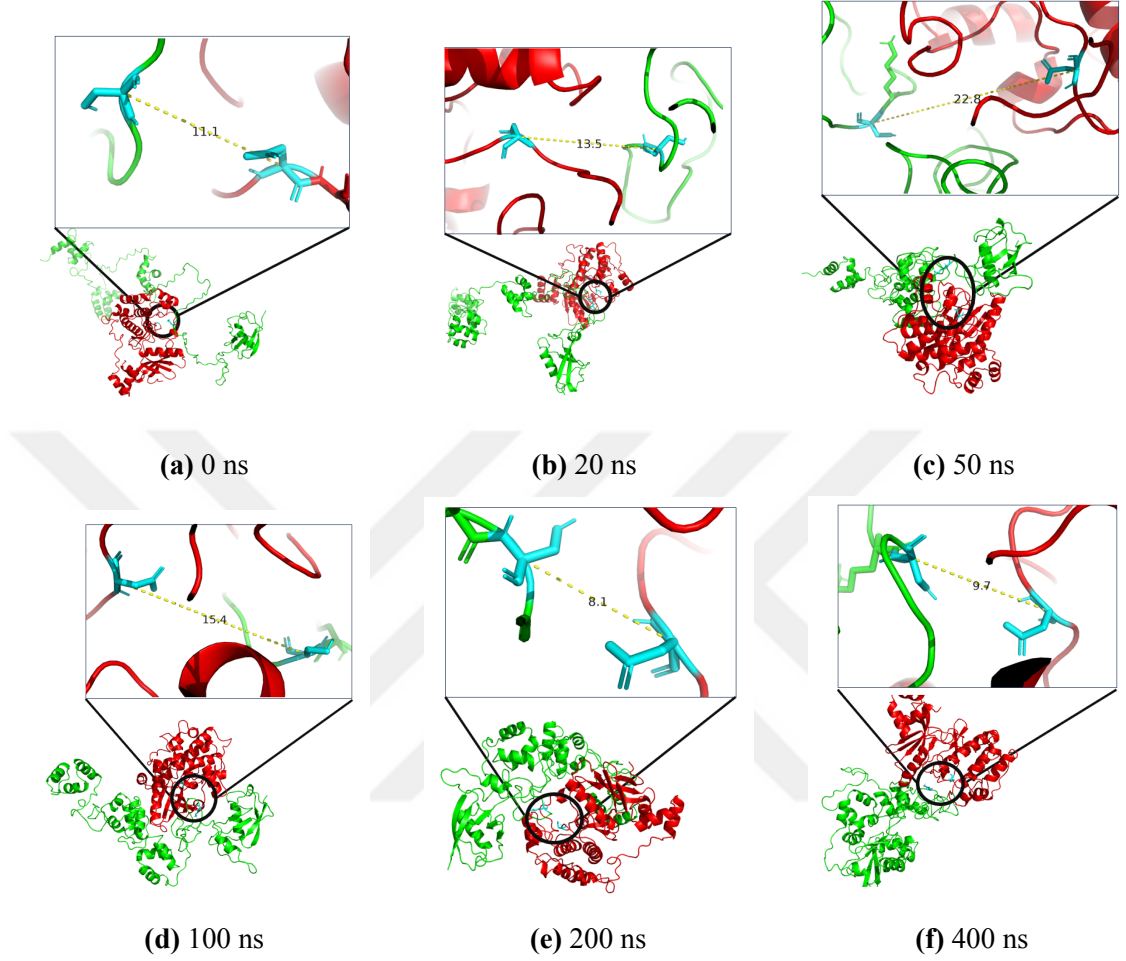
yüksek gömülü yüzey alanları (2067.8 ve 1943.9 Å²) ile dikkat çekmektedir. Bu bulgular, ilgili yapıların SIK2 ile daha stabil ve geniş yüzeyli etkileşim kompleksleri oluşturduğunu göstermektedir. HADDOCK skorlarındaki bu artışa rağmen, 50 ns yapısında ölçülen aktif bölge uzaklığı (Ser123–Asp142) 22.8 Å gibi oldukça yüksek bir değerde kalmıştır. Bu durum, güçlü bağlanma interaksyonuna rağmen, fosforilasyon gibi doğrudan kimyasal etkileşimler için yeterli yakınlığın sağlanamayabileceğini göstermektedir. Buna karşılık, 200 ns konformasyonu hem yüksek BSA ve HADDOCK skoruna hem de 8.1 Å gibi düşük bir aktif bölge uzaklığına sahiptir. Bu mesafe, SIK2'nin Ser123 bölgesine doğrudan erişimini mümkün kılacak düzeydedir. Ayrıca, bu yapı RAD23A'nın daha kapalı bir formuna karşılık gelmektedir. Bu nedenle, 200 ns yapısının, hem SIK2 tarafından tanınabilirlik hem de doğrudan modifikasyon gerçekleştirme açısından en uygun konformasyon olduğu düşünülmektedir.

Öte yandan, 0 ns (başlangıç açık hali) ve 400 ns (kapalıya yakın son hali) yapıları, görece daha düşük BSA ve daha zayıf HADDOCK skorları ile daha az tercih edilen bağlanma konformasyonları sergilemiştir. 0 ns yapısı, en düşük BSA değerlerinden birine sahip olup (1498.3 Å²), HADDOCK skorları açısından da ortalama bir bağlanma göstermiştir (-82.7). Aktif bölge uzaklığı da 11.1 Å olarak ölçülmüş ve bu değer, 200 ns ile karşılaştırıldığında görece daha yüksektir. Bu durum, SIK2'nin RAD23A'yı tamamen açık veya tamamen kapalı haldeyken tanınmasının ve etkin bağlanma gerçekleştirmesinin daha az olası olduğunu düşündürmektedir.

