

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEMELİLERDE BULUNAN SODYUM KANALLARININ HOMOLOJİ
MODELLEMESİ VE DOĞRULUĞUNUN TEST EDİLMESİ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali Osman ACAR

Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ

ARALIK 2017

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Hamza KURT
Anabilimdalı Başkan V.

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 151611013 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ali Osman ACAR** 'ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**MEMELİLERDE BULUNAN SODYUM KANALLARININ HOMOLOJİ MODELLEMESİ VE DOĞRULUĞUNUN TEST EDİLMESİ**" başlıklı tezi **07.11.2017** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ**
TOBB Ekonomive Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Fatih YAŞAR (Başkan)**
Hacettepe Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ersin Emre ÖREN
TOBB Ekonomive Teknoloji Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Ali Osman ACAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEMELİLERDE BULUNAN SODYUM KANALLARININ HOMOLOJİ

MODELLEMESİ VE DOĞRULUĞUNUN TEST EDİLMESİ

Ali Osman ACAR

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ

Tarih: Aralık 2017

Hücre zarı birbirine kenetlenmiş lipid moleküllerinden oluşur ve iyonlara geçirgen değildir. Hücreye iyon taşınımını gerçekleştiren yapılar zar boyunca uzanan integral proteinlerdir. İyon kanalları, bu integral proteinlere örnek verilebilir. Voltaj kapılı sodyum (Nav) kanalları iyon kanalları ailesinin önemli bir üyesidir ve fizyolojik süreçleri denetleyen aksiyon potansiyellerini başlatan yapılardır. İyon kanallarının bozulmasıyla kalıtsal epilepsi, migren, periyodik paralizi, kardiyak aritmi ve kronik ağrı sendromları oluşmaktadır. Son zamanlarda ortaya çıkan bakteriyel sodyum kanallarının kristal yapıları bu konuda çalışmaya olanak sağlamıştır. Kristal yapısı bilinen bir örneği kullanarak bilinmeyen bir kristal yapıyı tahmin etme işlemi homoloji modeli olarak adlandırılmaktadır. Memelilerde bulunan dokuz farklı fonksiyona sahip sodyum (Nav1.1-Nav1.9) kanallarının kristal yapısı bilinmemektedir. Bu nedenle memelilerde bulunan sistemlerin modellenmesi için bilinen benzer sistemler baz alınarak homoloji modellenmesi yardımıyla üç boyutlu yapılar elde edilmektedir. Ancak memeliler ile diğer yapıların protein dizilimlerindeki benzerliğin az oluşu bu işlemi zorlaştırmaktadır. Yakın zamanda

amerikan hamam böceğinden elde edilen bir kristal yapı, memelilerde iyon geçirgenliğinin denetlendiği bölgede (S5-S6 Bölgesi) %90 oranında yüksek bir benzerlik göstermektedir. Bu nedenle yaptığımız modellemelerde NavPaS (PDB kodu: 5X0M) kristal yapısı baz alınmıştır. Memelilerde bulunan kanalların kristal yapıları bilinmemelerine rağmen bu kanallara seçici olarak bağlanan bazı toksinler hakkında deneysel sonuçlar mevcuttur. Geliştirdiğimiz modellerin geçerliliği (validasyonu) moleküler dinamik simülasyonları yardımıyla bağlanan toksinler hakkında bilgi edinip, bu bilgilerin deneysel sonuçlarla karşılaştırılması aracılığıyla yapılmaktadır. Geliştirilen modeller memelilerde iyon geçirgenliği ve toksin bağlanması mekanizmalarının anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Homoloji modellemesi, Voltaj kapılı sodyum kanalları, Moleküler dinamik simülasyonu, Toksin bağlanması

ABSTRACT

Master of Science

HOMOLOGY MODELING OF MAMMALIAN SODIUM CHANNELS AND THEIR VERIFICATION

Ali Osman ACAR

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Micro and Nanotechnology Science Programme

Supervisor: Prof. Dr. Turgut BAŞTUĞ

Date: December 2017

Cell membranes consist of two layers of lipid molecules and are impermeable to ions. Ion transportation across the membrane comes true by means of integral proteins such as ion channels. Voltage gated sodium (Na_V) channels are essential elements in ion channels family that responsible for the rapid upstroke of the action potential. Disruption of any ion channels leads to hereditary epilepsy, migraine, periodic paralysis, cardiac arrhythmia and chronic pain syndromes. The crystal structures of bacterial Na_V channels that have been determined recently, have made way for studies of mammalian Na_V channels through homology modeling. The process of predicting an unknown crystal structure using a known crystal structure is called homology modeling. The crystal structures of nine isoforms of sodium channels ($Nav1.1$ - $Nav1.9$) found in the mammals are unknown. For this reason, crystal structures are obtained by using homology modeling based on known structures for modeling the systems found in mammals. However, homology modeling becomes difficult because of differences between mammalian and bacterial Na_V channels. A crystal structure recently obtained from american

cockroach shows a high similarity of 90% in the region where ion permeability occurs in mammals (S5-S6 Region). So our model is based on this crystal structure called NavPaS (PDB ID: 5X0M). Although the crystal structures of the channels found in mammals are not known, experimental results are available for some toxins that selectively bind to these channels. The validation of the models we have developed is based on the knowledge of toxin binding by molecular dynamic simulations and the comparison of these data with the experimental results. The developed models play a key role in understanding the mechanisms of ion permeability and toxin binding in mammals.

Keywords: Homology modeling, Voltage gated sodium channels, Molecular dynamics simulations, Toxin binding

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren değerli hocam Prof.Dr. Turgut Baştuğ' a, tecrübelerinden faydalandığım Dr. Serdar Kuyucak ve Dr. Murat Çavuş' a, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği ve Biyomedikal Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine ve destekleriyle her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 115Z505 kodlu TÜBİTAK projesi ve TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK ve TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesine teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | vi |
| TEŞEKKÜR | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| ŞEKİL LİSTESİ | x |
| ÇİZELGE LİSTESİ | xi |
| KISALTMALAR | xii |
| SEMBOL LİSTESİ | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Voltaj Kapılı İyon Kanalları | 1 |
| 1.2 Voltaj Kapılı Sodyum (NaV) Kanalları..... | 3 |
| 1.2.1. Bakteriyel sodyum kanalları | 4 |
| 1.2.2. Memeli sodyum kanalları | 5 |
| 1.3 Tetrodotoksin | 6 |
| 2. MOLEKÜLER DİNAMİK | 9 |
| 2.1 Teori | 10 |
| 2.2 Kuvvet Alanları..... | 11 |
| 2.3 Moleküler Dinamik Parametreleri | 12 |
| 2.4 Serbest Enerji Hesaplamaları..... | 12 |
| 2.4.1 Şemsiye örnekleme metodu | 13 |
| 2.4.2 Serbest enerji pertürbasyon metodu | 14 |
| 3. HOMOLOJİ MODELLEMESİ | 17 |
| 3.1 NavMs Baz Alınarak Geliştirilen Nav1.4 Modeli..... | 18 |
| 3.2 NavPaS Baz Alınarak Geliştirilen Nav1 Modelleri | 21 |
| 4. GELİŞTİRİLEN MODELLERİN GEÇERLİLİKLERİNİN TESTİ | 27 |
| 4.1 Simülasyon Sisteminin Kurulması..... | 27 |
| 4.2 NavMs kanalı baz alınarak geliştirilen Nav1.4 modelinin Moleküler Dinamik Simülasyonu..... | 29 |
| 4.3 NavPaS kanalı baz alınarak geliştirilen Nav1.3, Nav1.4 ve Nav1.5 Yapılarının Moleküler Dinamik Simülasyonu | 31 |
| 4.4 NavPaS, Nav1.4 ve Nav1.5 Yapılarına TTX Bağlanması..... | 32 |
| 4.5 Nav1.4 Kanalı için Na ⁺ /K ⁺ seçiciliğinin hesaplanması | 34 |
| 4.6 NavPaS ve Nav1.4 Yapıları İçin PMF Hesabı..... | 35 |
| 5. SONUÇ VE TARTIŞMA | 39 |
| KAYNAKLAR | 41 |
| EKLER | 45 |
| ÖZGEÇMİŞ | 53 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1 : Voltaj kapılı sodyum kanallarının yapısı | 2 |
| Şekil 1.2 : NavAb adlı sodyum kanalının üstten görünümü | 3 |
| Şekil 1.3 : NavAb yapısının voltaj sensörü bölgesi çıkarılarak elde edilen, gözenek bölgesindeki iki bölgenin yandan görünümü..... | 4 |
| Şekil 1.4 : NavMs ve Nav1.4 yapıları arasında seçici bölge etrafında P ilmeklerini içeren hizalama işlemi | 5 |
| Şekil 1.5 : Tetrodotoksin (TTX) molekülünün yapısı | 6 |
| Şekil 2.1 : Şemsiye örnekleme metodu | 13 |
| Şekil 2.2 : Etan molekülünün etanol molekülüne dönüşümü | 15 |
| Şekil 3.1 : NavPaS ve Nav1.4 kanallarının üstüste oturtulmuş görünümü..... | 22 |
| Şekil 4.1 : Nav1.4 modelinin zar yüzeylerine göre duruşu..... | 28 |
| Şekil 4.2 : Örnek Simülasyon Sistemi | 28 |
| Şekil 4.3 : NavMs kanalı için RMSD hesabı | 29 |
| Şekil 4.4 : NavMs kanalında seçici filtreyi oluşturan bağlar | 30 |
| Şekil 4.5 : NavPaS, Nav1.3 ve Nav1.5 modellerinin RMSD hesabı..... | 31 |
| Şekil 4.6 : Nav1.4 modelinin RMSD hesabı..... | 32 |
| Şekil 4.7 : Nav1.4 modeline TTX bağlanmasında etkili olan atomların birbirlerine olan uzaklıklarının zamana bağlı değişimi | 33 |
| Şekil 4.8 : NavPaS, Nav1.4 ve Nav1.5 yapılarına TTX bağlanmasında, TTX molekülünün bağlanma bölgesine olan uzaklığı..... | 33 |
| Şekil 4.9 : Seçicilik serbest enerjisi hesaplaması | 35 |
| Şekil 4.10 : Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesabı | 37 |
| Şekil Ek.1 : NavAb kanalının yandan ve üstten görünümü | 46 |
| Şekil Ek.2 : NavPas, Nav1.3 ve Nav1.4 yapılarının hizalama işlemi | 47 |
| Şekil Ek.3 : NavPaS ve Nav1.5 yapılarının hizalama işlemi | 48 |
| Şekil Ek.4 : Nav1.4 – TTX kompleksi için kenetlenme kümesi ve bağlanma pozisyonu..... | 49 |

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Çizelge 1.1 : Nav1 kanallarının TTX duyarlılığını gösteren EC ₅₀ değerleri..... | 7 |
| Çizelge 1.2 : Nav1.4 kanalına TTX bağlanmasında etkili olan rezidüel | 8 |
| Çizelge 3.1 : Bakteriyel NavMs kanalı ile Memeli Nav1 kanalları arasındaki hizalama işlemi | 19 |
| Çizelge 3.2 : NavPaS baz alınarak geliştirilen Nav1.4 ve Nav1.5 modelleri için RMS uzaklık değerleri | 24 |
| Çizelge 3.3 : NavPaS ve Nav1.4 kanallarında bulunan Sistein rezidülerinin oluşturduğu bağlar | 25 |

KISALTMALAR

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| TTX | : Tetrodotoksin |
| MD | : Moleküler Dinamik |
| RMS | : Kare-Karekök Ortalama |
| PMF | : Ortalama Kuvvet Potansiyeli |
| WHAM | : Ağırlıklı Histogram Analiz Metodu |
| FEP | : Serbest Enerji Perturbasyonu |

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| m | Kütle |
| F | Kuvvet |
| a | İvme |
| r | Konum |
| t | Zaman |
| V | Potansiyel Enerji |
| k | Esneklik sabiti |
| θ, φ | Açı |
| q | Elektrik yükü |
| ϵ_0 | Boşluğun elektriksel geçirgenliği |
| ϵ | Tam derinlik |
| P | Momentum |
| K_d | Bozunma Sabiti |
| R | Yarıçap |
| N_A | Avagadro Sayısı |
| T | Sıcaklık |
| k_B | Boltzmann sabiti |

1. GİRİŞ

Elektriksel sinyaller, canlıların günlük hayatta gerçekleştirdiği görme, düşünme ve hissetme gibi temel faaliyetlerinde önemli rol oynarlar. Aksiyon potansiyeli olarak da adlandırılan elektrik sinyalleri, sinir sistemindeki bilgileri ve fizyolojik süreçleri düzenlerler [Payandeh ve ark., 2011]. Bir ağ oluşturan bu sinyallerin oluşumu hücre zarlarının iç ve dış bölgeleri arasındaki potansiyel fark ile ilişkilidir. Hücrelerin iç ve dış bölgeleri arasında bir potansiyel fark oluşmasının birincil sebebi ise hücre zarları boyunca iyonların taşınmasıdır. İyon kanalları, hücre zarı boyunca iyon taşınımından sorumlu olan zar proteinleridir. Sodyum kanalları, iyon kanalları ailesinin üyeleridir. Çalışmaların bu kanallar üzerine yoğunlaşmasının asıl sebebi sodyum kanallarının bozulmasıyla kalıtsal epilepsi, migren, periyodik paralizi, kardiyak aritmi ve kronik ağrı sendromları oluşmaktadır [Ryan ve Ptacek, 2010]. Son zamanlarda ortaya çıkarılan bazı bakteriyel sodyum kanallarının atomistik yapı verileri, moleküler dinamik simülasyonları gibi bilgisayar destekli modelleme teknikleriyle birleştirilerek sodyum kanallarının fonksiyonel özellikleri araştırılmaktadır. Ancak atomistik yapı verileri olarak tanımlanan kristal yapılar, memeliler için henüz ortaya çıkarılmamıştır.

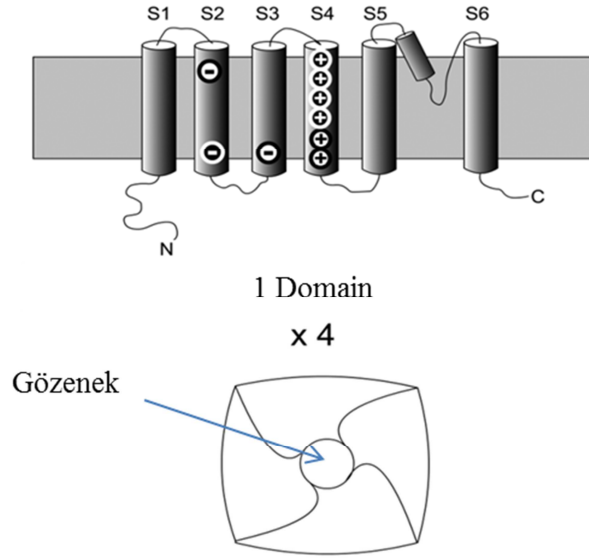
Bu tez çalışması kapsamında memelilerde bulunan sodyum kanallarının modellenmesi ve bu modellerin doğruluğunun moleküler dinamik simülasyonları kullanılarak test edilmesi amaçlanmıştır.

1.1 Voltaj Kapılı İyon Kanalları

Proteinler, 20 farklı aminoasitten oluşan yapılardır. Protein zincirinde sıralanan aminoasitlere rezidü denir. Karbon, azot ve oksijen içererek tekrarlayan diziye de omurga (backbone) adı verilir. İyon kanalları, hücre zarı boyunca uzanan ve iyon akışını düzenleyen proteinlerdir. Voltaj kapılı iyon kanalları, kanalda zar

potansiyelindeki değişikliklere yanıt olarak açılıp kapanan özel bir iyon kanalı sınıfı olup, iyonların elektrokimyasal gradyan yönünde iletimine izin verirler. Hücre zarı boyunca iletilen katyon türüne bağlı olarak iyon kanalları üç temel sınıfta incelenebilirler. Bunlar voltaj kapılı sodyum, potasyum ve kalsiyum kanallarıdır. Bu üç temel sınıfın her biri zar boyunca uzanan 4 bölge ve toplam 24 α -helis içermek üzere ortak bir yapıya sahiptirler.