20 ns ve 100 ns gibi ara konformasyonlar ise nispeten uygun HADDOCK skorları ve yüzey alanları göstermiş, ancak aktif bölge mesafeleri sırasıyla 13.5 Å ve 15.4 Å olarak ölçülmüştür. Bu değerler, modifikasyon açısından sınırdaki değerlendirilebilecek uzaklıklardır ve dolayısıyla genel bağlanma verimliliği açısından 50 ns ve özellikle 200 ns yapılarına göre daha zayıf kalmaktadırlar.

Sonuç olarak, docking analizleri RAD23A'nın konformasyonel durumu ile SIK2 etkileşiminin güçlü şekilde bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, 200 ns gibi ara konformasyonlar hem bağlanma stabilitesi hem de fonksiyonel yakınlık açısından kritik roller üstlenebilir. Bu etkileşimlerin, post-translasyonel modifikasyonlarla (örneğin, K122 ubiquitinasyonu ve S123 fosforilasyonu) regüle edilerek fonksiyonel aktivitenin kontrolünde yer alabileceği öne sürülmektedir. Bu bulgular, RAD23A'nın sadece

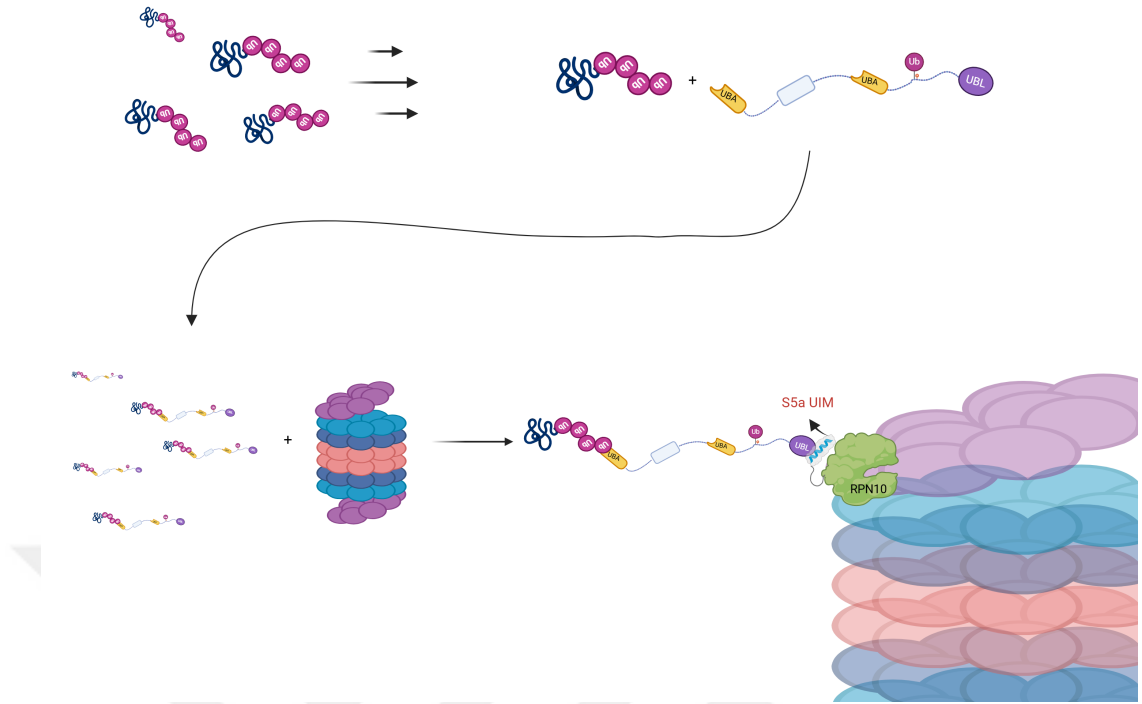
konformasyonel değil, aynı zamanda modifikasyonlara bağlı olarak da çeşitlendirilebileceğini ve SIK2 gibi düzenleyici kinazlarla ilişkili spesifik geçiş hallerinin olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.10: Docking sonrası SIK2 (kırmızı) ve RAD23A (yeşil) yapıları için aktif bölgeler arasındaki uzaklıkların gösterildiği yapılar. Ser123 (RAD23A) ve Asp142 (SIK2) arasındaki mesafeler her bir konformasyonda işaretlenmiştir.

5.7. Genel Değerlendirme ve Gelecek Perspektif

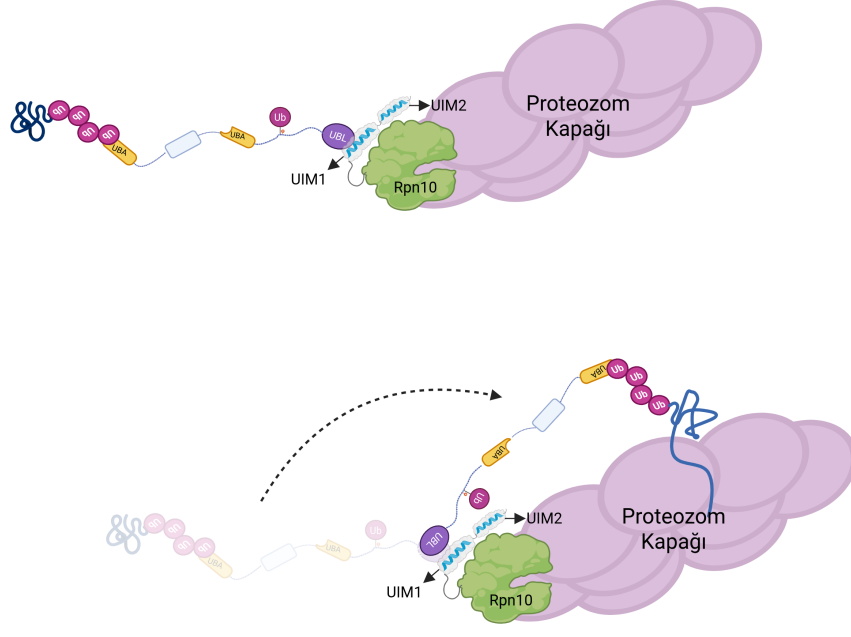
Bu tez kapsamında RAD23A proteininin yapısal dinamikleri detaylı bir şekilde incelenmiş, protein-protein etkileşimleri ile birlikte olası post-translasyonel modifikasyonların yapısal etkileri değerlendirilmiştir. Özellikle RAD23A'nın açık formda kalabilmesi için Rpn10 ve Lys48 bağlantılı di-ubikuitin ile etkileşime girmesinin kritik öneme sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu durum, RAD23A'nın substrat taşıyıcı işlevini sürdürebilmesi ve proteazomal hedeflemeyi gerçekleştirebilmesi açısından önemlidir.



Şekil 5.11: RAD23A-Proteozom kompleksi model önerisi

Simülasyonlar sonucunda SIK2 proteininin RAD23A ile doğrudan etkileşime girebildiği ve bu etkileşimin belirli konformasyonlarda güçlü bağlanma özellikleri gösterdiği bulunmuştur (Şekil 5.10, Tablo 5.1). Özellikle 50 ns’lik açık form konformasyonuna yakın yapıyla ve 200 ns’lik kapalı form yapıyla yapılan docking analizleri, her iki durumda da anlamlı bağlanma skorları göstermiştir. Ancak bu bağlanmanın, RAD23A üzerinde doğrudan bir aktivasyon mu yoksa inhibisyon mu oluşturduğu hakkında kesin bir çıkarım yapılamamıştır. Elde edilen bulgular, SIK2’nin potansiyel olarak RAD23A üzerinde bir post-translasyonel modifikasyon başlatabileceği ve bunun RAD23A’nın substrat tanıma ya da taşıma kapasitesine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir (Şekil 5.4-5.11). Ancak bu varsayımlar deneysel olarak doğrulanmalıdır.

Bu bağlamda gelecekte yapılacak çalışmalarda, öncelikle in-vitro kinaz aktivite deneyleri ile SIK2’nin RAD23A’yı fosforlayıp fosforlamadığı teyit edilmelidir. Fosforilasyon gerçekleşiyor ise, RAD23A üzerindeki potansiyel fosforilasyon bölgesi (örneğin S123) kalıcı hale getirilerek ubikuitinasyon durumu gözlemlenmelidir. Bu adımlarda olumlu sonuçlar elde edilirse, RAD23A üzerine kalıcı bir ubikuitin zinciri eklenerek proteazom aktivitesi üzerindeki etkileri in-vitro 26S aktivite deneyi ile değerlendirilebilir. Ayrıca, RAD23A’nın açık ve kapalı form geçişlerinin intramoleküler düzeyde izlenebilmesi



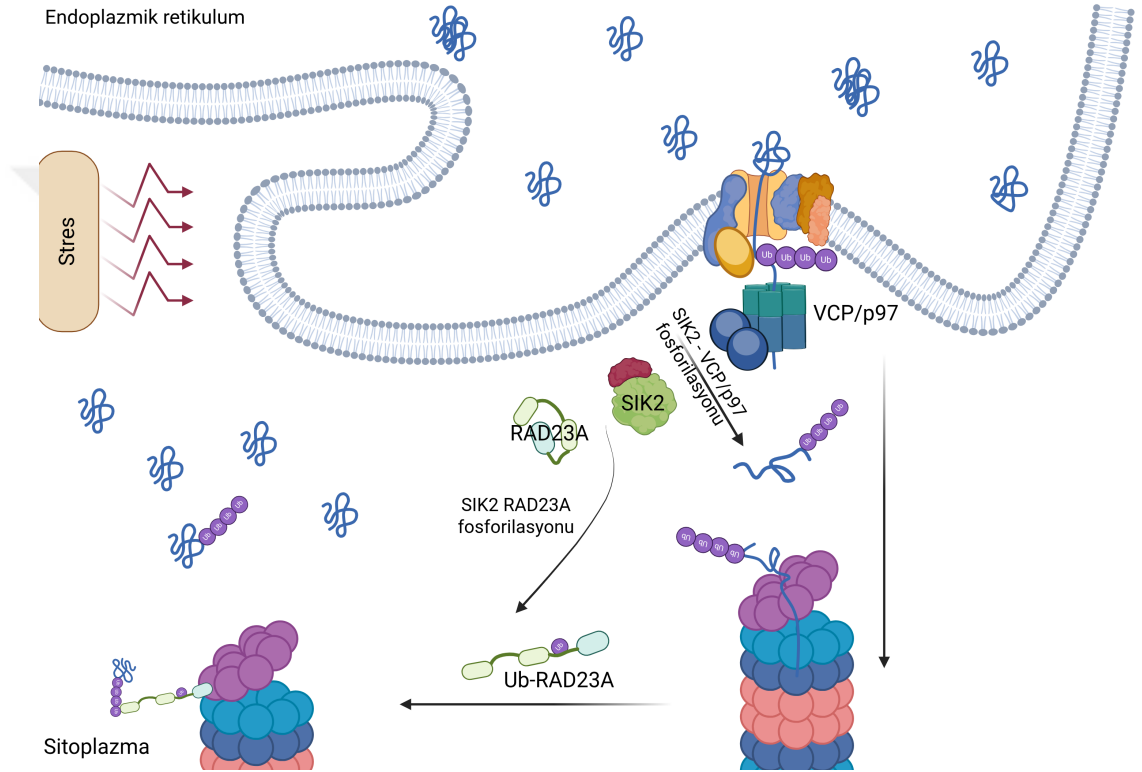
Şekil 5.12: Katlanmamış proteinin proteozomun ağzına taşınma model önerisi

adına, UBL ve UBA bölgelerine donör ve akseptör moleküllerin bağlandığı bir enerji aktarımı yöntemi (örneğin FRET benzeri rezonans enerji transferine dayalı sistemler) kullanılarak konformasyonel değişimler in-vitro hücre modelinde deneysel olarak takip edilebilir.