Her bir bölge zar boyunca uzanan S1, S2, S3, S4, S5 ve S6 helisler olarak adlandırılan 6 adet α -helis içerir (Şekil 1.1). Bu helisler arasından S4 helisi olarak adlandırılan helis bütün voltaj kapılı iyon kanallarında yüksek oranda korunur ve kanalın voltaj sensörü görevini üstlenir. Hücre zarının oluşturduğu yüzeye dik bir

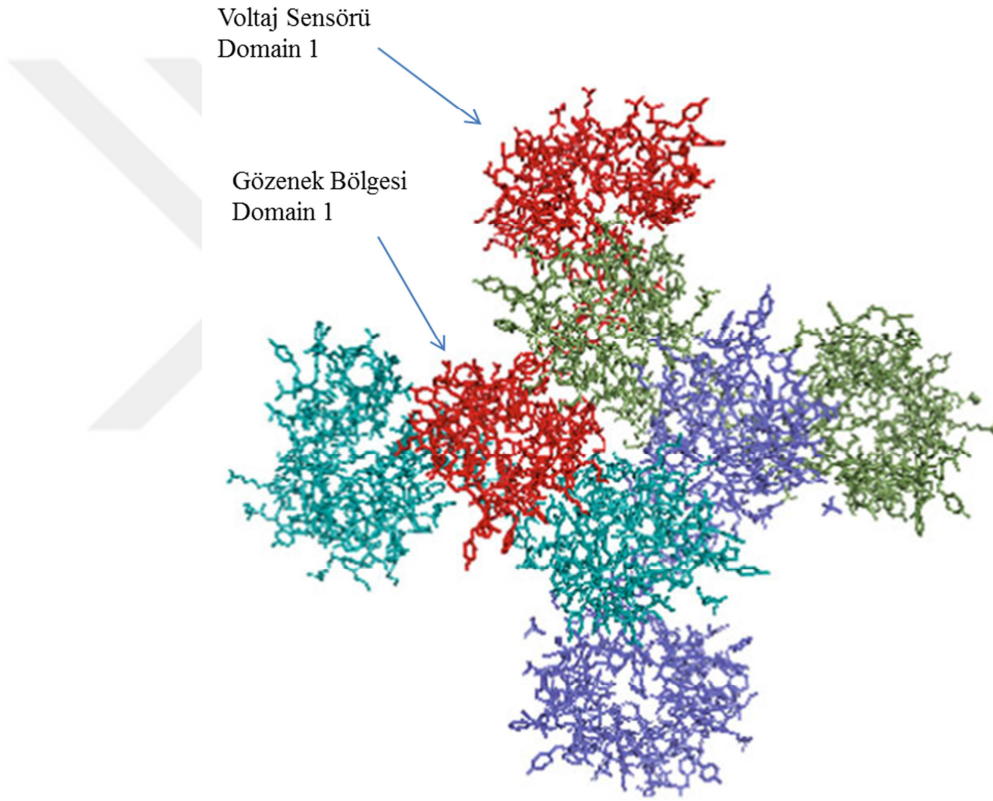


Şekil 1.1 : Voltaj kapılı sodyum kanallarının yapısı [Bezanilla., 2005].

doğrultudan bakıldığında kanalın orta bölgesinde gözenek (pore) oluşumu görünür ve iyon akışı bu gözeneklerde gerçekleşir (Şekil 1.1). Bu gözenek bölgesi her bir bölgede bulunan S5 ve S6 helislerinin arasında kalan bölge olup, seçici filtre yapısı da bu bölgede bulunmaktadır [Heinemann ve ark., 1992]. Gözeneğin hücre dışına yakın bölgesinde S5 ve S6 helislerinin arasında bulunan bölgeler P-ilmekleri olarak adlandırılırlar.

1.2 Voltaj Kapılı Sodyum (NaV) Kanalları

Sodyum kanalları üzerine çalışmaların dönüm noktası sayılabilecek bir nokta NaChBac adlı bakteriyel sodyum kanalının tanımlanması ve açıklanması olmuştur [Catterall, 2001]. Kanalın fonksiyonel yapısının açıklanmasına rağmen bir kristal yapı keşfi bundan 10 yıl sonra gerçekleşmiştir. NavAb olarak adlandırılan bu kanal



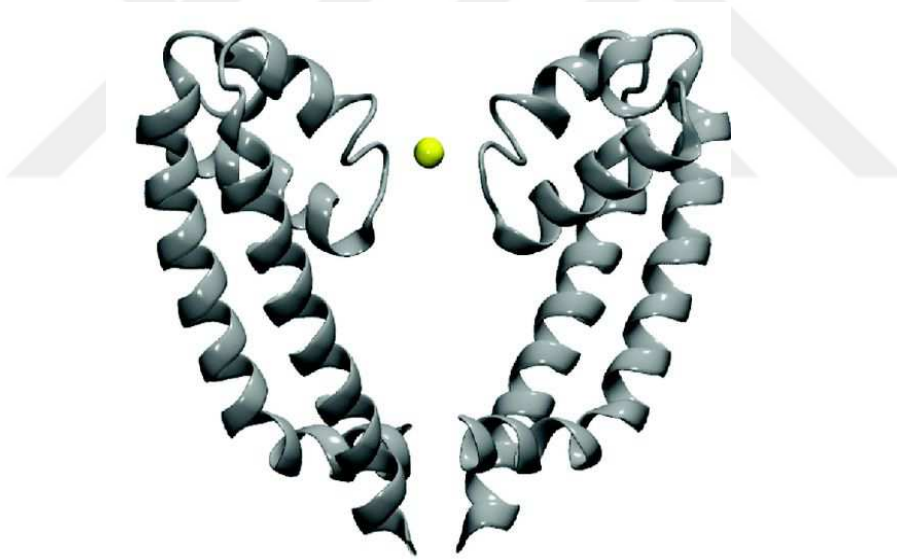
Şekil 1.2 : NavAb adlı sodyum kanalının üstten görünümü [Scheuer., 2014].

ilk açıklanan NaChBac kanalının bir türdeşidir [Payandeh ve ark., 2011]. Daha sonra NavMs adlı bir kanalın daha kristal yapısı açıklanmıştır [McCusker ve ark., 2012]. Ortaya çıkarılan bu kristal yapılar, bilgisayar destekli simülasyonlar yardımıyla kanalların iyon geçirgenliği, aktifliklerini gösteren açılma kapanma mekanizmaları gibi çalışmaların yolunu açmıştır. Çalışmaların bu kanallar üzerine yoğunlaşmasının asıl sebebi Nav kanallarının bozulmasıyla yukarıda bahsi geçen

hastalıklarla ilişkili olmasıdır [Ryan ve Ptacek, 2010]. Literatürde bakteriyel kanallar üzerine yapılan çalışmalar yaygındır. Ancak memelilerde henüz bir kristal yapının çıkartılmamış olması bu alandaki çalışmaları sınırlandırmaktadır. Bu çalışma kapsamında memelilerde bulunan $Na_v1.4$ adlı sodyum kanalının tutarlı bir modelini elde etmek amaçlanmıştır. Her ne kadar yapı ve fonksiyonel olarak bakteriyel ve memelilerde bulunan sodyum kanalları benzerlik taşısa da bu iki farklı sınıfın ayrı ayrı ele alınması gerekir.

1.2.1. Bakteriyel sodyum kanalları

Bakteriyel sodyum kanallarından ortaya çıkan ilk yapı *Arcobacter butzleri* adlı bakteriden çıkarılan Na_vAb kanalıdır. Şekil 1.2' de Na_vAb kanalının üstten görünümü incelenirse orta bölgeyi saran dört parça (bölge) ve onların dışında yine



Şekil 1.3 : Na_vAb yapısının voltaj sensörü bölgesi çıkarılarak elde edilen, gözenek bölgesindeki iki bölgenin yandan görünümü [Gordon ve ark., 2013].

dört parça daha bulunmaktadır. En dış bölgede bulunan dört parça voltaj sensör bölgeleridir. Gözenek bölgeleri olarak adlandırılan iç kısım da dört parçadan oluşmaktadır. Yapısal olarak sodyum kanallarının tamamı bu dört gözenek bölgesi ve dört voltaj sensör bölgesi içerir. Gözenek bölgesi daha önce de bahsedildiği üzere S5-S6 helis olarak adlandırılan α -helisler tarafından oluşturulur. Ayrıca her bir

bölgede S1'den S6'ya kadar 6 α -helis olmak üzere 24 α -helis vardır. Bu özellikler bütün sodyum kanallarında ortaktır. Gözeneği oluşturan dört bölge bakteriyel kanallarda özdeştir. Yani bakteriyel kanalların tamamının elde edilmesi için tek bir bölgenin bilinmesi yeterlidir. Şekil 1.3' te NavAb kanalının yandan görünümü verilmiş olup, kanalın üst tarafı hücre dışını, alt tarafı hücre içini ve sarı küre Na iyonunu temsil etmektedir. İyonun bulunduğu bölge seçici filtre olarak adlandırılan bölgedir. NavAb kanalı için dört bölgenin de simetrik olması seçici filtreyi oluşturan aminoasitlerinde simetrik olmasını gerektirir. Seçici filtre bölgesinde bulunan en önemli rezidü GLU177 'dir. Bu rezidü simetrik yapıdan dolayı dört kere tekrarlanıp EEEE rezidüleri olarak seçici filtreyi oluşturur [Heinemann ve ark., 1992; Yang ve ark., 1993; Ellinor ve ark., 1995]. Bu rezidüler üstten bakıldığında bir halka gibi yerleştiğinden filtreyi oluşturan bu rezidü grubu iç halka olarak isimlendirilir. Seçici filtrenin altında kavite adı verilen bölge vardır. (EK 1)

1.2.2. Memeli sodyum kanalları

Memelilerde bulunan sodyum kanallarında ilk göze çarpan sekansların, bakteriyel kanallara göre daha uzun olmasıdır. Sekans uzunluğunun farklı olması sonraki bölümlerde bahsedilecek olan homoloji modellemesi işleminde bazı zorluklara yol açmaktadır. Memelilerde farklı dokularda karşılaşılan dokuz tane sodyum kanalı vardır. Bunlar (Nav1.1' den Nav1.9'a kadar) sodyum kanalı izoformları olarak adlandırılır. Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 ve Nav1.6 merkezi sinir sisteminde, Nav1.4 iskelet kasında, Nav1.5 kalp kasında ve Nav1.7, Nav1.8 ve Nav1.9 periferik sinir sisteminde görev alır [Zimmer ve ark., 2014]. Nav1 kanallarında da dört gözenek bölgesi ve dört voltaj sensörü bölgesi bulunur. Bakteriyel kanallarda bu dört gözenek

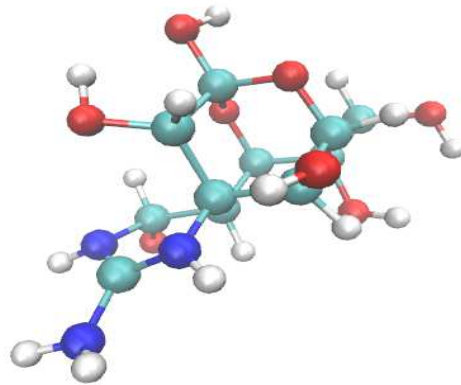
| | | P1-helix | SF | P2-helix | |
|------------|------|-----------|-------|------------|------|
| NavMs | 167 | SLYTLFQVM | TLESW | SMGIVRPVMN | 190 |
| Domain-I | 389 | AFLALFRLM | TQDYW | ENLFQLTLRA | 412 |
| Domain-II | 744 | SFLIVFRIL | CGE-W | I-ETMWDCME | 765 |
| Domain-III | 1226 | GYLSLLQVA | TFKGW | -MDIMQPQYE | 1248 |
| Domain-IV | 1518 | SIICLFEIT | TSAGW | D-GLLNPILN | 1540 |

Şekil 1.4 : NavMs ve Nav1.4 yapıları arasında seçici bölge etrafında P ilmeklerini içeren hizalama işlemi.

bölgesi simetrik olarak yerleşirken, Nav1 kanallarında simetrik değildir. Bu nedenle yapı ve fonksiyon olarak Nav1 kanalları bakteriyel kanallara benzese de sekans dizilimi farklılık göstermektedir. Bakteriyel kanalların seçici filtre bölgesinde EEEE halkası görülürken, memelilerde bulunan kanallarda ASP, GLU, LYS ve ALA rezidülerinin oluşturduğu DEKA halkası karşımıza çıkar [Mahdavi ve ark., 2014]. Seçici filtreyi oluşturan bu bölgenin üstünde tamamı negatif yüklü olan bir halka daha vardır. Bakteriyel kanallarda filtreyi oluşturan rezidülerin tamamı negatif yüklü iken, artık memelilerde iki negatif, bir pozitif ve bir de yüksüz rezidü vardır. NavMs bakteriyel kanalı ve Nav1.4 kanalının seçici filtre bölge çevresindeki sekansları Şekil 1.4’ te gösterilmektedir. Seçici filtre bölgesindeki simetrik yapının bakteriyel kanallardan memelilere geçişte bozulması, bakteriyel kanallar baz alınarak geliştirilen memeli sodyum kanalı modellemelerini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle elde edilen homoloji modeli mutlaka deneysel verilerle test edilmelidir. Deneysel verilerle test edilmiş bir yapının elde edilmesi durumunda bu yapının diğer sodyum kanallarına uyarlanması daha kolaydır. Buradaki motivasyon izoformlar arasındaki yüksek benzerlik oranıdır. Eğer bu kanallardan bir tanesi tutarlı bir şekilde modellenilebilirse az sayıda mutasyonla diğer kanallar da modellenilebilir.

1.3 Tetrodotoksin

Tetrodotoksin düşük molekül ağırlıklı nörotoksitesi yüksek bir moleküldür. Bu molekülde pozitif yüklü bir guanidyum grubu ve pirimidin halkasına bağlı C-4, C-6,



Şekil 1.5 : Tetrodotoksin (TTX) molekülünün yapısı.

C-8, C-9, C-10 ve C-11 pozisyonlarında altı hidroksil grubu bulunmaktadır (Şekil 1.5). Tetrodotoksin, kirpi balıklarından veya fuguların (tetraodontide ailesi) dokularından (karaciğer, bağırsaklar, gonadlar, deri, böbrek, kan) izole edilebilen bir nörotoksindir. Sinir sisteminde voltaj kapılı sodyum kanallarının alt tipleri fizyolojik ve patafizyolojik proseslerde geniş yer tutmasından dolayı nörologlar tarafından bu bölgelerdeki mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlamak için kullanılmıştır. Önceki çalışmalarda, TTX molekülünün ağrı sendromlarının bloke edilmesinde potansiyel bir rol oynadığı gösterilmiştir [Hagen ve ark.,2006]. TTX farklı sodyum kanallarına farklı afinetelerle bağlanan bir moleküldür. Kanallar arasındaki aminoasit diziliminin farklı olması kanalların TTX' e karşı farklı direnç oluşturmalarına neden olmaktadır. Bugün Nav kanallarının 9 farklı fonksiyona sahip formunun aminoasit dizilimleri aydınlatılmıştır. Bu izoformlar arasındaki sekans benzerlik oranı çok yüksektir. TTX in bağlanma afinitesi yan zincirler ve TTX arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 ve Nav1.7 TTX ' e oldukça duyarlıdır. Nav1.4 ve Nav1.6' nın da TTX' e duyarlı olduğu ancak Nav1.5, Nav1.8 ve Nav1.9 'un TTX'e karşı dirençli olduğu bilinmektedir [Lee ve ark., 2008]. Zira bu özelliğin homoloji modelinde elde edilmesi yapının doğruluğu için test

Çizelge 1.1 : Nav1 kanallarının TTX duyarlılığını gösteren EC50 değerleri [Lee ve Ruben., 2008].

| Kanal | TTX duyarlılığı | Bölge |
|--------|-----------------|------------------------|
| Nav1.1 | 6 nM | Merkezi Sinir Sistemi |
| Nav1.2 | 18 nM | Merkezi Sinir Sistemi |
| Nav1.3 | 4 nM | Merkezi Sinir Sistemi |
| Nav1.4 | 25 nM | İskelet Kası |
| Nav1.5 | 5.7 µM | Kalp |
| Nav1.6 | 6 nM | Merkezi Sinir Sistemi |
| Nav1.7 | 24.5 nM | Çevresel Sinir Sistemi |
| Nav1.8 | 60 µM | Çevresel Sinir Sistemi |
| Nav1.9 | 40 µM | Çevresel Sinir Sistemi |

olacaktır. Çizelge 1.1’ de TTX molekülünün Nav1 yapılarına bağlanmasında elde edilen deneysel sonuçlar verilmiştir. Bu çalışmanın sonunda geliştirilen modellere TTX bağlanması incelenecek ve bu bağlanma bilgileriyle deneysel sonuçlar karşılaştırılarak modellerin geçerliliği test edilecektir. Nav1.4-TTX kompleks yapısında bağ yapan rezidülerde mutasyon yaparak bağ sabitindeki değişikliğin ölçülmesiyle TTX bağlanmasına katkısı olan bağlar bilinmektedir [Penzotti ve ark., 1998]. Nav1.4-TTX kompleks yapısında etkili olan rezidüler Çizelge 2’de verilmiştir. Çizelge 1.2’ den anlaşılacağı üzere Nav1.4-TTX kompleks yapısında etkili olan rezidüler önem sırasına göre E755, K1237 ve D400 (iç halka), E403, E758 ve D1532 (dış halka) şeklindedir.

Çizelge 1.2 : Nav1.4 kanalına TTX bağlanmasında etkili olan rezidüler [Penzotti ve ark., 1998].

| Mutasyon | Dengede IC50 değerleri (μM) | IC50 oranı |
|--------------|--|------------|
| Doğal Nav1.4 | 0.036 ± 0.006 | 1 |
| D400A | 6 ± 0.7 | 168 |
| E403Q | 161 ± 14 | 4521 |
| E755A | 229 ± 21 | 6412 |
| E758Q | 6.2 ± 0.3 | 174 |
| K1237A | 23 ± 2 | 641 |
| M1240E | 87 ± 5 | 2433 |
| M1240K | 238 ± 17 | 6678 |
| D1532N | 1.5 ± 0.2 | 43 |

2. MOLEKÜLER DİNAMİK

Bir proteinin fonksiyonları, en genel anlamda kristal yapısıyla ilişkilidir. Her ne kadar kristal yapı bilgisini veren çok sayıda metot bulunsa da bir kristal yapı yüksek çözünürlükle ve tam olarak iki temel yolla tayin edilebilir: X ışınları kristalografisi ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi. Kristal yapısı elde edilen proteinler, protein veri bankasına aktarılarak araştırmacılarla paylaşılır. Ancak her protein için kristal yapı tayini beklenildiği kadar kolay değildir. Örneğin zar proteinlerinin kristal yapılarının elde edilmesi zor ve pahalı bir iştir. Eğer yapısı bilinmeyen bir protein söz konusu ise bu noktada modelleme teknikleri devreye girer. Genellikle bu modelleme tekniklerinde yapısı bilinen bir ya da daha fazla protein kullanılarak, yapısı bilinmeyen bir protein için model hazırlanması amaçlanır. Burada yapılan ön kabullenme genellikle benzer fonksiyonlara sahip proteinlerin, evrimsel olarak ilişkili olup benzer kristal yapılar taşıdığıdır [Xiang, 2006]. Geliştirilen modeller moleküler dinamik simülasyonları gibi tekniklerle dinamik bir şekilde incelenerek yapıların fonksiyonel özellikleri araştırılabilir.

Moleküler sistemlerin simülasyonları, atomistik etkileşimlerin tanımlanmasına göre iki temel sınıfta incelenebilir. Birinci sınıfta kuantum mekaniksel (QM) simülasyonlar vardır. Bu sınıfta hesaplamalara elektronlarda dahil edilir ve sistemin enerjisi Schrodinger denklemi çözülerek elde edilir. İkinci sınıfta moleküler mekanik (MM) vardır. Bu sınıfta sadece atom çekirdeği göz önüne alınarak, hareket ve atomların etkileşimleri klasik fizik çerçevesinde incelenir. Biyolojik makromoleküller ile çalışıldığında atom sayılarının artması beraberinde hesaplama gücünün de artması gerekliliğini doğurur. Bu tür sistemler için pratikte kuantum mekaniksel hesaplamalar yapmak şu anda mümkün değildir. Bu tür sistemleri incelemek için klasik fizik çerçevesiyle gerçekleştirilen moleküler dinamik simülasyonları yapılmaktadır.

Moleküler Dinamik (MD), atomların hareketlerini inceleyen bir simülasyon türüdür. Bu teknikte başlangıçta belirli konumlarda bulunan atomların etkileşimine izin verilip, Newton hareket denklemleri çözülerek belirli bir zaman dilimi sonrasında atomların yeni koordinatları hesaplanır. Böylece atomların davranışları zamana bağlı olarak görülebilir. Bu tür bir simülasyonu gerçekleştirmek için ilk gerekli bilgi atomların ilk konumları yani kristal yapısıdır. Eğer ilk başlangıç yapısı mevcut ise sonraki gereklilik bir etkileşim potansiyelidir. Bu potansiyel atomların hangi etkileşimler göz önüne alınarak hareket ettiğini belirler. Etkileşim potansiyelini tanımladıktan sonra son gereklilik oluşan yeni durumları üretecek bir algoritmadır. Newton hareket denklemleri her bir atom için çözülür ve yeni konumlarının belirlenmesiyle moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilir. Burada tanımlanan etkileşim potansiyeli genellikle kuvvet alanı olarak isimlendirilir.

2.1 Teori

Moleküler dinamik simülasyonlarında, N tane atomun zaman içerisinde devinimini incelemek için Newton'ın ikinci hareket yasasının her bir atom için çözülmesi gerekir. Bu yasa sistemde bulunan herhangi bir atom için,

$$\mathbf{F}_i = m_i \cdot \mathbf{a}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (2.1)$$

şeklinde yazılabilir. Bu ifadede i numaralı atoma etki eden net kuvvet (F_i),

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_i V(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (2.2)$$

şeklinde tanımlanabilir. Denklem 2.2, sistemin toplam potansiyel enerji fonksiyonunun (V) atomların konumuna göre değişiminden, atomlara etki eden kuvvetin tayin edilebileceğini söyler. Bu nedenle sistemin toplam potansiyel enerji fonksiyonu tanımlanırsa herhangi bir t anında konumu bilinen bir atomun Δt kadarlık bir süre sonra nerede olacağı hesaplanabilir. Atomistik bir simülasyonda en hızlı hareket modu hidrojenin bağ titreşim hareketidir. Bu nedenle hidrojenin hareketinde simülasyona dahil etmek için Δt zaman aralığı 0.5 - 2 femtosaniye (fs) olarak sınırlıdır.

2.2 Kuvvet Alanları

Bir önceki bölümde bahsedildiği gibi sistemde bulunan herhangi bir atomun zaman içinde devinimini incelemek için sistemin toplam potansiyel enerji fonksiyonunun tanımlanması gerekir. Atomların etkileşimini betimleyen bu potansiyel enerji fonksiyonu kuvvet alanı olarak adlandırılır ve etkileşimlerin doğasına göre iki sınıfa ayrılabilir. Birinci sınıf bağlı etkileşimleri içerir ve

$$U_{bağlı} = \sum_{ij} \frac{k_{ij}^r}{2} (r_{ij} - r_0)^2 + \sum_{ijk} \frac{k_{ijk}^\theta}{2} (\theta_{ijk} - \theta_0)^2 + \sum_{ijkl} V_{ijkl} [1 + \cos(n\varphi_{ijkl} - \varphi_0)] \quad (2.3)$$

şeklinde verilir [Baştuğ ve ark., 2012]. Denklem 2.3'teki ilk iki harmonik terim bağ gerilmesi ve bükülmesini temsil eder. Son terim ise dört komşu atomun sahip olduğu burulma enerjisidir.

Toplam potansiyel enerji fonksiyonuna etki eden ikinci sınıf, bağlı olmayan etkileşimlerdir. Bağlı olmayan etkileşimlerden biri elektrostatik etkileşimdir. Elektrostatik Coulomb potansiyel enerjisi,

$$U_{ele} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}, \quad r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j| \quad (2.4)$$

şeklinde tanımlanır. Burada r_{ij} etkileşen atomlar arasındaki uzaklık, q_i ve q_j etkileşime giren atomların elektriksel yükleridir. Bağlı olmayan etkileşimlerden gelen katkıların bir diğeri de 6-12 Lennard–Jones potansiyelidir. Bu potansiyel,

$$U_{LJ} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.5)$$

şeklinde ifade edilir. Van der Waals etkileşiminin sonucu olarak doğan bu ifade iki parça halinde incelenebilir. Bu parçalardan kabaca r^{-12} ile değişen bölge yakın mesafelerde çekirdeklerin birbirini itmesinden ve r^{-6} ile değişen bölge ise daha uzak mesafelerde London dispersiyon kuvveti olarak da bilinen çekici kuvveti temsil eder. Ayrıca bu ifadede “ ϵ ” potansiyel kuyusunun derinliğini temsil eden bir parametre olup iki parçacığın ne kadar güçlü etkileştikleri bilgisini içerir ve “ σ ” ise etkileşen

iki parçacığın ne kadar yaklaşabileceğinin bir ölçüsü olan Van der Waals yarıçapıdır. Sistemin toplam potansiyel enerji fonksiyonu, yukarıda verilen bilgilerin bir bütünü olarak ele alınabilir. Geliştirilen kuvvet alanının parametrizasyonu kuantum mekaniksel hesaplamaların deneysel sonuçlarla uyumuna dikkat edilerek yapılır.

2.3 Moleküler Dinamik Parametreleri

Bölüm 2.1 ve 2.2' de bahsedilen teori ve kuvvet alanları ışığında gerçekleştirilen moleküler dinamik simülasyonları için kullanılan prosedür ve parametreler bu bölümde verilmiştir. Bu çalışmada, zar proteinleri için yapılan çalışmalarda doğruluğu test edilmiş MD parametreleri kullanılmıştır [Mahdavi ve ark. ,2014; Mahdavi ve ark. 2015; Gordon ve ark. ,2013]. Kullanılan konfigürasyon dosyası EK 5' te verilmiştir. Gerçekleştirilen MD simülasyonlarında, CHARMM36 [Huang ve ark., 2013] kuvvet alanı ve NAMD [James ve ark., 2005] simülasyon paketi kullanılmıştır. Simülasyonlar NPT kümesi altında periyodik sınır koşullarıyla gerçekleştirilmiştir. NPT kümesinin kullanılması, sabit parçacık sayısı, sabit basınç ve sabit sıcaklık kullanılarak gerçekleştirildiği anlamına gelir. Basınç ve sıcaklık, sönüm katsayısı 5 ps^{-1} olmak üzere Langevin eşleştirmesi kullanılarak sabit tutulmuştur. Sıcaklık değeri 300K ve basınç 1 atm'dir. Lennard-Jones etkileşmeleri 12 \AA uzaklığında keskin bir şekilde bitirilmiştir. Elektrostatik etkileşimler particle-mesh Ewald algoritması kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir MD adımı 2 fs seçilmiştir.

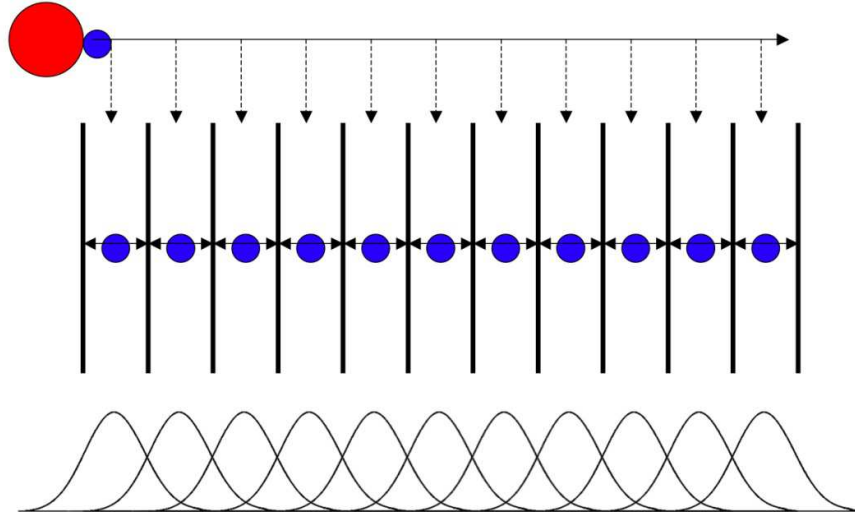
2.4 Serbest Enerji Hesaplamaları

Bu tez çalışmasının amacı doğrultusunda geliştirilen Nav1 modellerinin geçerliliklerinin testinde, bu modellere seçici olarak bağlanmakta olan TTX molekülü kullanılacaktır. Bu molekülün Nav1 kanallarına bağlanmasında deneysel sonuçlar mevcuttur. Bu deneysel sonuçlar ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla TTX molekülünün Nav kanallarına bağlanma sabitini tayin etme işlemi serbest enerji hesaplamalarıyla yapılacaktır. Bir reaksiyon koordinatı boyunca serbest enerji profili elde etmenin bir yolu Ortalama Kuvvet Potansiyeli (PMF) hesabı yapmaktır.

Reaksiyon koordinatı boyunca herhangi iki nokta arasındaki serbest enerji farkı, bir noktadan diğerine giderken yapılan işe eşittir. Ancak bu ifadenin sadece tersinir süreçlerde geçerli olduğu bilinmelidir. Serbest enerji hesapları, yola bağlı ve yoldan bağımsız olmak üzere iki farklı şekilde yapılabilir. Bu çalışma kapsamında her ikisi de kullanılmıştır. Yola bağlı serbest enerji hesabı, Şemsiye örnekleme metodu ve WHAM metodu ile yapılmıştır. Yoldan bağımsız serbest enerji de FEP metodu ile yapılmıştır. Aşağıda her iki metod hakkında da bilgi verilmiştir.

2.4.1 Şemsiye örnekleme metodu

Bu tez çalışmasında Ortalama Kuvvet Potansiyeli hesabında kullanılacak metod Şemsiye Örnekleme (Umbrella Sampling) metodudur. Bu yöntemde, sistemi bir



Şekil 2.1: Şemsiye örnekleme metodu [Lemkul .,2017].

termodinamik durumdan diğerine geçirirken bir ek potansiyel (bias) kullanılır. Bu ek potansiyel genellikle harmonik potansiyel olarak seçilir. Bu iki termodinamik durum arasındaki geçişte ara noktalar reaksiyon koordinatı boyunca örneklenir. Örnekleme her biri pencere olarak adlandırılır. Her bir pencerede reaksiyon koordinatındaki dağılım kullanılarak serbest enerji profili hesaplanabilir. Şekil 2.1' de temsili olarak reaksiyon koordinatı boyunca örnekleme ve her bir pencerede dağılım gösterilmiştir. Bu gösterimde örnekleme boyunca dışarıdan hiçbir potansiyel hissedilmiyorsa Şekil 2.1'de olduğu gibi tam örnekleme koordinatı

etrafında bir dağılım görülecektir. Ancak bu örnekleme bir potansiyel etkisi altındaysa dağılımın merkez koordinatında bir kayma söz konusu olacaktır. İşte bu kayma miktarı bize oradaki gerçek potansiyel hakkında bilgi verebilir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, hesaplanan serbest enerji profiline ilaveten dışarıdan verilen ek potansiyeli de içerecektir. Bu ek potansiyeli, hesaplanan son profilden çıkarmak için Ağırlıklı Histogram Analiz Metodu (WHAM) kullanılır [Kumar ve ark., 1992]. Geliştirilen modeller için yapılan PMF hesaplarının ayrıntıları 4. Bölümde verilecektir.

2.4.2 Serbest enerji pertürbasyon metodu

Serbest Enerji Pertürbasyon (free energy perturbation) yöntemi, hesaplamalı kimya alanına bilgisayarların girişinden uzun bir süre öncesine kadar uzanır [Zwanzig, 1954]. Pertürbasyon teorisi, tam olarak çözümlenemeyen bir problemin, bu probleme bağlı kesin olarak çözülebilen başka bir problemden yola çıkılarak yaklaşık bir çözüm elde etmek için matematiksel metotlar içeren teoridir. Kesin olarak çözümlenebilen problemin matematiksel tanımına küçük bir terim eklenerek eldeki problem formüle edilebiliyorsa, pertürbasyon teorisi uygulanabilir. Hedef sistemin hamiltonyeni, referans sisteminin hamiltonyeninin ve pertürbasyon teriminin toplamı ile temsil edilir.

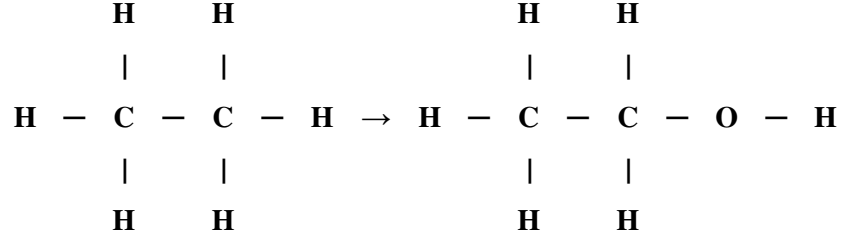
FEP çatısı içinde, a ve b gibi iki alternatif durum arasındaki serbest enerji farkı aşağıdaki gibi ifade edilir [Zwanzig, 1954; Beveridge ve ark., 1989].

$$\Delta A_{a \rightarrow b} = -\frac{1}{\beta} \ln \langle \exp\{-\beta[H_b(x, p_x) - H_a(x, p_x)]\} \rangle_a \quad (2.6)$$

Burada $\beta = 1/k_B T$, k_B Boltzmann sabiti, T sıcaklıktır. $H_a(x, p_x)$ ve $H_b(x, p_x)$ sırasıyla a ve b durumlarında tanımlanan Hamiltonyenlerdir. $\langle \dots \rangle_a$ referans a durumunda ilk konfigürasyon temsili boyunca küme ortalamasını ifade eder. Eşdeğer olarak tersinir (reverse) proses için serbest enerji,

$$\Delta A_{b \rightarrow a} = -\frac{1}{\beta} \ln \langle \exp\{-\beta[H_a(x, p_x) - H_b(x, p_x)]\} \rangle_b \quad (2.7)$$

şeklinde yazılır. Küme ortalamasını (ensemble average) elde edebilmek için başlangıç (a) ya da son (b) durumu üzerinden simülasyon çalıştırıp istatistiksel olarak toplarız. Başlangıç ve son durum arasında örtüşüm olmaması durumunda



Şekil 2.2 : Etan molekülünün etanol molekülüne dönüşümü.

problem ortaya çıkacaktır. Şayet a ve b durumu arasındaki enerji farkı $|H_b - H_a| \gg kT$ olması halinde fiziksel olmayan ara durumlar tanımlanır. Fiziksel olmayan ara durumların tanımlanmasıyla serbest enerji:

$$\begin{aligned}
 \Delta A_{b \rightarrow a} &= A(b) - A(a) \\
 &= [A(b) - A(N)] + [A(N) - A(N-1)] \\
 &\quad + \dots \\
 &\quad + [A(2) - A(1)] + [A(1) - A(a)]
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

şeklinde hesaplanır. Burada tanımlanan ara durumun fiziksel bir durum olmadığı altı çizilerek tekrar belirtilmelidir. Bir örnek olarak etan (C_2H_6) molekülünün (a durumu) etanol (C_2H_5O) molekülüne (b durumu) dönüştürülmesine bakalım.