5.7.1. SIK2 ile Aktivasyonun Olası Etkileri

Tezin 5.3 ve 5.4 numaralı bölümlerinde yapılan analizler, RAD23A'nın ubiquitinlenmesinin yapısal konformasyonları üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Ubikuitin bağlanması, özellikle UBA2 bölgesinde belirgin hareketlilik artışına sebep olmuş ve bu durum, RAD23A'nın substratlarıyla etkileşimini artırabileceği yönünde değerlendirilmiştir. Aynı zamanda, RAD23A'nın UBL bölgesinin Rpn10'un UIM1 domaini ile etkileşimde olduğu görülmektedir. Rpn10'un ayrıca UIM2 domainine sahip olduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda, RAD23A'nın UBL ve UBA1 domainleri arasında konumlanan ikinci bir ubiquitin zinciri, Rpn10'un UIM2 domaini ile etkileşime girerek bağlanma stabilitesini artırabilir (Şekil 5.12). Böyle bir yapı, yalnızca bağlanma kuvvetini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda hedef substratın proteazomun aktif bölgesine daha verimli taşınmasına da katkı sağlayabilir.

ER stres koşullarında ise SIK2'nin proteozomal degradasyon süreçlerine çift yönlü katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir. Bu durumda, SIK2'nin ATP bağımlı bir translokaz olan VCP/p97 fosforile ederek, ERAD yolunu hızlandırdığı, sitoplazma tarafında ise RAD23A'yı fosforilasyon aktive ederek proteazoma substrat sunma kapasitesini artırdığı düşünülmektedir. SIK2'nin aynı yolda bulunan iki farklı proteinin fosforilayarak çift yönlü bir regülasyon sağlaması, hücrelerin özellikle stres altında proteostazı korumasına yardımcı olabilir (Şekil 5.13).

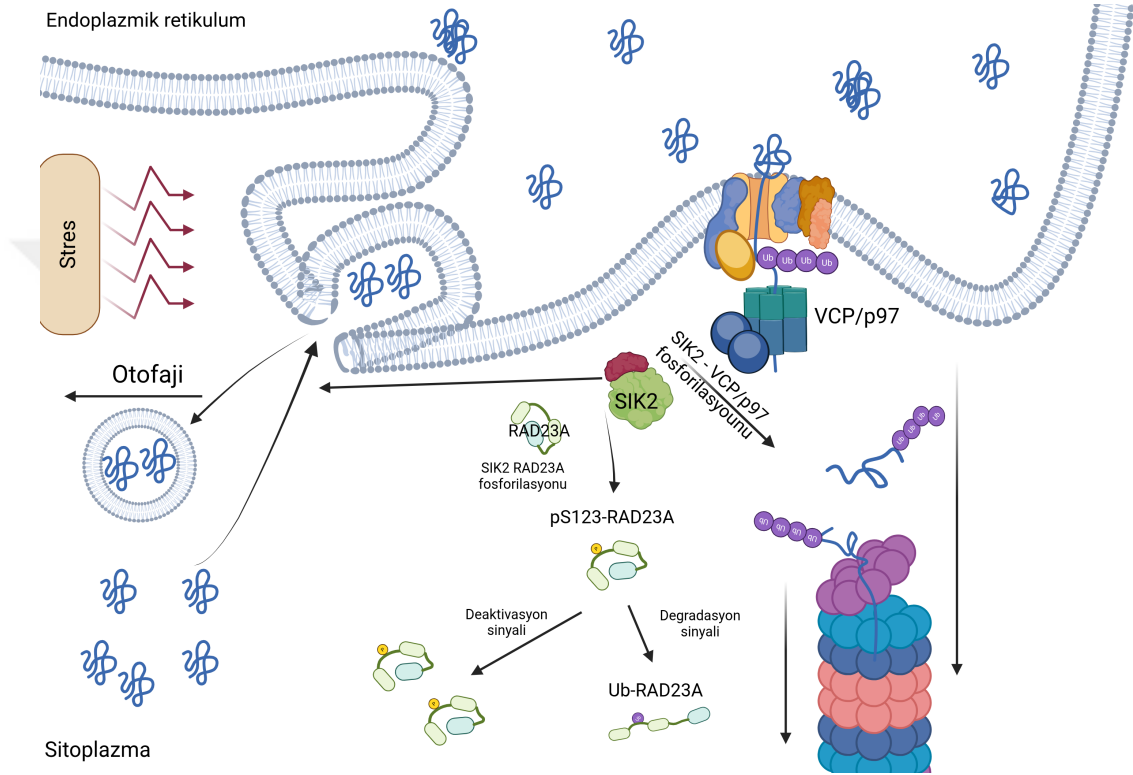


Şekil 5.13: SIK2'nin, hem ERAD (VCP/p97 aracılığıyla) hem de sitoplazmik proteozomal yıkım yollarını koordine ederek, RAD23A'nın aktivitesini artırma model önerisi. SIK2, stres altında aktive olarak hem ER'deki proteinlerin taşınmasını hızlandırmakta hem de RAD23A'nın konformasyonel aktivasyonu ile sitozolik protein yıkımını dengelemektedir.