MD kullanarak bu iki durum arasında düzgünce interpolate edebiliriz. Bu durumda sistemin toplam hamiltoniyenini ikili bir hamiltoniyen olup,

$$H = H_0 + \lambda H_a + (1 - \lambda) H_b \tag{2.9}$$

şeklinde λ eşleştirme parametresi ile yazabiliriz. Burada H_0 , hamiltoniyeni C_2H_5 kısmını temsil eder, başlangıç ve son durumda aynıdır. H_a hamiltoniyeni H atomunun ve H_b hamiltoniyeni OH^- molekülünün etkileşme potansiyellerini temsil etmektedir. Serbest enerji farkı aldığımızda H_0 kısmının katkısı elenmektedir.

Eşleştirme parametresi $\lambda = 0$ ' dan $\lambda = 1$ ' e ara değerler almaktadır. λ eşleştirme parametresinin seçiminde dikkat edilecek tek husus $|H_b - H_a| \cong kT$ koşulunun sağlanmasıdır. Her bir λ değerinde hem denge durumuna getirme hem de $\Delta A_{n \rightarrow (n-1)}$ serbest enerjisinin istatistiksel verisinin toplanması için MD simülasyonu gerekmektedir [Heinzelmann ve ark., 2011]. Sistemin çok iyi dengede olmaması halinde pek çok FEP enerjisinin yanlış hesaplandığını tecrübeyle öğrenmiş bulunmaktayız.

Ara durumların fiziksel olmamaları nedeniyle bu yöntem "Alchemical Free Energy" olarak da adlandırılmaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılacak olan bu yöntemin uygulamasına 4. bölümde değinilecektir.

3. HOMOLOJİ MODELLEMESİ

Günümüzde gelişen yüksek çözünürlüklü görüntüleme teknikleri protein yapılarının ve fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Her ne kadar spektroskopik tekniklerle kristal yapılar tayin edilse de doğada bulunan bir çok sistem düşünüldüğünde bu yol zaman ve maddi kaynaklar açısından zorlayıcı bir yoldur. Bu bağlamda, yeni geliştirilen metotlarla bilgisayar destekli modelleme teknikleri ve veri bankalarında artan yapı bilgileri kullanılarak elde edilen üç boyutlu protein yapıları bu boşluğu doldurmak için iyi bir seçenektir.

Proteinler en genel anlamda aminoasitlerin arka arkaya sıralanmasıyla oluşurlar. Bu sıralanmaya sekans adı verilir. Kıyaslamalı modelleme ya da homoloji modellemesi, daha önceden bilinen bir sekans ve yapı bilgisini kullanarak bir model oluşturma tekniğidir. Bu modelleme tekniğinin temel fikri, evrimsel olarak ilişkili sekanslara sahip proteinlerin benzer fonksiyonlara sahip olmalarıdır [Vyas ve ark., 2012]. Bu fikir proteinlerin sekanslarına göre sınıflandırılmasını sağlar. Böylece aynı ailede bulunan proteinlerin evrimsel olarak ilişkili yani homolog ya da türdeş olduğunu söyleyebiliriz. Bu bilgiler ışığında kristal yapısı bilinmeyen bir proteinin sekansı, bu ailelerle eşleştirilip aynı aile içerisinde seçilecek şablon kristal yapılar yardımıyla modellenebilir.

Bu modelleme türünde yapılan ilk iş sekansı bilinen ancak kristal yapısı bilinmeyen yapının geliştirilmesinde baz alınacak yapıyı tespit etmektir. Literatürde kullanılan BLAST ve PSI-BLAST [Altschul ve ark., 1997], SSEARCH [Smith ve Waterman, 1981; Pearson, 1991], FASTA [Pearson ve Lipman, 1988] gibi sekans benzerliği tarayan programlar mevcuttur. Hedef proteinin sekansı bu programlardan birine gönderilerek benzerlik oranı yüksek bir ya da birden fazla şablon sekans bulunabilir. Daha sonraki işlem, şablon olarak baz alınacak kristal yapının sekansı ile bilinmeyen yapının sekansı için hizalama (alignment) işlemidir. Sekansların hizalama işleminde

evrimsel olarak korunan rezidüer tespit edilir. Bu rezidüer modelleme esnasında yapısal bilgiyi taşıdıklarından kilit rol oynarlar.

Korunmayan ya da mutasyona uğrayan rezidüer hizlama işleminde ortaya çıkarlar. Bu nedenle hizlama işleminin iyi bir modelin elde edilmesi açısından çok önemlidir. Hizlama işleminin için literatürde ClustalW [Larkin ve ark., 2007], T-coffee [Notredame ve ark., 2000] gibi programlar mevcuttur. Hizlama işleminde dikkat edilecek bir husus sekans uzunluğudur. Bu algoritmalar sekans uzunluğu baz alınarak geliştirildiğinden çalışılan sisteme özgü hizlama programı seçilmelidir. Hizlama işleminin sonra hedef sekans ve baz alınan yapı, Modeller [Sali ve ark., 1993] ya da SWISS-MODEL [Arnold ve ark., 2006] tarzında bir homoloji modelleme yazılımına gönderilir.

Şu anda literatürde yapılan çalışmalar yüksek bir oranla bakteriyel Na_V kanalları üzerinedir. Bunun sebebi memelilerde bulunan Na_V kanallarının kristal yapısının henüz bilinmemesidir. Bu çalışma kapsamında memelilerde farklı izoformları bulunan Na_V kanallarından $Na_V1.4$ kanalı için tutarlı bir model öne sürülmesi amaçlanmıştır.

Çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada tez önerisinde sunmuş olduğum bakteriyel Na_VMs kanalı (PDB kodu: 4CBC) [Bagneris ve ark., 2014] baz alınarak bir model geliştirilmiştir. Ancak yakın bir zamanda yayınlanan bir çalışmada amerikan hamam böceğinden elde edilen Na_VPaS (PDB kodu: 5X0M) [Shen ve ark., 2017] sodyum kanalı, $Na_V1.4$ kanalı ile yüksek bir oranda benzerlik taşıdığı için modelin geliştirilmesinde baz alınan yapı değiştirilmiştir. İkinci aşamada Na_VPaS kanalı baz alınarak geliştirilen model açıklanacaktır.

3.1 Na_VMs Baz Alınarak Geliştirilen $Na_V1.4$ Modeli

Bu çalışmada $Na_V1.4$ kanalının elde edilmesinde şablon olarak Na_VMs kanalı baz alınmıştır. Literatürde protein yapılarını tahmin etmek için kullanılan ITASSER [Zhang, 2008] yazılımı, kanalın tüm sekansı verildiğinde, birinci bölümde anlatılan kanal formu bozulduğu için bu çalışmada Modeller yazılımı kullanılmıştır. Modeller yazılımı bir şablonun kristal yapısını kullanarak, şablon ve modelin sekansları arasındaki farkları mutasyona uğratma prensibiyle çalışır. Sekans, kristal yapıyı

Çizelge 2.1 : Bakteriyel NavMs kanalı ile Memeli Nav1 kanalları arasındaki hizalama işlemi.

| | P1 Heliks | SF | P2 Heliks |
|------------------|-----------|-------|-------------|
| Bölge I | | | |
| NavMs | SLYTLFQVM | TLESW | SMGIVRPVMN |
| Nav1.1 | AFLSLFRLM | TQDFW | EN-LYQLTLR |
| Nav1.2 | AFLSLFRLM | TQDFW | EN-LYQLTLR |
| Nav1.3 | AFLSLFRLM | TQDYW | EN-LYQLTLR |
| Nav1.4 | AFLALFRLM | TQDYW | EN-LFQLTLR |
| Nav1.5 | AFLALFRLM | TQDCW | ER-LYQQTLR |
| Nav1.6 | AFLALFRLM | TQDYW | EN-LYQLTLR |
| Nav1.7 | AFLALFRLM | TQDYW | EN-LYQQTLR |
| Nav1.8 | AFLSLFRLM | TQDSW | ER-LYQQTLR |
| Nav1.9 | SFLAMFRLM | TQDSW | EK-LYQQTLR |
| Bölge II | | | |
| NavMs | SLYTLFQVM | TLESW | SMGIVRPVMN |
| Nav1.1 | SFLIVFRVL | CGE-W | IETMWDCMEV |
| Nav1.2 | SFLIVFRVL | CGE-W | IETMWDCMEV |
| Nav1.3 | SFLIVFRVL | CGE-W | IETMWDCMEV |
| Nav1.4 | SFLIVFRIL | CGE-W | IETMWDCMEV |
| Nav1.5 | AFLIIFRIL | CGE-W | IETMWDCMEV |
| Nav1.6 | SFLIVFRVL | CGE-W | IETMWDCMEV |
| Nav1.7 | SFLIVFRVL | CGE-W | IETMWDCMEV |
| Nav1.8 | SFLIVFRIL | CGE-W | IENMWACMEV |
| Nav1.9 | SFLVFRIL | CGE-W | IENMWECMQE |
| Bölge III | | | |
| NavMs | SLYTLFQVM | TLESW | SMGIVRPVMN |
| Nav1.1 | GYLSLLQVA | TFKGW | MD-IMYAAVD |
| Nav1.2 | GYLSLLQVA | TFKGW | MD-IMYAAVD |
| Nav1.3 | GYLALLQVA | TFKGW | MD-IMYAAVD |
| Nav1.4 | GYLSLLQVA | TFKGW | MD-IMYAAVD |
| Nav1.5 | GYLALLQVA | TFKGW | MD-IMYAAVD |
| Nav1.6 | GYLALLQVA | TFKGW | MD-IMYAAVD |
| Nav1.7 | GYLSLLQVA | TFKGW | TI-IMYAAVD |
| Nav1.8 | GYLALLQVA | TFKGW | MD-IMYAAVD |
| Nav1.9 | AYLALLQVA | TFKGW | MD-IYYAAVD |
| Bölge IV | | | |
| NavMs | SLYTLFQVM | TLESW | SMGIVRPVMN |
| Nav1.1 | SMICLFQIT | TSAGW | D-GLLAPILN |
| Nav1.2 | SMICLFQIT | TSAGW | D-GLLAPILN |
| Nav1.3 | SMICLFQIT | TSAGW | D-GLLAPILN |
| Nav1.4 | SIICLFEIT | TSAGW | D-GLLNPILN |
| Nav1.5 | SMLCLFQIT | TSAGW | D-GLLSPILN |
| Nav1.6 | SMICLFQIT | TSAGW | D-GLLLPIILN |
| Nav1.7 | SMICLFQIT | TSAGW | D-GLLAPILN |
| Nav1.8 | SMLCLFQIT | TSAGW | D-GLLSPILN |
| Nav1.9 | SMLCLFQIS | TSAGW | D-SLLSPMLR |

oluşturan aminoasitlerin türlerini ve sıralamalarını verir. Bu nedenle homoloji modelinde yapılacak ilk iş, model ve şablon arasındaki sekans farklarını tespit etmektir. Bu işlem hizalama olarak adlandırılır. Çizelge 3.1’de görülen Nav1

kanallarının NavMs kanalı ile yapılan hizalama işleminin seçici filtre ve onun etrafındaki bölgesi için verilmiştir. Burada ClustalW [Larkin ve ark., 2007] yazılımı kullanılmıştır. Çizelge 3.1' de görüldüğü gibi Nav1 kanallarının sekansları arasında çok az fark vardır. Tutarlı bir homoloji modeli elde edilirse bu sistemler birbirlerine az sayıda mutasyonlarla dönüştürülebilirler. Bu nedenle çalışma tutarlı bir Nav1.4 homoloji modeli elde edilmesinin ardından diğer kanallar için de birer model geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu noktadan sonra elde edilen homoloji modelinde uygulanan prosedürün ayrıntıları anlatılacaktır. İyon kanallarında geçirgenliği denetleyen en önemli bölge seçici filtre bölgesidir. Nav1.4 kanalında seçici filtre bölgesinde bölgeler arası dört tane kararlı bağ olduğu gösterilmiştir [Mahdavi ve ark., 2014]. NavMs baz alınarak yapılan çalışmada literatürde yapılan homoloji modellerinden farklı olarak , şablonda bulunan bölgeler arasındaki bağ bilgisi homoloji modelinde de kullanılmıştır. NavMs kanalında olduğu gibi Nav1.4 kanalı da dört tane bölge adı verilen bölgeden oluşmuştur. Bu bölgeler kendi içlerinde bağ kurabildiği gibi birbirleri arasında da bağ kurabilmektedir. Bu bilgiler ışığında NavMs kanalında bölgelerde bulunan bütün bağlar çıkartılmıştır. Bağları oluşturan 400'ü aşkın rezidü çiftleri arasından Nav1.4 kanalında da korunanlar tespit edilmiştir. Tespit edilen bu rezidüer arasındaki bağ uzunlukları Modeller yazılımı yardımıyla kurulan homoloji modelinde kısıtlama olarak girilmiştir. Yani korunan rezidülerdeki bağ uzunlukları homoloji modelinde de aynı kalacak şekilde bir kısıtlama uygulanmıştır. Burada amaçlanan şablonda var olan bağ bilgisini homoloji modelinde de var olacak şekilde modeli oluşturmaktır. Daha önceden tespit edilen dört kararlı bağa ek olarak filtre bölgesinde fazladan dört tane daha kararlı bağ tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra modelin, baz alınan NavMs kristal yapısından atomistik koordinatlar açısından ne kadar farklı olduğunu görmek için RMS farkı hesabı yapılmıştır. RMS farkı hesabında kullanılan ifade,

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i} \quad (3.1)$$

şeklinde verilir. RMS farkı, N tane eşdeğer atom çifti üzerinden ve d_i , i numaralı atom çiftinin arasındaki uzaklık olmak üzere hesaplanır. Geliştirilen Nav1.4 modeli

ile baz alınan NavMs yapısı arasındaki RMS farkı hesabı, omurga atomları üzerinden yapılmıştır. Nav1.4 modeli için hesaplanan RMS farkı değeri, 1.12 Å'dur. Hesaplanan bu RMS farkı değerinin kristal yapı tayinininde verilen çözünürlükten düşük olması önemlidir. Zar proteinlerinde modelin kabul edilebilirliği için RMSD değeri 2Å' un altında olmalıdır. [Forrest ve ark., 2006]

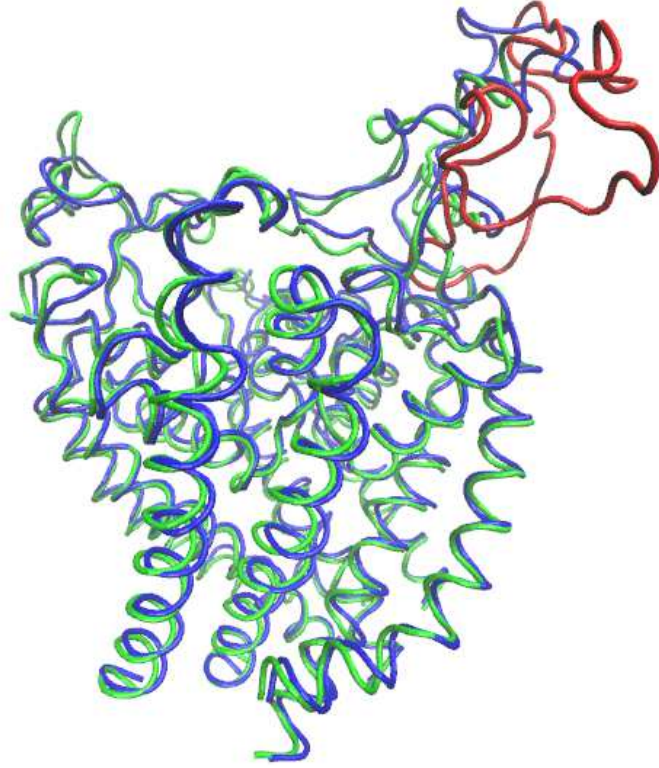
3.2 Nav_vPaS Baz Alınarak Geliştirilen Nav_v1 Modelleri

NavMs bazlı Nav1.4 kanalının modellenmesi çalışmamızın hemen akabinde sodyum kanalları için yeni bir kristal yapı elde edilmiş (NavPas) ve bu yapı Science dergisinde yayınlanmıştır [Shen ve ark, 2017]. Bu yapı Amerikan hamam böceklerinden elde edilmiş bir kristal yapıdır ve memeli sodyum kanallarına olan benzerliği çok daha fazladır. EK 2'de Nav1.3-Nav1.4 ve NavPas hizalama işlemi gösterilmektedir. Nav1.3, Nav1.4 kanalları ve NavPas yapısı arasındaki benzerlik proteinin tamamı için %75'ten daha fazladır. Toksin bağlanmasının etkin olduğu (S5-S6 helisleri) bölgelerinde benzerlik %90'dan fazladır ve seçici filtre bölgesinde sadece bölge 1'de bir rezidü (L→Q) farklıdır. EK 2'de Nav1.5 ve NavPas kanalları arasında hizalama işlemi verilmiştir. Nav1.3 - Nav1.4 yapısından farklı olarak Nav1.5 ve Nav1.8 yapılarının 1. bölgesinde bulunan (Y→C, ve Y→S) tirozin, sistein ve serin rezidüleri ile yer değiştirmektedir. Filtre bölgesinde bulunan bu farklılıklar TTX bağlanmasında etkili olmaktadır. Filtrede bulunan 2 farklılık dışında tüm memeli sodyum kanalları filtresinde bulunan DEKA yapısı, NavPas yapısında da korunmaktadır. Filtre dışında Nav1.3 ve Nav1.4 yapısında hücre zarının dışındaki bölgede bulunan uzun bir zincir (hücre dışı turret bölgesi) mevcuttur. Bu bölgenin modellenmesi bir önceki çalışmada yani NavMs baz alınarak yapılan çalışmada hücre zarının dışındaki bölgenin bulunmaması nedeniyle yapılamamıştır. NavPas yapısında hücre zarının dışındaki bu bölge yeterli uzunlukta olmamakla birlikte mevcuttur (EK1 – Bölge 1). Nav1.5 yapısında hücre dışı turret bölgesi daha kısadır.

Memeli sodyum kanalları ve NavPas yapısı arasındaki farklılık oldukça azdır. Dolayısıyla yeni çıkan NavPas yapısı kullanılarak Nav1.3, Nav1.4 ve Nav1.5 yapılarının homoloji modelleri Modeller programı [Sali ve ark, 1993] kullanılarak oluşturuldu. Elde ettiğimiz yeni Nav1.4 yapısı NavMs yapısı üzerine kurulu modelden 2 bölgede farklılık göstermektedir. Birincisi bölge 1 filtrede bulunan TYR

rezidüsünün yönelişi ve diğer farklılık hücre zarının dışındaki bölgenin dahil edilmesidir.

NavMs yapısı baz alınarak oluşturulan modelden farklı olarak bu modelde hücre dışında bulunan “extracellular turret” bölgesinin modellenmesi de mümkün olmuştur. Nav1.4 yapısı turret bölgesinde NavPaS yapısından daha uzun olduğundan bu bölgeyi modellemek için ITASSER [Zhang, 2008] kullanılmış ve bu kısım



Şekil 3.1 : NavPaS ve Nav1.4 kanallarının üstüste oturtulmuş görünümü.

Modeller programında elde edilen Nav1.4 yapısı ile birleştirilmiştir. Şekil 3.1’ de ITASSER yardımıyla geliştirilen bu bölge kırmızı ile, NavPaS kanalı mavi renkle ve Nav1.4 yapısı da yeşil renk ile gösterilmiştir. Nav1.3 ve Nav1.5 yapısında bölge 1 hücre dışında kalan bu kırmızı bölge daha kısadır (EK 2 ve EK 3) ve bu nedenle burada modellenen Şekil 3.1’ de kırmızı ile temsil edilen bölge Nav1.4 kanalına özgüdür. Bu aşamadan sonra NavMs kanalı baz alınarak geliştirilen modelde olduğu

gibi ilk olarak RMS farkı analizi yapılmıştır. Ancak bu modelde hücre dışı bölgelerde mevcut olduğundan her bölge için ayrı ayrı hesaplanacak şekilde daha detaylı bir analiz yapılmıştır. Çizelge 3.2' de yapılan detaylı RMS farkı analizi gösterilmektedir. Nav1.4 modelinin RMS farkı değerinin beklenenden fazla çıkmasının sebebi bölge 1 hücre dışı bölgenin NavPaS ve Nav1.5 kanallarına göre daha uzun olmasıdır.

Burada yapının tamamının ITASSER yardımıyla modellenememesinin nedeni tüm sekans ITASSER yazılımına gönderildiğinde Şekil 3.1' de görülen dört bölgeden oluşan kanal formunun bozulmasıdır. Bu nedenle homoloji modelinin geliştirilmesi aşamasında baz alınacak iyi bir şablon yapıya ihtiyaç duyulmuştur. EK 2 ve EK 3' te görülen hizalama işlemine bakıldığında kanallar NavPaS ve Nav kanalları arasında çok yüksek bir benzerlik oranı saptanmıştır. Bu benzerlik NavPaS yapısının, Nav kanallarının homoloji modellerinin geliştirilmesinde iyi bir şablon olduğunu göstermektedir.

EK 2 ve EK 3' te görülen hizalama işlemi dikkatli bir şekilde incelenirse, seçici filtrenin dört bölgesinde toplam 19 adet kalıntıdan sadece 1 tanesi mutasyona uğramıştır. Bu mutasyon birinci bölgede bulunan lösin (LEU) kalıntısının, glutamin (Q) kalıntısına dönüşmesidir. Bu noktada seçici filtrenin neredeyse özdeş olması geliştirilmiş homoloji modelinde filtre yapısının güvenilirliğini artırmaktadır. Ayrıca dış halka olarak isimlendirilen ve P2 bölgelerinde bulunan negatif yüklü GLU, GLU, ASP, ASP kalıntılarında yine sadece 1 tanesi mutasyona uğramıştır. Bu mutasyon da üçüncü bölge P2 ilmeğinde glutamin (GLU) kalıntısının, aspartat (ASP) kalıntısına dönüşmesidir. Özellikle toksin bağlanmasında önem taşıyan bu dış halkanın ve seçici filtrenin yüksek bir oranda benzerlik taşıması bu çalışma kapsamında geliştirilmiş olan homoloji modellerine, tetrodotoksin bağlanması çalışmasının yolunu açmıştır. Tetrodotoksin bağlanmasının deneysel sonuçları Bölüm 1' de verilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen homoloji modellerinin doğruluğunun testinde tetrodotoksin bağlanması incelenerek, yapıların güvenilirliği araştırılmıştır.

Hizalama işlemindeki bu ayrıntılar büyük önem taşımaktadır. Çizelge 3.2' de görülen RMS farkı analizleri hizalama işlemine doğrudan bağlıdır. EK 2 ve EK 3' te görülen hizalama işleminde en önemli husus birinci bölgedeki uzun parçadır.

Çizelge 3.2 : NavPaS baz alınarak geliştirilen Nav1.4 ve Nav1.5 modelleri için Å cinsinden RMS farkı değerleri.

| | | Nav1.4 | Nav1.5 | | Nav1.4 | Nav1.5 |
|----------|------------|--------|--------|------|--------|--------|
| | Bölge | | | | | |
| Domain 1 | S5 Helis | 0.3 | 0.26 | 2.32 | 0.57 | |
| | Hücre Dışı | 3.36 | 0.82 | | | |
| | P1-SF-P2 | 0.23 | 0.18 | | | |
| | S6 Helis | 0.28 | 0.21 | | | |
| Domain 2 | S5 Helis | 0.24 | 0.44 | 0.54 | 0.47 | |
| | Hücre Dışı | 1 | 0.78 | | | |
| | P1-SF-P2 | 0.24 | 0.3 | | | |
| | S6 Helis | 0.37 | 0.31 | | | |
| Domain 3 | S5 Helis | 0.3 | 0.33 | 1.21 | 0.66 | |
| | Hücre Dışı | 2.03 | 1.07 | | | |
| | P1-SF-P2 | 0.27 | 0.27 | | | |
| | S6 Helis | 0.28 | 0.25 | | | |
| Domain 4 | S5 Helis | 0.23 | 0.23 | 1.04 | 0.31 | |
| | Hücre Dışı | 0.36 | 0.33 | | | |
| | P1-SF-P2 | 0.5 | 0.43 | | | |
| | S6 Helis | 0.2 | 0.21 | | | |
| Tüm Yapı | | | | 2.19 | 0.64 | |

Yukarıda anlatıldığı gibi bu bölgenin uzun olan kısmı ITASSER kullanılarak geliştirilmiştir. NavPaS ve Nav1.5'e göre farklılık gösteren bu bölgede RMS farkı değerinin yüksek çıkması beklenen bir sonuçtur.

Nav1.4 sekansı, daha dikkatli bir şekilde incelendiğinde NavPas ve Nav1.4 kanalı arasında korunan sistein rezidülerinin varlığı görülür. Bu sistein rezidüleri NavPaS kanalında disülfid köprüleri ile güçlü bağlar oluşturmaktadırlar. O halde bu bilginin modelde de görülmesi gerekir. Çizelge 3.3' te, NavPaS ve Nav1.4 kanallarında sistein rezidülerinin arasında oluşan disülfid bağlarının uzaklıklarını ve hangi bölge üzerinde bulduklarını göstermektedir. NavPaS kanalında bulunan bağların Nav1.4 modelinde de var olduğu görülmüştür.

Nav1.3 ve Nav1.4 kanalları seçici filtre yapısı olarak tamamen özdeşdir (EK 2). Bu nedenle uygun Nav1.4 kanalının modellenmesinin ve geçerlilik testlerinin akabinde Nav1.3 modeli geliştirilmiştir. Geliştirilen modeller üzerine yapılan moleküler

dinamik simülasyonları Bölüm 4' te verilmiştir. Nav1.3 kanalının modellenmesinde de yukarıda anlatılan prosedür tekrarlanmıştır. Nav1.3 kanalı,

Çizelge 3.3 : NavPaS ve Nav1.4 kanallarında bulunan Sistein rezidülerinin oluşturduğu bağlar.

| NavPaS Sistein Rezidüleri Arasındaki Bağlar | | | |
|---|----------|----------|--------|
| Uzaklık(Å) | Rezidü 1 | Rezidü 2 | Domain |
| 2.24 | CYS288 | CYS337 | D1 |
| 1.72 | CYS328 | CYS343 | D1 |
| 2.02 | CYS709 | CYS717 | D2 |
| 2.02 | CYS1011 | CYS1030 | D3 |
| 1.83 | CYS1368 | CYS1381 | D4 |
| Nav1.4 Sistein Rezidüleri Arasındaki Bağlar | | | |
| Uzaklık(Å) | Rezidü 1 | Rezidü 2 | Domain |
| 1.99 | CYS39 | CYS128 | D1 |
| 2.11 | CYS119 | CYS134 | D1 |
| 2.03 | CYS286 | CYS295 | D2 |
| 2.05 | CYS365 | CYS385 | D3 |
| 2.02 | CYS553 | CYS568 | D4 |

Nav1.4 kanalından bölge 1 hücre dışı bölgede daha kısadır. Bu nedenle Nav1.3 kanalında bu bölgenin ayrıca modellenmesi gereği duyulmamıştır.



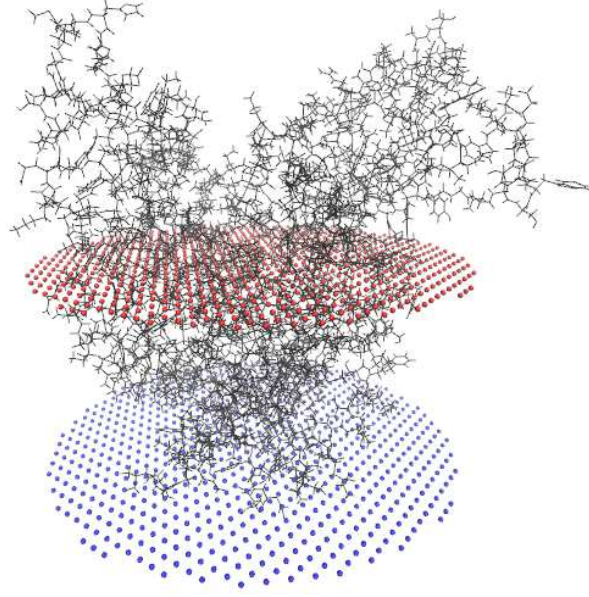
4. GELİŞTİRİLEN MODELLERİN GEÇERLİLİKLERİNİN TESTİ

Bu bölümde geliştirilen Nav1.3, Nav1.4 ve Nav1.5 homoloji modellerinin tutarlılığı incelenecektir. İzlenecek yol haritasında, öncelik bu kanalların moleküler dinamik simülasyonları ile denge durumuna getirilmesi olacaktır. Kanalların denge durumuna getirildiğini anlamak için RMSD hesabı yapılmıştır. Zamana karşı incelenecek RMSD grafiklerinin bir plato bölgesine ulaşması ve simülasyon sisteminin yoğunluğunun suyun yoğunluğuna yakınsaması, sistemin denge durumuna geldiğini anlamak açısından önemlidir. Daha sonra Bölüm 1' de açıklandığı gibi bu kanallara seçici olarak bağlanan TTX molekülü kullanılacaktır. TTX molekülü için kenetlenme (docking) prosedürü uygulanarak bir Nav1-TTX kompleksi elde edilip daha sonra bu bağlanma bilgileri moleküler dinamik simülasyonları ve serbest enerji hesapları ile test edilecektir.

Bir protein için kristal yapı modellendikten sonra yapının doğruluğunun test edilmesi gerekir. Bu test aşamasında genellikle izlenen yollardan biri moleküler kenetlenme prosedürüdür. Bu prosedürde ligandların proteinlerle etkileşimi sonucunda bağlanma serbest enerjileri elde edilmeye çalışılır. Burada yapılan işlem ligandı proteine göre farklı bağlanma konformasyonları elde edecek şekilde döndürerek belirli aralıklarla bağlanma enerjisi hesaplamaktır. Ancak bu prosedürde proteinler ya sabit tutulur ya da az bir miktarda hareket edecek şekilde sınırlandırılır. Bu noktada proteinin hareketi sonucunda değişecek olan bağlanma bilgisi kaybedilmiş olur. Bu aşamayı bir adım ileri götürmek için yapılması gereken sistemi dinamik bir şekilde inceleyecek olan simülasyon tekniklerinin kullanılmasıdır.

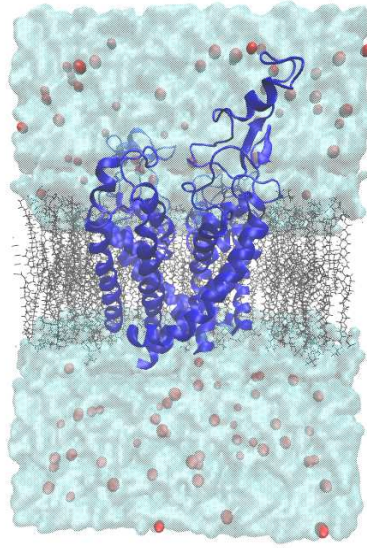
4.1 Simülasyon Sisteminin Kurulması

Zar proteinleri, hücre zarı boyunca uzanarak hücre içine ve dışına iyon taşınımı görevini üstlenirler. Bu nedenle kurulacak olan simülasyon sisteminin gerçekçi olması için proteinlerin lipid çift katman içine gömülü olarak tasarlanması gerekir.



Şekil 4.1 : Nav1.4 yapısının zar yüzeylerine göre duruşu.

Bu çalışmada proteinlerin zar içinde yönelimlerini tespit etmek için OPM veritabanı [Lomize ve ark., 2006] kullanılmıştır. Şekil 4.1’de Nav1.4 modelinin zar yüzeylerine göre yönelimi gösterilmektedir. Elde edilen modellerin zar içindeki duruşları tespit edildikten sonra VMD [Humphrey ve ark., 1996] yazılımı ile zar boyunca uzanacak



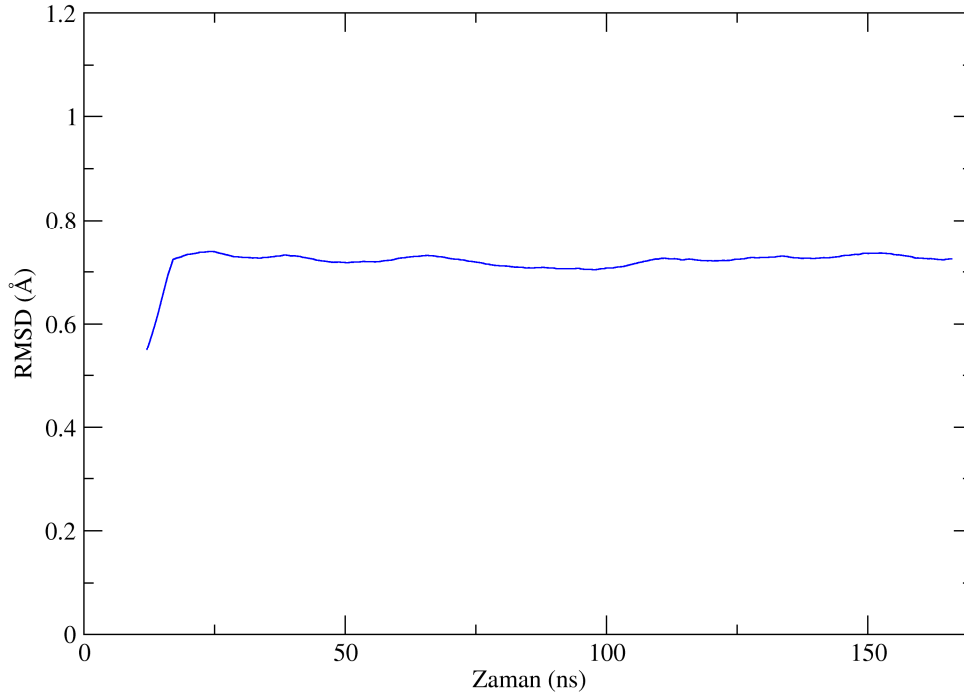
Şekil 4.2 : Örnek simülasyon sistemi.

şekilde yerleştirilebilir. Zar ve protein birleştirildikten sonra sistemin yoğunluğu dikkate alınarak su molekülleri eklenir. Son olarak iyonlar sisteme rastgele

eklenebilir veya VMD yazılımı Poisson-Boltzmann denklemini çözerek potansiyel enerjinin minimum olduğu yerlere ekleyebilir. Şekil 4.2’ de NavPaS adlı kanalın örnek simülasyon sisteminin görünümü verilmiştir.