5.7.2. SIK2 ile Deaktivasyonun Olası Etkileri

Laboratuvarımızda yürütülen çalışmalar ve literatürdeki mevcut bilgiler, SIK2 proteininin hücresel yıkım sistemleri olan otofaji ve ERAD (Endoplazmik Retikulumla İlişkili Yıkım) ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, SIK2 aracılığıyla RAD23A'nın inaktive edilmesi, sitoplazmadaki katlanmamış proteinlerin yıkım sürecini

yavaşlatabilir. Bu durum, hücrenin alternatif bir yıkım mekanizması olan otofajiye yönelmesini kolaylaştırabilir. Bu durum SIK2'nun strese bağlı süreçte bir anahtar rolü olabileceğini önermektedir. ERAD açısından bakıldığında ise, sitoplazmadan gelen katlanmamış protein yükünün azaltılması, ER içinde bulunan proteinlerin yıkımına öncelik tanıyan bir düzenleme mekanizması olabilir. Böylece hücre, proteostazı sağlamak adına kaynaklarını daha stratejik kullanabilecek bir modülasyona yönelmiş olabilir.



Şekil 5.14: SIK2'nin, hücresel stres koşullarında öncelikle ERAD sistemini aktive edip RAD23A'yı fosforilasyon veya ubikuitinasyon yoluyla inaktive ederek sitoplazmik yıkımı geçici olarak baskılaması ve sonrasında otofajik yolla proteostazı sürdürmesi model önerisi. Bu çok adımlı modülasyon, hücrenin farklı bölümlerinde biriken hatalı proteinlerin koordineli bir şekilde yıkımını mümkün kılabilir.

Bu bağlamda önerilen modele göre, SIK2 hücresel stres altında öncelikle ERAD sistemini aktive ederek endoplazmik retikulumda biriken katlanmamış proteinlerin yıkımını hızlandırır. ERAD sisteminin verimli çalışabilmesi için ise sitoplazmada gerçekleşen proteazomal yıkımın geçici olarak yavaşlatılması gerekebilir. Bu süreci dengelemek adına SIK2, RAD23A'yı inaktive ederek sitoplazmik proteozomal yıkımın etkinliğini

azaltabilir. SIK2'nin bu inhibisyonu gerçekleştirmek için iki farklı mekanizmayı kullanabileceği ne sürülmektedir:

- SIK2, RAD23A üzerinde gerçekleřtirdiėi fosforilasyon ile onun ubiquitinlenmesini engelleyerek, proteazoma substrat sunma kapasitesini azaltıyor olabilir;
- Alternatif olarak, SIK2 RAD23A'nın kendisini ubiquitin yoluyla hedefleyerek, doğrudan RAD23A'nın degradasyonunu tetikliyor olabilir.

Her iki durumda da SIK2 aracılığıyla RAD23A aktivitesinin azalması, sitoplazmik proteozomal yıkımın geçici olarak baskılanmasına ve böylece ERAD'ın öncelikli olarak çalışmasına olanak sağlar.

Bu sürecin ardından, hücresel stresin çözülmemesi veya sitoplazmada protein birikiminin artması durumunda, SIK2 bu kez otofaji mekanizmasını devreye alarak proteostazı sürdürebilir. Bu dinamik düzenleme sayesinde SIK2, farklı yıkım yolları arasında geçiş yaparak hücresel kaynak kullanımını optimize eden bir koordinatör rolü üstlenebilir (şekil 5.14).

KAYNAKLAR

- [1] Hetz C., Papa F. R., (2018), “The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control”.
- [2] Mueller T. D., Feigon J., (2003), “Structural determinants for the binding of ubiquitin-like domains to the proteasome”, EMBO Journal.
- [3] Hiyama H., Yokoi M., Masutani C., Sugasawa K., Maekawa T., Tanaka K., Hoeijmakers J. H., Hanaoka F., (1999), “Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome”, Journal of Biological Chemistry.
- [4] Ciechanover A., (1994), “The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway”.
- [5] Dikic I., Schulman B. A., (2023), “An expanded lexicon for the ubiquitin code”.
- [6] Finley D., (2009), “Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome”.
- [7] Collins G. A., Goldberg A. L., (2017), “The Logic of the 26S Proteasome”.
- [8] Budenholzer L., Cheng C. L., Li Y., Hochstrasser M., (2017), “Proteasome Structure and Assembly”.
- [9] Martin A., Baker T. A., Sauer R. T., (2008), “Pore loops of the AAA+ ClpX machine grip substrates to drive translocation and unfolding”, Nature Structural and Molecular Biology.
- [10] Nathan J. A., Tae Kim H., Ting L., Gygi S. P., Goldberg A. L., (2013), “Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes?”, EMBO Journal.
- [11] Ortolan T. G., Chen L., Tongaonkar P., Madura K., (2004), “Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway”, Nucleic Acids Research.
- [12] Funakoshi M., Sasaki T., Nishimoto T., Kobayashi H., (2002), “Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- [13] Cohen-Kaplan V., Livneh I., Avni N., Fabre B., Ziv T., Kwon Y. T., Ciechanover A., (2016), “p62- and ubiquitin-dependent stress-induced autophagy of the mammalian 26S proteasome”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(47), E7490–E7499.
- [14] Yip M. C., Bodnar N. O., Rapoport T. A., (2020), “Ddi1 is a ubiquitin-dependent protease”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- [15] Madsen L., Schulze A., Seeger M., Hartmann-Petersen R., (2007), “Ubiquitin domain proteins in disease”.
- [16] Bedford L., Lowe J., Dick L. R., Mayer R. J., Brownell J. E., (2011), “Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitinating-proteasome system as drug targets”.