4.2 NavMs kanalı baz alınarak geliştirilen Nav1.4 modelinin Moleküler Dinamik Simülasyonu

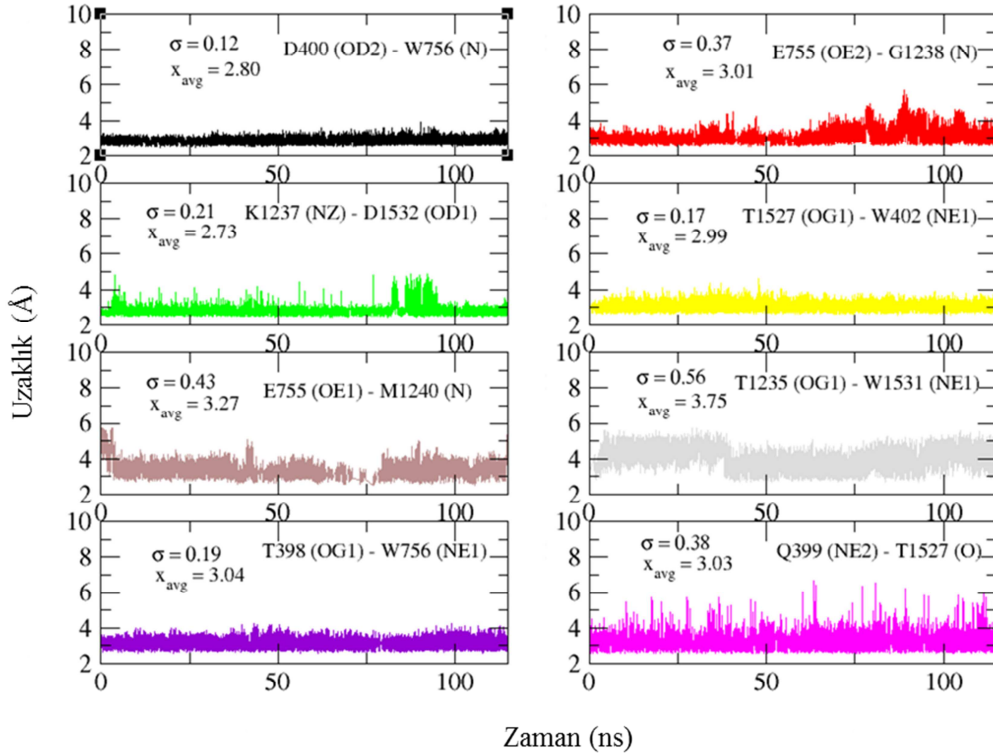
NavMs baz alınarak geliştirilen Nav1.4 modeli için, gerçekleştirilen 174 ns MD simülasyon sonucunda dengeye getirilmiştir. Şekil 4.3’ te RMSD hesabı verilmiştir. Geliştirilen model 50x50 Å büyüklüğünde membran içine gömülmüş, daha sonra su ve iyon eklenmiştir. Sistem yaklaşık olarak 60000 atom içermektedir. Her bir MD adımı 2 fs seçilmiştir. Bu çalışma için 16 çekirdekli bir bilgisayarda ns başına ortalama süre 5 saattir. Sadece 200 ns ‘lik bir MD çalışması bir aydan daha fazla zaman almaktadır. MD başlangıcında ana zincir atomlarına ve filtredeki bağ yapan D400, E755, K1237, T1527, G1238, W402, D1532, T1235, W1531, T398, W756,



Şekil 4.3: NavMs kanalı için RMSD hesabı.

Q399, M1240 rezidülerinin tüm atomlarına 10 kcal/mol kısıtlama uygulanmıştır.

Ana zincir atomlarında bulunan kısıtlama ilk 10 ns süresince her 1 ns’de 1 kcal/mol azaltılarak 11.ns başlangıcında sıfırlanmıştır. Bağ yapan rezidülerde bulunan atomlardaki kısıtlamalar da ilk 9 ns süresince her 1 ns’de 1 kcal/mol azaltılmış olup 10.ns ‘de 1kcal/mol, 11.ns’de 0.5 kcal/mol kısıtlama bırakılmıştır. 12.ns’den itibaren



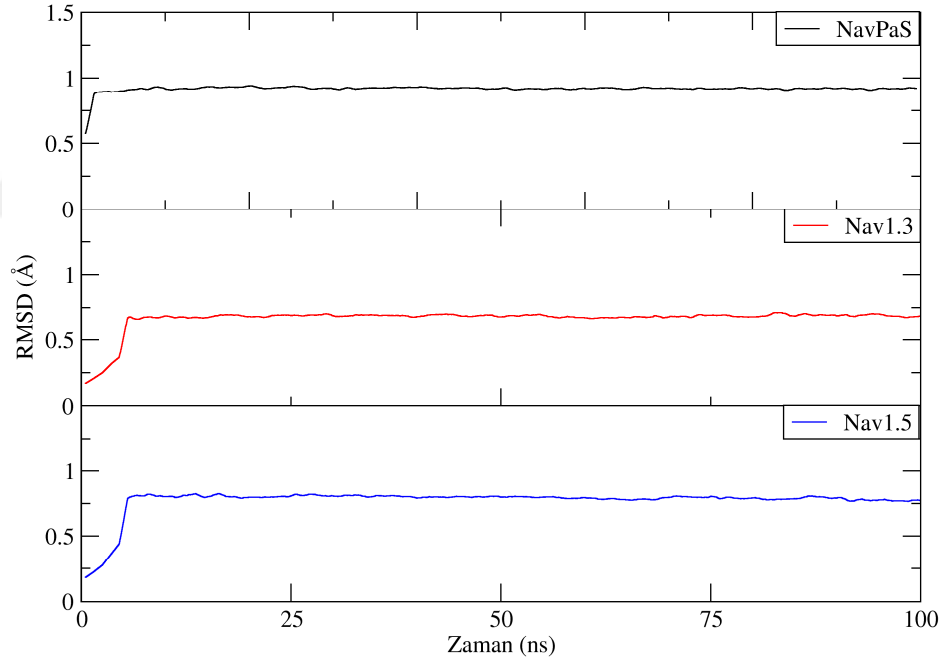
Şekil 4.4 : NavMs kanalında seçici filtreyi oluşturan bağlar.

bağ yapan rezidülerde bulunan atomlardaki kısıtlamalar da kaldırılmıştır ve bu noktadan itibaren sistemde hiçbir kısıtlama uygulanmamıştır. Şekil 4.4’ te ilgili rezidülerdeki N-O atomlarının bağ uzunluklarının 115 ns boyunca zamanla değişimi görülmektedir. Burada “ σ ” standart sapma ve “ x_{avg} ” ortalama bağ uzunluğunu göstermektedir. Bağ yapan D400(OD2), E755(OE2), K1237(NZ) ve T1527(OG1) rezidüleri seçici filtreyi oluşturan bağlardır [Mahdavi ve ark., 2015]. Bunlara ek olarak kısıtlama verilerek başlanan prosedür uygulandığında E755(OE1)-M1240(N), T1235(OG1)-W1531(NE1), T398(OG1)-W756(NE1) ve Q399(NE2)-T1527(O) bağlarının da kararlı bir davranış sergilediği gözlenmiştir. Geliştirilen bu modelin MD simülasyonları ve test işlemleri sırasında NavPaS yapısının ortaya

çıkması ile baz alınacak yapı değiştirilmiştir. NavPaS yapısının Nav1 kanalları ile benzerliği, NavMs yapısına göre çok daha fazladır. Ayrıca NavMs yapısının sekansının kısa olması sonucunda modellenemeyen hücre dışı bölgeler NavPaS yapısı baz alınarak modellenenmiştir. Bu aşamadan sonra NavPaS yapısı baz alınarak geliştirilen modellerin ayrıntılarından bahsedilecektir.

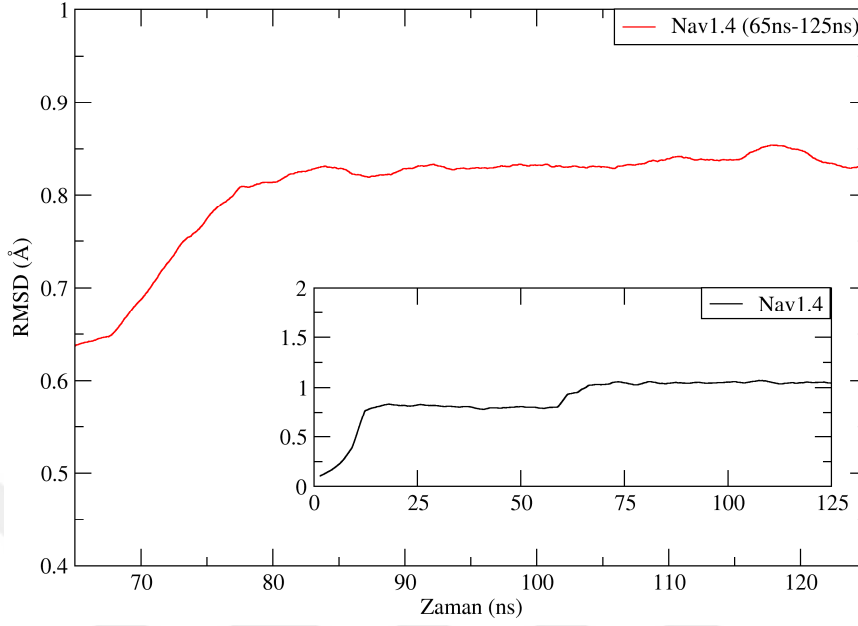
4.3 NavPaS kanalı baz alınarak geliştirilen Nav1.3, Nav1.4 ve Nav1.5 Yapılarının Moleküler Dinamik Simülasyonu

NavPas kristal yapısı baz alınarak geliştirilen Nav1.3, Nav1.4 ve Nav1.5 yapılarının homoloji modelleri 100x100 Å büyüklüğünde membran içine gömülmüş, daha sonra su ve iyon eklenmiştir. Hücre dışı bölgesinin dahil edilmesi sistemi hem x-y



Şekil 4.5 : NavPaS, Nav1.3 ve Nav1.5 modellerinin RMSD hesabı.

yönünde hem de z yönünde büyütülmüştür. Bu sistem NavMs bazlı modelde yaklaşık 60000 atomdan oluşurken, NavPaS baz alınarak geliştirilen modeller için simülasyon sistemleri yaklaşık 120000 atomdan oluşmaktadır. 150 mM iyon konsantrasyonu olan sulu çözeltide membrana gömülü sistemler için MD simülasyonları yapılmıştır. MD simülasyonlarına ait RMSD grafikleri Şekil 4.5' te verilmiştir. RMSD

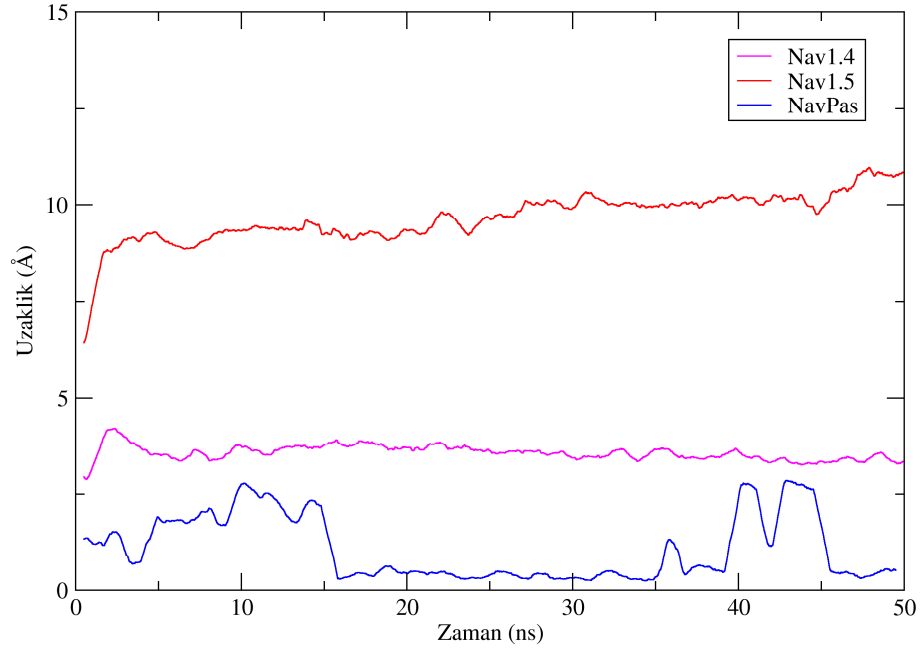


Şekil 4.6 : Nav1.4 modelinin RMSD hesabı.

grafiklerinden her üç sistemde dengeye geldiği görülmüştür. Nav1.4 modeli için RMSD grafiğide Şekil 4.6' da verilmiştir. Bu grafikte iki geçiş noktası gözükmetedir. Bütün modellerde dengeye getirme işlemi yapılırken başlangıçta proteinin tamamına bir kısıtlama konulup yavaş yavaş bu kısıtlama kaldırılmıştır. Ancak Nav1.4 modelinde hücre dışı bölge uzun olduğu için önce de hücre dışındaki bölgedeki kısıtlamalar kaldırılmış, 65. ns'den itibaren hücre zarında bulunan kısım yavaş yavaş serbest bırakılarak sistem dengeye getirilmiştir.

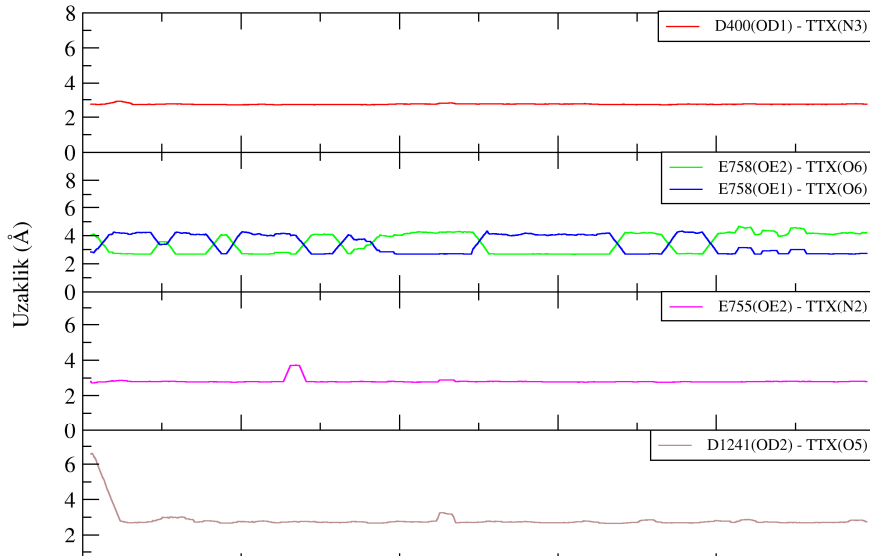
4.4 NavPaS, Nav1.4 ve Nav1.5 Yapılarına TTX Bağlanması

Oluşturduğumuz Nav1.4 ve Nav1.5 yapılarının test edilmesi için her iki yapıya da TTX bağlanması incelenmiştir. Birinci bölümde voltaj kapılı sodyum kanallarına ait TTX bağlanma duyarlılıkları verilmiştir. TTX molekülü Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 ve Nav1.7 yapılarına nanomolar boyutunda bağlanma sabiti ile bağlanırken Nav1.5 ve Nav1.8 yapılarına bin kat daha küçük mikro molar bağlanma sabiti ile bağlanmaktadır. O nedenle oluşturulan modellerin test edilmesi için Nav1.4 ve Nav1.5 yapılarına TTX bağlanması incelenmiştir. Model yapılarına TTX bağlanması için öncelikle Autodock programı [Morris ve ark. , 2009] kullanılarak docking yapılmıştır. Dengeye getirilmiş yapıların 75-100 ns arasındaki her 5 ns de bir



Şekil 4.7 : Nav1.4 modeline TTX bağlanmasında etkili olan atomların birbirlerine olan uzaklıklarının zamana bağlı değişimi.