- [17] Husnjak K., Elsasser S., Zhang N., Chen X., Randles L., Shi Y., Hofmann K., Walters K. J., Finley D., Dikic I., (2008), "Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor", *Nature*.
- [18] Walters K., Lech P., Goh A., Wang Q., Howley P., (2003), "Structure of the DNA repair protein hHR23a".
- [19] Cappadocia L., Lima C. D., (2018), "Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism".
- [20] Dikic I., Wakatsuki S., Walters K. J., (2009), "Ubiquitin-binding domains from structures to functions".
- [21] Tsuchiya H., Ohtake F., Arai N., Kaiho A., Yasuda S., Tanaka K., Saeki Y., (2017), "In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-Linked Chain Specificity of the Proteasome", *Molecular Cell*.
- [22] Tsuchiya H., Endo A., Saeki Y., (2020), "Multi-step ubiquitin decoding mechanism for proteasomal degradation".
- [23] Walters K. J., Lech P. J., Goh A. M., Wang Q., Howley P. M., (2003), "DNA-repair protein hHR23a alters its protein structure upon binding proteasomal subunit S5a", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- [24] Vijay-Kumar S., Bugg C., Cook W., (1987), "1UBQ- STRUCTURE OF UBIQUITIN".
- [25] Ferrell K., Deveraux Q., Van Nocker S., Rechsteiner M., (1996), "Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease", *FEBS Letters*.
- [26] Lasker K., Förster F., Bohn S., Walzthoeni T., Villa E., Unverdorben P., Beck F., Aebersold R., Sali A., Baumeister W., (2012), "Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- [27] Sakata E., Bohn S., Mihalache O., Kiss P., Beck F., Nagy I., Nickell S., Tanaka K., Saeki Y., Förster F., Baumeister W., (2012), "Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- [28] AlphaFold (n.d.), "26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4".
- [29] Uniprot (n.d.), "26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4".
- [30] Horike N., Takemori H., Katoh Y., Doi J., Min L., Asano T., Sun X. J., Yamamoto H., Kasayama S., Muraoka M., Nonaka Y., Okamoto M., (2003), "Adipose specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2", *Journal of Biological Chemistry*.
- [31] Qiao L. Y., Zhande R., Jetton T. L., Zhou G., Sun X. J., (2002), "In vivo phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents", *Journal of Biological Chemistry*.

- [32] AlphaFold (n.d.), “Serine/threonine-protein kinase SIK2”.
- [33] Honorato R. V., Trellet M. E., Jiménez-García B., Schaarschmidt J. J., Giulini M.,
Reys V., Koukos P. I., Rodrigues J. P., Karaca E., van Zundert G. C., Roel-Touris J.,
van Noort C. W., Jandová Z., Melquiond A. S., Bonvin A. M., (2024), “The
HADDOCK2.4 web server for integrative modeling of biomolecular complexes”,
Nature Protocols.
- [34] Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., Berendsen H.
J.,
(2005), “GROMACS: Fast, flexible, and free”.
- [35] Hess B., Kutzner C., Van Der Spoel D., Lindahl E., (2008), “GRGMACS 4:
Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation”,
Journal of Chemical Theory and Computation.
- [36] Jorgensen W. L., Maxwell D. S., Tirado-Rives J., (1996), “Development and
testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties
of organic liquids”, Journal of the American Chemical Society.
- [37] Gromacs teams (n.d.), “Gromacs User Manual ”.
- [38] Hyndman R. J., Koehler A. B., (2006), “Another look at measures of forecast
accuracy”, International Journal of Forecasting.
- [39] Coutsiás E. A., Seok C., Dill K. A., (2004), “Using quaternions to calculate
RMSD”, Journal of Computational Chemistry.
- [40] Sebastian Raschka (2014), “Molecular docking, estimating free energies of
binding, and AutoDock’s semi-empirical force field”, Sebastian Raschka’s Website.
- [41] Lee B., Richards F. M., (1971), “The interpretation of protein structures:
Estimation of static accessibility”, Journal of Molecular Biology.
- [42] Stepto R., Chang T., Kratochvíl P., Hess M., Horie K., Sato T., Vohlídal J.,
(2015), “Definitions of terms relating to individual macromolecules, macromolecular
assemblies, polymer solutions, and amorphous bulk polymers (IUPAC
recommendations 2014)”, Pure and Applied Chemistry.
- [43] Daura X., Gademann K., Jaun B., Seebach D., Van Gunsteren W. F., Mark A. E.,
(1999), “Peptide folding: When simulation meets experiment”, Angewandte Chemie -
International Edition, 38(1-2), 236–240.
- [44] Berendsen H. J., van der Spoel D., van Drunen R., (1995), “GROMACS: A
message-passing parallel molecular dynamics implementation”, Computer Physics
Communications.
- [45] Gewers F. L., Ferreira G. R., De Arruda H. F., Silva F. N., Comin C. H.,
Amancio D. R., Costa L. D. F., (2021), “Principal component analysis: A natural
approach to data exploration”, ACM Computing Surveys.