(snapshot) fotoğraf karesi alınıp bu kareye docking yapılmıştır. Her bir docking için 200 konformasyon alınmıştır. Nav1.4-TTX yapısında en çok kümelenme oluşturan en düşük bağlanma skoruna sahip yapılar seçilmiş (EK 4) ve Nav1.4 yapısında

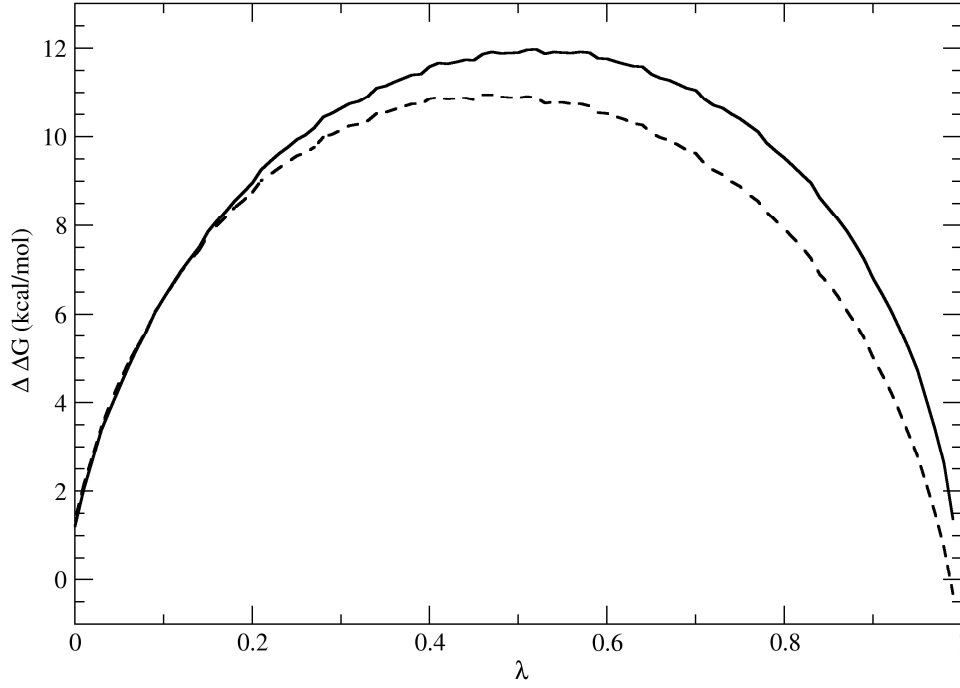


Şekil 4.8 : NavPaS, Nav1.4 ve Nav1.5 yapılarına TTX bağlanmasında, TTX molekülünün bağlanma bölgesine olan uzaklığı.

deneylerde gözlenen bağların olup olmadığı moleküler dinamik simülasyonları ile kontrol edilmiştir. Son 50 ns için Nav1.4-TTX kompleks yapısında bağ yapan atomlara ait bağlanma mesafelerinin zaman serisi Şekil 4.8' de gösterilmiştir. Deneyde etkili olduğu ileri sürülen 6 rezidüden üçü korunmaktadır. (Çizelge 3.3). Ayrıca deneyde incelenmemiş D1241 rezidüsünün katkı sağladığı görülmektedir (Şekil 4.8). Aynı çalışma Navpas-TTX ve Nav1.5-TTX sistemleri için tekrarlanmıştır. Docking çalışmalarında ve MD simülasyonlarında NavPas yapısının TTX ile bağlandığı gözlemlenmiştir. Navpas yapısında D (bölge 1 filtre bölgesi) ve E (bölge 2 filtre bölgesi) rezidülerinin bağlanmaya katkı sundukları gözlenmiştir. Ayrıca NavPas yapısına ait seçici filtre (DEKA) merkezi ve TTX molekülünde guanidium grubu merkezi arasındaki mesafe Şekil 4.7'de mavi eğri ile verilmiştir. Bu grafik TTX molekülünün Navpas yapısına bağlandığını göstermektedir. Nav1.5-TTX sistemi için docking çalışmasının akabinde yapılan MD çalışmasında herhangi bir bağlanma gözlenmemiştir. Şekil 4.7'de Nav1.5 yapısına ait seçici filtre (DEKA) merkezi ve TTX molekülünde guanidium grubu merkezi arasındaki mesafe kırmızı eğri ile verilmiştir. Bu grafik TTX molekülünün Nav1.5 yapısından uzaklaştığını göstermektedir. MD yaparken kompleks sistem dengeye getirilene kadar hem protein hem de liganda kısıtlama konulduğu ve kısıtlamanın yavaş yavaş kaldırılmıştır.

4.5 Nav1.4 Kanalı için Na⁺/K⁺ seçiciliğinin hesaplanması

Geliştirilen Nav1.4 modelinde filtre bölgesi için seçicilik hesabı yapılmıştır. Bu hesaplamayı yapmak için filtre bölgesinde bulunan bir sodyum (Na) iyonunu potasyuma ve kanalın dışına daha önceden eklenen bir potasyum iyonunu sodyuma çevirme işlemi yapılmıştır (ileri). Aynı zamanda hesaplamanın histerisis etkisinden bağımsız olduğunu göstermek için filtrede bulunun bir potasyum iyonu sodyum iyonuna dönüştürülürken su içinde bulunan bir sodyum iyonu potasyum iyonuna dönüşmüştür (geri). Hesaplama serbest enerji pertürbasyon metodu ile yapılmıştır, (0-1) arasında yüz lambda değeri kullanılmıştır. Şekil 4.9' da kümülatif serbest enerjinin lambda değerlerine göre değişimi ileri (sürekli çizgi) ve geri (kesikli çizgi) süreç için ayrı ayrı verilmiştir. Serbest enerji hesabı sonunda ileri serbest enerji değeri 1.4 kcal/mol elde edilirken geri serbest enerji değeri -0.4 kcal/mol elde edilmiştir. Hesaplamadaki histerisis etkisi (1 kcal/mol) kabul edilebilir sınırlar



Şekil 4.9 : Seçicilik serbest enerjisi hesaplaması.

içerisindedir. İleri ve geri süreçlerin ortalamasından elde edilen serbest enerji değeri 0.8 kcal/mol olup, deneysel verilerle hata sınırları içerisinde uyumludur.

4.6 NavPaS ve Nav1.4 Yapıları İçin PMF Hesabı

Sistemler dengeye getirildikten sonra PMF yapmak için Şemsiye Örnekleme (US) metodu kullanıldı. Şemsiye Örnekleme metodu önceden tanımlanmış reaksiyon koordinatları boyunca uygulanan bir simülasyon metodudur. Bu metot bir harmonik potansiyel enerji terimi içeren Hamiltonyen düzenlenerek uygulanır [Straatsma ve ark. 1986].

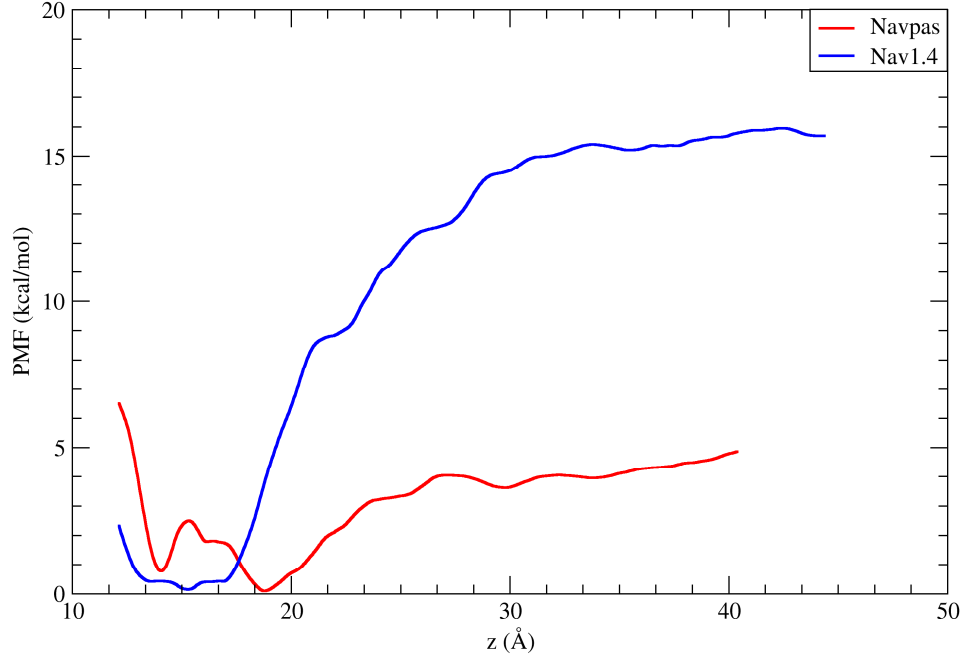
$$H'(\lambda) = H(\lambda) + \frac{1}{2}k_i(\lambda - \lambda_i)^2 \quad (4.1)$$

Burada $H(\lambda)$, potansiyel enerji fonksiyonu veya sistemin Hamiltonyenidir, λ reaksiyon koordinatının akım değeridir. λ_i ve k_i sırasıyla örnekleme i 'nin merkezi ve kuvvet sabitidir.

US yönteminin başarılı bir uygulaması için gerekli koşul, son derece uygun reaksiyon koordinatı ve ek potansiyel seçimine bağlı olarak yeterli örneklemeledir. İdeal bir eklenen potansiyel, reaksiyon koordinatı boyunca düzgün örneklemele sağlamalıdır. Bir serbest enerji profilinin şekli hakkında önceden bilgi varsa, serbest enerjinin negatifi ek potansiyel olarak kullanılabilir. Ne yazık ki, PMF profili çoğu durumda önceden bilinmemektedir ve ek potansiyellerinin diğer formları kullanılmalıdır. Dolayısıyla tipik olarak, reaksiyon koordinatı boyunca her pencerede bir harmonik ek potansiyeli uygulanır.

Bu metotta, reaksiyon koordinatları boyunca şemsiye potansiyelinin farklı yerleşimlerinde çok sayıda simülasyon çalıştırılır. Her simülasyonun örneklemelelerden uygulanan potansiyel enerji ile temsil edilen popülasyon değerleri ortaya çıkarılır. Elde edilen popülasyonu (yoğunluk fonksiyonu) Ağırlıklı Histogram Analiz Yöntemi (WHAM) [Kumar ve ark., 1992] kullanılarak reaksiyon koordinatı boyunca birleştirilir. Yapılan WHAM analizinde ilk olarak eklenen harmonik potansiyel çıkartılmak suretiyle yoğunluk dağılımı potansiyelden arındırılır (aynı zamanda etkilenmemiş (unbiasing) olarak adlandırılır). Etkilenmemiş yoğunluk dağılımlarının birleştirilmesinden elde edilecek toplam yoğunluk dağılımı serbest enerji profilinin üstel fonksiyonudur ve logaritma almak suretiyle serbest enerji profili elde edilir.

Protein-TTX kompleks yapısında z ekseni boyunca PMF yapılacak bölgedeki (10 Å ile 45 Å aralığında) TTX molekülü US yöntemi ile örneklendirilmiştir. Aralık her yarım Å'da bir pencere konulacak şekilde örneklendirilmiştir. Simülasyonlarda z yönünde konulan 15 kcal/mol/Å²'lik harmonik kısıtlamaya ek olarak TTX molekülünü eksen üzerinde tutabilmek için silindirik potansiyel uygulanmıştır. Silindirik potansiyel kuyudan ibaret olup, içinde potansiyel sıfır, dışında sabittir. Bu potansiyelin örneklenen tüm pencerelerde molekülü z ekseni üzerinde tuttuğu gözlenmiştir. PMF hesabı için her bir pencere için 8 ns simülasyon yapılmış, ilk 1 ns denge için kullanılmıştır. PMF hesabı WHAM metodu kullanarak son 7 ns'lik simülasyon için çıkartılmıştır. Elde edilen PMF değerlerinin yakınsaması için bir süre daha örneklemele gerek vardır. Son 7 ns simülasyondan çıkartılan PMF eğrileri Navpas-TTX ve Nav1.4-TTX için Şekil 4.10'da kırmızı ve mavi renklere verilmiştir. Nav1.4 yapısında bağlanma çukurunun ve serbest bölge arasındaki



Şekil 4.10 : Ortalama Kuvvet Potansiyeli Hesabı.

bariyer 16 kcal/mol iken Navpas yapısında bu bariyer 5 kcal/mol dür. Nav1.5 yapısında hiç bağlanma elde edilmemektedir. Nav1.4 PMF eğrisinden bağlanma çukurunun oldukça geniş olduğu görülmektedir. MD trajektörü verilerinin incelenmesinde TTX molekülünün bağlanma çukurunda dik pozisyondan yatık pozisyona geçtiği gözlenmektedir. Aynı durum Navpas molekülünde de geçerlidir. Nav1.4 yapısından geniş ve düz olan bağlanma çukuru Navpas yapısından küçük bir bariyerle ayrılmış 2 çukur şeklinde karşımıza çıkmaktadır. İlk çukurda TTX molekülü dik dururken 2. çukurda eğilmiş durumdadır. Şekil 4.10' da görülen PMF hesabı kullanılarak bağlanma sabiti bulunabilir. Bağlanma sabiti,

$$K_d^{-1} = 1000\pi R^2 N_A \int_{z_0}^{z_1} \exp \left[-\frac{w_1(z)}{kT} \right] dz \quad (4.2)$$

ile verilir [Gordon ve ark., 2013]. Burada R etkin kanal yarıçapı, W(z) serbest enerji (PMF), z_1 ve z_2 reaksiyon koordinatlarının bağlanma minimumu ve serbest bölge pozisyonlarıdır. Burada R için 5.0 Å alınmış ve integrasyon Şekil 4.10'da verilen PMF eğrisinde $z_1=13$, $z_2=30$ Å arasında alınmıştır. Nav1.4 yapısı için 62 nM bağlanma sabiti bulunmuştur. Literatürde TTX'in Nav1.4 kanallarına bağlanması

için nM boyutunda değer verilmiştir [Penzotti ve ark.,1998]. Navpas-TTX PMF profilinden elde edilen bağlanma sabiti 203 μM ' dır. Hesapladığımız bağlanma sabitleri literatürde yayınlanan deneysel değerler ile oldukça uyumludur.



5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Tez çalışmamın başlangıcında sunmuş olduğum tez önerisinde tutarlı bir Nav1.4 modelinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu öneriye uygun olarak tez çalışması sonunda geliştirilen Nav1.4 ve Nav1.5 modelleri TTX molekülüne bağlanması yoluyla test edilmiştir. Her iki protein yapısına ait TTX bağlanma değerleri deneysel olarak mevcuttur. Deneysel veriler Nav1.4 yapısının nanomolar büyüklüğünde bağlandığını öngörürken Nav1.5 yapısının bağlanma sabiti bin kat daha küçüktür. Modellerden elde ettiğimiz bağlanma sabitleri arasında da yaklaşık olarak bin katlık bir fark vardır.

Burada üzerinde durulması gereken ilk şey bu kanallar yaklaşık olarak 400 rezidüden oluşmakta olup kanalın tamamını tutarlı bir şekilde modellemek uzun ve zor bir iştir. Geliştirilen modeller TTX bağlanması yoluyla test edildiği için bu kanalların tutarlılığından bahsederken, kanalların aktif bölgeleri (seçici filtre bölgesi) ve bu bölgelerle doğrudan etkileşimi olan bölgeler (kavite bölgesi) düşünülmelidir. Bu çerçevede geliştirilen Nav1.4 ve Nav1.5 modellerinin güvenilir olduğu söylenebilir. Elde edilen modeller ışığında çalışmanın devamında diğer Nav kanalları da modellenebilir. Ayrıca geliştirilen modellere ikinci bir geçerlilik testi açısından μ -konotoksin bağlanması incelenebilir.



KAYNAKLAR

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389–3402
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T** (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.*,22,195-21.
- Bagn ris C, DeCaen PG, Naylor CE, et al.** Prokaryotic NavMs channel as a structural and functional model for eukaryotic sodium channel antagonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(23):8428-8433. doi:10.1073/pnas.1406855111.
- Baştuğ T, Kuyucak S.** Molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Biophysical Reviews.* 2012;4(3):271-282. doi:10.1007/s12551-012-0084-9.
- Beveridge, D.L. and DiCapua, F.M.** 1989. Free energy via molecular simulation: Applications to chemical and biomolecular systems. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 18 431–492.
- Bezanilla F.** 2005. Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans. Nanobiosci.* 4:34–48
- Catterall WA** (2001) A one-domain voltage-gated sodium channel in bacteria. *Science* 294: 2306–2308.
- Catterall WA** (2015) Voltage-Gated Sodium Channels and Electrical Excitability of the Heart. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside.* Sf. 1-11
- Ellinor, P.T., J. Yang, W.A. Sather, J.F. Zhang, and R.W. Tsien.** 1995. Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron.* 15:1121–1132
- Forrest LR, Tang CL, Honig B.** On the accuracy of homology modeling and sequence alignment methods applied to membrane proteins, *Biophys. J.*, 2006, cilt 91(sf. 508-517)
- Gordon, D.; Chen, R.; Chung, S.H.** Computational methods of studying the binding of toxins from venomous animals to biological ion channels: Theory and applications. *Physiol. Rev.* 2013, 93, 767–802
- Gumbart J, Roux B.** Determination of Membrane-Insertion Free Energies by Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal.* 2012;102(4):795-801. doi:10.1016/j.bpj.2012.01.021.

- Hagen N A, Fisher K M, Lapointe B, Souich P du, Chary S, Moulin D, Sellers E, Ngoc A H**, “An Open-Label, Multi-Dose Efficacy and Safety Study of Intramuscular Tetrodotoxin in Patients with Severe Cancer-Related Pain”, *Journal of Pain and Symptom Management*, 10.1016/j.jpainsymman.2006.11.008 (2006)
- Heinemann S H, Teriau H, Stuhmer W, Imoto K and Numa S** (1992) Calcium-channel characteristics conferred on the sodium-channel by single mutations *Nature* 356 441–3
- Heinzelmann G, Baştuğ T, Kuyucak S**. Free Energy Simulations of Ligand Binding to the Aspartate Transporter Glt_{ph}. *Biophysical Journal*. 2011;101(10):2380-2388. doi:10.1016/j.bpj.2011.10.010.
- Huang, J., & MacKerell, A. D.** (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, 34(25), 2135–2145.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K**. VMD—Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graphics*. 1996; 14:33–38.
- James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kale, and Klaus Schulten**. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26:1781-1802, 2005
- Kumar, S., Bouzida, D., Swendsen, R. H., Kollman, P. A., and Rosenberg, J. M.** (1992) The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* 13, 1011–1021.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG**. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947–2948
- Lee C H, Ruben P C**. “Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin” *Channels*, 10.4161/chan.2.6.7429 (2008).
- Lemkul J.A.** “Umbrella Sampling”. *Gromacs Tutorial*. Web. 5 Ara. 2017
- Lomize MA, Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI** (2006) OPM: Orientations of Proteins in Membranes database. *Bioinformatics* 22, 623-625.
- Mahdavi S, Kuyucak S**. (2015) Mechanism of Ion Permeation in Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels. Ye S, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0133000. doi:10.1371/journal.pone.0133000.
- Mahdavi S, Kuyucak S** (2014) Molecular Dynamics Study of Binding of μ -Conotoxin GIIIA to the Voltage-Gated Sodium Channel Na_v1.4. *PLoS ONE*9(8): e105300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105300>

- McCusker EC, Bagn ris C, Naylor CE, Cole AR, D'Avanzo N, Nichols CG, Wallace BA** (2012) Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat Commun* 3: 1102
- Notredame, C., Higgins, D.G. & Heringa, J.** T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*302, 205–217 (2000).
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. and Catterall W. A.,** “The Crystal Structure Of A Voltage-Gated Sodium Channel” *Nature*, 475: 353-359, 2011
- Pearson WR.** Searching protein sequence libraries: Comparison of the sensitivity and selectivity of the smith-waterman and fasta algorithms. *Genomics*. 1991;11:635–650.
- Pearson WR, Lipman DJ.** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988;85:2444–2448.
- Ryan, D. P. and Ptacek, L. J.,** “Episodic Neurological Channelopathies”, *Neuron*, 68: 282–292 (2010).
- Sali A, Blundell TL.** Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993; 234:779–815.
- Scheuer T.,** Bacterial sodium channels: models for eukaryotic sodium and calcium channels. *Handb Exp Pharmacol*, 221 (2014), sf. 269-291
- Shen H., Zhou Q., Pan X., Li Z., Wu J., Yan N.** Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science*. 2017;355:eaal4326. doi: 10.1126/science.aal4326
- Smith TF, Waterman MS.** Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 1981;147:195–197
- Xiang, Z.** (2006). Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Current Protein & Peptide Science*, 7(3), 217–227.
- Vyas VK, Ukawala RD, Ghate M, Chintha C.** Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;74(1):1-17. doi:10.4103/0250-474X.102537.
- Yang, J., P.T. Ellinor, W.A. Sather, J.F. Zhang, and R.W. Tsien.** 1993. Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature*. 366:158–161
- Zhang, Y.** I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40 (2008).
- Zimmer, T., Haufe, V., & Blechschmidt, S.** (2014). Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. *Global Cardiology Science & Practice*, 2014(4), 449–463
- Zwanzig RW.** High temperature equation of state by a perturbation method. I. Non-polar gases. *J Chem Phys*. 1954;22(8):1420–1426.



EKLER

EK 1 : NavAb kanalının yandan ve üstten görünümü

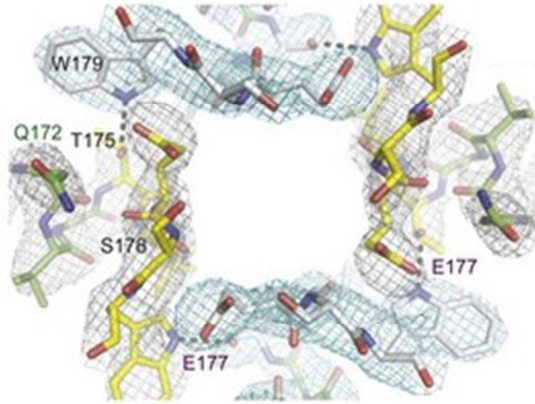
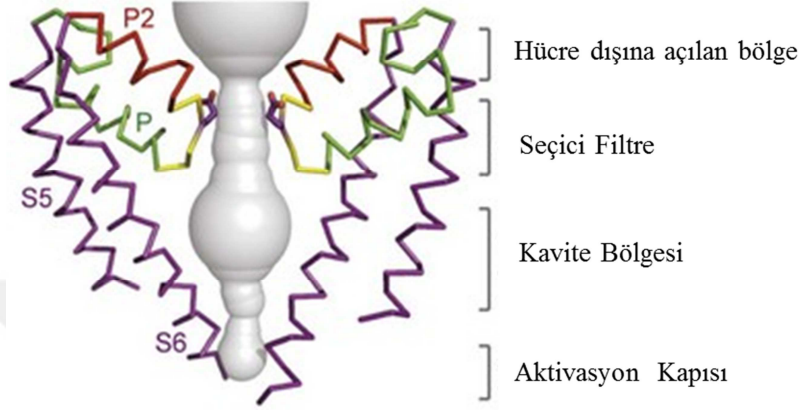
EK 2 : NavPaS, Nav1.3 ve Nav1.4 kanalları arasında yapılan hizalama işlemi

EK 3 : NavPaS ve Nav1.5 kanalları arasında yapılan hizalama işlemi

EK 4 : Nav1.4 yapısına TTX bağlanmasında seçilen kenetlenme kümesi

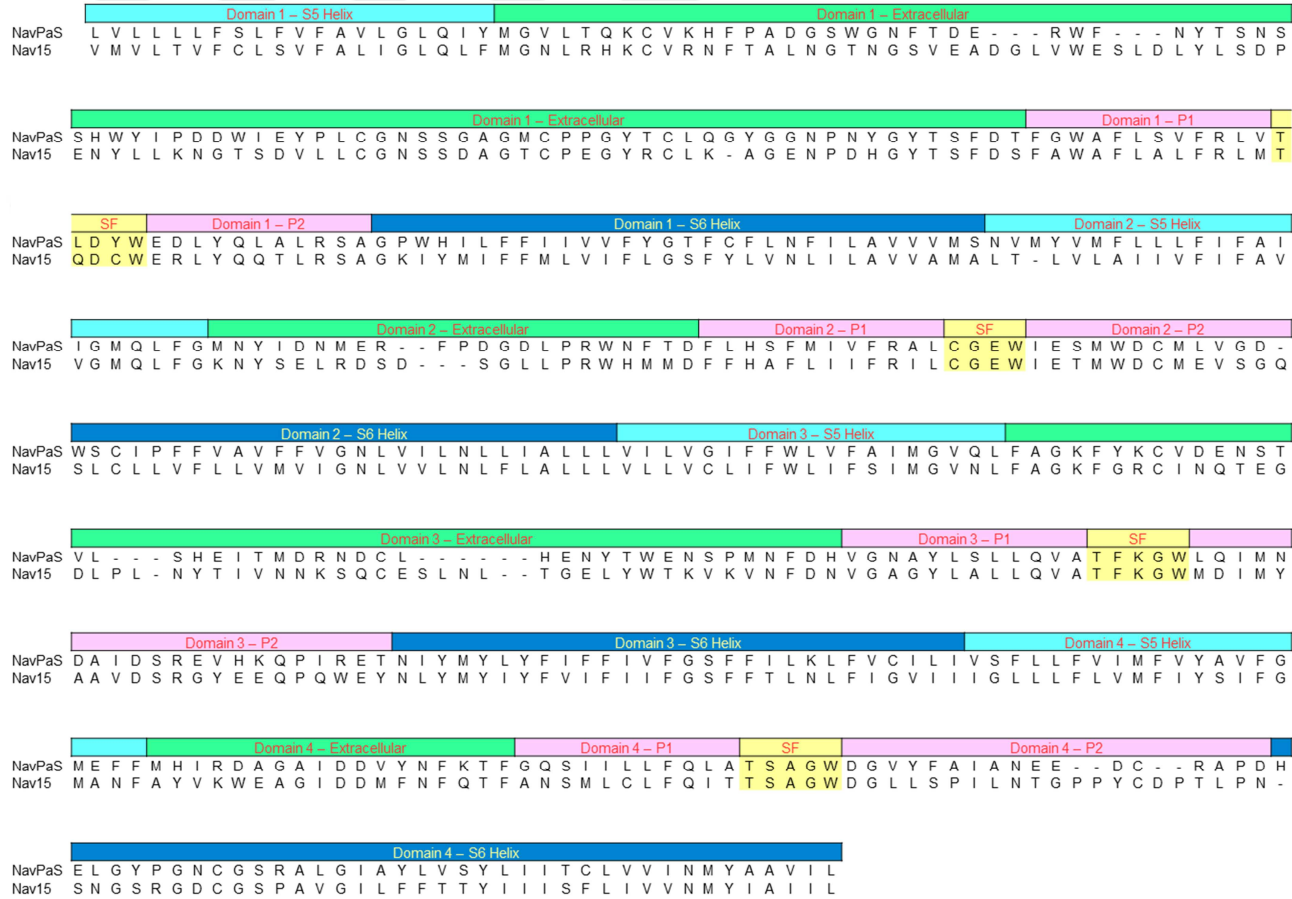
EK 5 : Simülasyon sistemleri için örnek konfigürasyon dosyası

EK 1



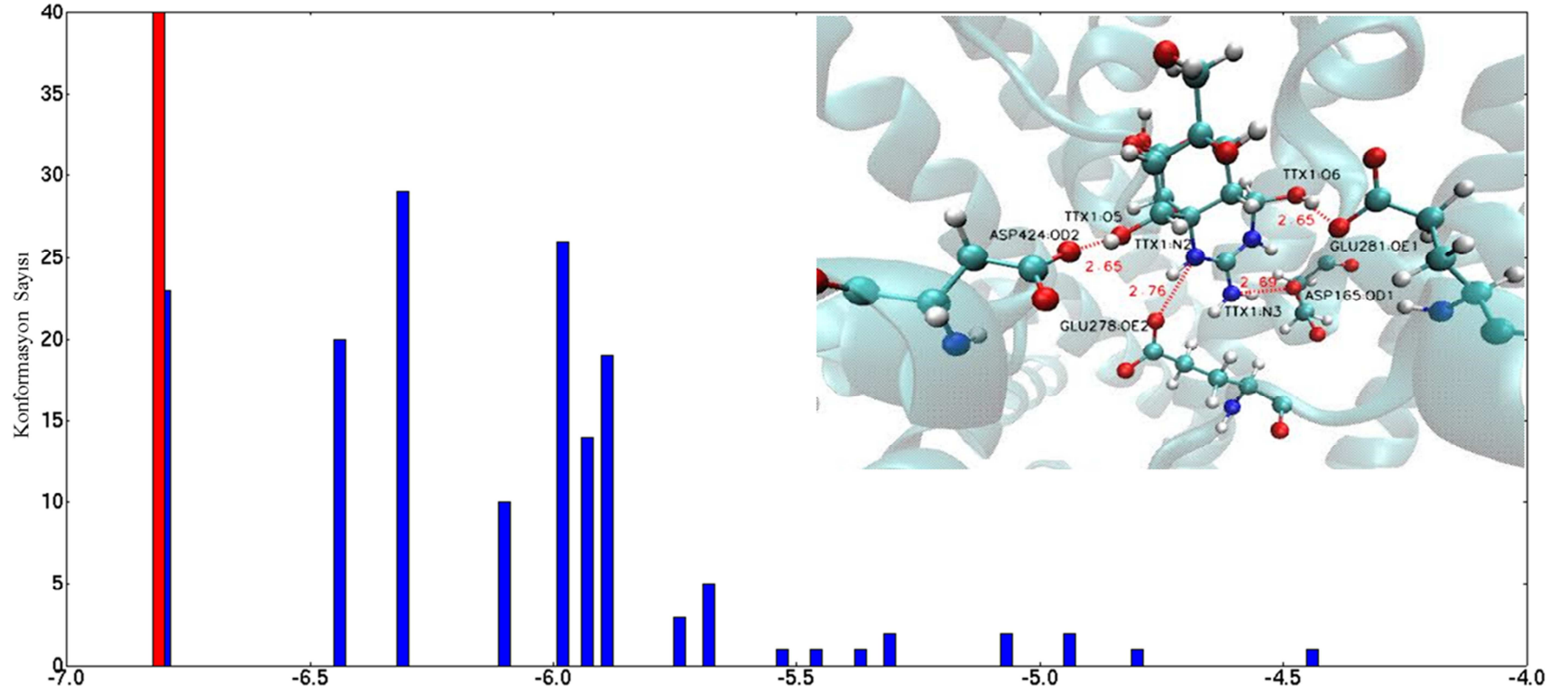
Şekil Ek.1 : NavAb kanalının yandan ve üstten görünümü [Catterall., 2015].

EK 3



Şekil Ek.3 : NavPaS ve Nav1.5 yapılarının hizalama işlemi.

EK 4



Şekil Ek.4 : Nav1.4 – TTX kompleksi için kenetlenme kümesi ve bağlanma pozisyonu.

EK 5

```
set run_step 500000
set input eq00
set input_pr eq00
set tcl_inp ./eq00.tcl
set inputname ./out_${input_pr}
set outputname ./out_${input}
#bincoordinates $inputname.restart.coor
#binvelocities $inputname.restart.vel
#extendedSystem $inputname.restart.xsc
set ref_smd ./refsmd.pdb
set ref_umb ./refumb0.pdb
set ref_fix ./reffix.pdb
coordinates ./refcrd.pdb
structure ./ref.psf
parameters ./par_all36_lipid.prm
parameters ./par_all36_prot.prm
parameters ./par_all36_cgenff.prm
```

```
set firsttimestep 0
set temperature 300
set smd 0
set cons 1
set start 1
```

```
paraTypeCharmm on
temperature $temperature
binaryoutput yes
```

```
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 10.
switching on
switchdist 8.5
pairlistdist 11.5
```

```
timestep 2.0 ;# 2fs/step
rigidBonds all ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 1
stepspercycle 10
```

```
cellBasisVector1 96.0 0.0 0.0
cellBasisVector2 0.0 96.0 0.0
cellBasisVector3 0.0 0.0 129.0
cellOrigin 0.0 0.0 0.0
```



```
wrapAll on
DCDUnitCell yes

PME on
PMEGridSizeX 96 # grid-pts along cellBasisVector1.
PMEGridSizeY 96 # along cellBasisVector2.
PMEGridSizeZ 129 # along cellBasisVector3
margin 2
```

```
langevin on
langevinDamping 10
langevinTemp 300
langevinHydrogen off
```

```
LangevinPiston on
LangevinPistonTarget 1.0
LangevinPistonPeriod 200
LangevinPistonDecay 100
LangevinPistonTemp 300
#SurfaceTensionTarget 10.0
useGroupPressure yes
useFlexibleCell yes
#useConstantArea yes
useConstantRatio yes
```

```
outputName $outputname
```

```
restartfreq 500
dcdfreq 500
xstFreq 500
outputEnergies 500
outputPressure 500
outputtiming 500
#velDCDfile
#velDCDfreq 500
```

```
fixedAtoms off
fixedAtomsForces on
fixedAtomsFile $ref_fix
fixedAtomsCol O
```

```
if { $smd == 0 } {
    SMD off
} else {
    SMD on
}
```

```
SMDFile $ref_smd
SMDDir 0 0 1
SMDk 0.3
SMDVel 0 # 0.A/ps
SMDOutputFreq 10000
}
```

```
if {$scons == 1} {
    constraints on
        consexp 2
        consref $ref_umb
        conskfile $ref_umb
        conskcol B
        selectConstraints on
        selectConstrX on
        selectConstrY on
        selectConstrZ on
} else {
    constraints off }
tclForces on
tclForcesScript $tcl_inp

# Minimization
if {$start == 1} {
    minimize 1000;
}
run $run_step
```

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ali Osman ACAR
Uyruđu : TC
Dođum Tarihi ve Yeri : 1990 / AKŞEHİR
E-posta : aliacar@etu.edu.tr

ÖĐRENİM DURUMU:

- **Lisans** : Hacettepe Üniversitesi
Fizik Mühendisliği 01.2015 - (3.20/4)
- **Yükseklisans** : TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Mikro ve Nanoteknoloji 12.2017 - (3.71/4)

YABANCI DİL: İngilizce

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Acar A.O.,** Körpe E., Çavuş M.,Kuyucak S., Baştuğ T. Molecular Modeling of Mammalian Nav1.4 channel. BiophysicalJournal <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.605>
- **Acar A.O.,** Körpe E., Çavuş M.,Kuyucak S., Baştuğ T. 4th International BAU Drug Design Congress. 13-15 October, 2016. Bahcesehir University (BAU), Istanbul, Turkey
- **Acar A.O.,** Körpe E., Gürsoy E., Çavuş M.,Kuyucak S., Baştuğ T. Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemleriyle Afinite Hesaplanması. 11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi 15-17 Haziran 2017, Kuşadası.

- K rpe E., **Acar A.O.**, avuş M.,Kuyucak S., Başıuğ T. Mechanism and Energetics of Ion and Tetrodotoxin Binding to NavMs Channel. Biophysical Journal. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.605>

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Ali Osman Acar**, Mustafa Polat, Talat Aydın, Canan Aydaş , 2016. The ESR dosimetric features of strontium sulfate and temperature effects on radiation-induced signals. Radiation Physics and Chemistry 123 (2016) 31–36
- Fındık S., **Acar A.O.**, Başıuğ T. The Action Mechanism Of Amphipathic α -helical antimicrobial peptides via computational methods. 5th International BAU Drug Design Congress. 19-21 October, 2017. Bahcesehir University (BAU), Istanbul, Turkey.