ÖZGEÇMİŞ

Devran Karagöz,

Lisans eğitimini 2014–2020 yılları arasında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde tamamlamıştır. Lisans eğitimi süresince 2018 yılında Gebze Teknik Üniversitesi OBEDİA Laboratuvarı’nda ve 2020 yılında Arel Üniversitesi Moleküler Dinamik Laboratuvarı’nda yirmi iş günü süren staj çalışmalarında bulunmuştur. 2017 yılında METAJEOLOJİ Sanayi Tic. Ltd. Şti.’nde jeoloji laboratuvarında, 2020–2021 yılları arasında Techno Health Laboratuvar Diagnostik Sağlık Hizmetleri San. ve Tic. Ltd. Şti.’nde çalışmıştır. Temmuz 2021 tarihinden itibaren Genomize Bilişim ve Biyoteknoloji A.Ş.’de araştırma ve geliştirme faaliyetleri kapsamında profesyonel kariyerine devam etmektedir.



TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR

[1] Devran K., Ferruh Ö., (2025), “RAD23 Homolog A Proteninin 26S Proteozomu Bağlantılı Proteolitik Yıkımdaki Rolünü Moleküler Dinamik Kullanılarak Modellenmesi”, 9. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu.



EKLER

Tez Kapsamında gerçekleştirilen MD simülasyonları dahilinde kullanılan dosyalar, kodlar ve parametreler ekler kısmında yer almaktadır. Tez kapsamında gerçekleştirilen bütün MD simülasyonları TÜBİTAK Truba sunucularında GROMACS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her analize ait slurm dosyası oluşturulmuş. "sbatch" komutu kullanılarak işler servera gönderilmiştir.

EK-A MD simülasyonlarında Kullanılan mdp dosyaları

Enerji minimizasyonu MDP dosyası;

```
; Run control
integrator = steep
nsteps = 50000
; EM criteria and other stuff
emtol = 100
emstep = 0.01
niter = 20
nbgscorr = 10
; Output control
nstlog = 1
nstenergy = 1
; Neighborsearching and short-range nonbonded interactions
cutoff-scheme = verlet
nstlist = 1
ns_type = grid
pbc = xyz
rlist = 1.4
; Electrostatics
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.4
; van der Waals
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = Force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.4
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr = EnerPres
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.16
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-05
epsilon_surface = 0
; Temperature and pressure coupling are off during EM
tcoupl = no
pcoupl = no
gen_vel = no
; options for bonds
constraints = h-bonds ; we only have C-H bonds here
constraint-algorithm = lincs
continuation = no
lincs-order = 4
```

NVT MDP dosyası;

```
define = -DPOSRES ; position restrain the protein and ligand
; Run control
integrator = md ;leap-frog integrator
tinit = 0
dt = 0.002
nsteps = 500000 ; 1000 ps
; Output control
nstxout = 1000
nstvout = 1000
nstlog = 1000
nstenergy = 1000
; Neighborsearching and short-range nonbonded interactions
cutoff-scheme = verlet
nstlist = 20
ns_type = grid
pbc = xyz
rlist = 1.2
; Electrostatics
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
; van der Waals
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = Force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr = EnerPres
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.16
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-05
epsilon_surface = 0
; Temperature coupling
; tcoupl is implicitly handled by the sd integrator
tcoupl = V-rescale
tc-grps = Protein Non-Protein
tau_t = 1.0 1.0
ref_t = 310 310
; Pressure coupling is off for NVT
Pcoupl = No
gen_vel = yes
gen_temp = 310
gen_seed = -1
constraints = h-bonds
constraint-algorithm = lincs
continuation = no
lincs-order = 4
lincs-iter = 1
```

NPT MDP dosyası;

```
; Run control
integrator = md ;leap-frog integrator
tinit = 0
```

```

dt = 0.002
nsteps = 100000 ; 1000 ps
nstcomm = 100
; Output control
nstxout = 1000
nstvout = 1000
nstlog = 1000
nstenergy = 1000
nstxout-compressed = 1000
; Neighborsearching and short-range nonbonded interactions
cutoff-scheme = verlet
nstlist = 20
ns_type = grid
pbc = xyz
rlist = 1.2
; Electrostatics
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
; van der Waals
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = Force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr = EnerPres
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.16
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-05
epsilon_surface = 0
; Temperature coupling
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein Non-Protein
tau_t = 1.0 1.0
ref_t = 310 310
; Pressure coupling is on for NPT
Pcoupl = Berendsen
tau_p = 2.0
pcoupltype = isotropic
compressibility = 4.5e-05
ref_p = 1.0
refcoord_scaling = com
gen_vel = no
constraints = h-bonds
constraint-algorithm = lincs
continuation = yes
lincs-order = 4
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS

```

NPT2 MDP dosyası;

```

; Run control
integrator = md ;
tinit = 0
dt = 0.002
nsteps = 500000 ; 1000 ps
nstcomm = 100

```

```

; Output control
nstxout = 1000
nstvout = 1000
nstlog = 1000
nstenergy = 1000
nstxout-compressed = 1000
; Neighborsearching and short-range nonbonded interactions
cutoff-scheme = verlet
nstlist = 20
ns_type = grid
pbc = xyz
rlist = 1.2
; Electrostatics
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
; van der Waals
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = Force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr = EnerPres
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.16
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-05
epsilon_surface = 0
; Temperature coupling
; tcoupl is implicitly handled by the sd integrator
tcoupl = V-rescale
tc-grps = Protein Non-Protein
tau_t = 1.0 1.0
ref_t = 310 310
; Pressure coupling is on for NPT
Pcoupl = Parrinello-Rahman
tau_p = 1.0
pcoupltype = isotropic
compressibility = 4.5e-05
ref_p = 1.0
gen_vel = no
constraints = h-bonds
constraint-algorithm = lincs
continuation = yes
lincs-order = 4
refcoord-scaling = com

```

MD MDP dosyasi;

```

; Run control
integrator = md
tinit = 0
dt = 0.002
nsteps = XXXXXXXX ; It has been changed according to the MD analysis time.
nstcomm = 100
; Output control
nstxout = 0
nstvout = 0

```

```

nstfout = 0
nstlog = 5000
nstenergy = 5000
nstxout-compressed = 5000
; Neighborsearching and short-range nonbonded interactions
cutoff-scheme = verlet
nstlist = 20
ns_type = grid
pbc = xyz
rlist = 1.2
; Electrostatics
coulombtype = PME
rcoulomb = 1.2
; van der Waals
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = Force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr = EnerPres
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.16
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-05
epsilon_surface = 0
; Temperature coupling
tcoupl = V-rescale
tc-grps = Protein Non-Protein
tau_t = 1.0 1.0
ref_t = 310 310
; Pressure coupling is on for NPT
Pcoupl = Parrinello-Rahman
pcoupltype = isotropic
tau_p = 2.0
compressibility = 4.5e-05
ref_p = 1.0
gen_vel = no
constraints = h-bonds
constraint-algorithm = lincs
continuation = yes
lincs-order = 4

```

EK-B MD simülasyonlarında kullanılan komutlar

```

echo 15|gmx pdb2gmx -f ${input_pdb_file} -o processed.gro -water spce -ignh
gmx editconf -f processed.gro -o newbox.gro -c -d 1.0 -bt cubic
gmx solvate -cp newbox.gro -cs spc216.gro -o solv.gro -p topol.top
gmx grompp -f ions.mdp -c solv.gro -p topol.top -o ions.tpr
echo 13|gmx genion -s ions.tpr -o solv_ions.gro -p topol.top -pname NA -nname
CL -neutral -conc 0.1

```

```

echo 0 q|gmx make_ndx -f solv_ions.gro -o index.ndx

```

```

gmx grompp -f em_steep.mdp -c solv_ions.gro -r solv_ions.gro -p topol.top -o
min_steep.tpr -n index.ndx

```

```

gmxd mdrun -v -deffnm min_steep

gmxd grompp -f nvt.mdp -c min_steep.gro -r min_steep.gro -p topol.top -o nvt.
    tpr -n index.ndx
gmxd mdrun -v -ntmpi 4 -ntomp 10 -npme 1 -nb gpu -bonded gpu -pme gpu -deffnm
    nvt

gmxd grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -r nvt.gro -p topol.top -t nvt.trr -o npt.tpr
    -n index.ndx
gmxd mdrun -v -ntmpi 4 -ntomp 10 -npme 1 -nb gpu -bonded gpu -pme gpu -deffnm
    npt

gmxd grompp -f npt2.mdp -c npt.gro -r npt.gro -p topol.top -t npt.trr -o npt2.
    tpr -n index.ndx
gmxd mdrun -v -ntmpi 4 -ntomp 10 -npme 1 -nb gpu -bonded gpu -pme gpu -deffnm
    npt2

gmxd grompp -f md.mdp -c npt2.gro -r npt2.gro -p topol.top -t npt2.cpt -o md.
    tpr -n index.ndx
gmxd mdrun -v -ntmpi 4 -ntomp 10 -npme 1 -nb gpu -bonded gpu -pme gpu -deffnm
    md

```

EK-C MD analizlerinde kullanılan komutlar

```

echo 10 0 | gmxd energy -f min_steep.edr -o potential.xvg
echo 16 0 | gmxd energy -f nvt.edr -o temperature.xvg
echo 18 0 | gmxd energy -f npt.edr -o pressure.xvg
echo 24 0 | gmxd energy -f npt.edr -o density.xvg
echo 18 0 | gmxd energy -f npt2.edr -o pressure2.xvg
echo 24 0 | gmxd energy -f npt2.edr -o density2.xvg

echo 1 1 | gmxd trjconv -s min_steep.tpr -f md.xtc -o md_pbc.xtc -pbc mol -
    center
echo 1 1 | gmxd trjconv -s solv_ions.gro -f md_pbc.xtc -o md_nojump.xtc -fit
    rot+trans
echo 1 1 | gmxd trjconv -s solv_ions.gro -f md_nojump.xtc -o md_nojump.pdb -dt
    10

echo 1 1 | gmxd rms -s md.tpr -f md.xtc -n index.ndx -tu ns -o rmsd.xvg -dt 10
echo 1 | gmxd rmsf -f md.xtc -s md.tpr -o rmsf.xvg -res -dt 10
echo 1 | gmxd gyrate -s md.tpr -f md.xtc -o gyrate.xvg -dt 10
echo 1 | gmxd sasa -f md.xtc -s md.tpr -o sasa.xvg -oa atomic-sasa.xvg -or
    residue-sasa.xvg -dt 10

gmxd grompp -f md_rerun.mdp -c npt2.gro -t npt2.cpt -p topol.top -n index.ndx -
    o ie.tpr
gmxd mdrun -deffnm ie -rerun md.xtc -nb cpu -ntmpi 110

echo 17 | gmxd energy -f ie.edr -o Coul-SR:Protein-Protein.xvg
echo 18 | gmxd energy -f ie.edr -o LJ-SR:Protein-Protein.xvg
echo 21 | gmxd energy -f ie.edr -o Coul-SR:Protein-Solvent.xvg
echo 22 | gmxd energy -f ie.edr -o LJ-SR:Protein-Solvent.xvg

echo 1 1 | gmxd cluster -s md.tpr -f md.xtc -o clusters.xpm -sz cluster-sizes.
    xvg -cutoff 0.1 -method gromos -dt 10 -cl clusters.pdb -n index.ndx

```

```
echo 3 3 | gmx covar -s md.tpr -f md.xtc -o eigenval.xvg -v eigenvec.trr  
echo 3 3 | gmx anaeig -v eigenvec.trr -s md.tpr -f md.xtc -proj pca_proj.xvg
```

